



# **Língua Eletrónica: uma ferramenta prática na análise sensorial de azeitonas de mesa**

**Ítala Maria Gouveia Marx**

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

Orientado por:

**Professor Dr. António Manuel Coelho Lino Peres**

**Professora Dra. Deisy Alessandra Drunkler**

**Bragança**

**2016**





## **Língua Eletrónica: uma ferramenta prática na análise sensorial de azeitonas de mesa**

**Ítala Maria Gouveia Marx**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para efeito da obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar através do acordo de Dupla Diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientado por:

Professor Dr. António Manuel Coelho Lino Peres

Professora Dra. Deisy Alessandra Drunkler

**Bragança**

**2016**



*À minha família*



## **Agradecimentos**

É com muita satisfação que concluo o presente trabalho. Ao longo desta jornada conheci pessoas incríveis, sem as quais o desenvolvimento desse estudo não seria possível.

Agradeço a todos aqueles que, de alguma maneira contribuíram para realização e conclusão deste sonho. Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores Professor Doutor António Manuel Peres, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança e à Professora Doutora Deisy Alessandra Drunkler, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por toda a ajuda prestada na realização do trabalho tanto na parte laboratorial quanto escrito, pelo constante incentivo e disponibilidade, pela paciência e conselhos fornecidos, pela exigência e rigor, pela confiança e acima de tudo pela amizade.

Ao Professor Doutor José Alberto e Professor Doutor Luís Dias, da Escola Superior Agrária, pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e apoio, pelas sugestões e ensinamentos prestados na realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório e amigos, Nuno Rodrigues, Ricardo Malheiro e Ana Santos, pelo apoio, incentivo, auxílio, boa disposição e grande amizade, pelos conselhos, pela paciência e conhecimentos transmitidos ao longo do decorrer do trabalho, pois sem eles eu jamais teria conseguido alcançar meus objetivos. Os levarei em meu coração.

Aos amigos brasileiros que vieram comigo em busca desse sonho pelo Programa de Dupla Diplomação, a ajuda, o apoio, os conselhos, a paciência e como é claro, a amizade, o carinho e os momentos de companheirismo. O que permitiu a conclusão deste trabalho. Agradeço também a todos os restantes colegas que de alguma forma contribuíram para finalização deste estudo.

Para finalizar, com a maior importância, agradeço à minha família, por todo seu esforço, apoio e incentivo. Por crer e ajudar na concretização dos meus objetivos. Sem eles eu jamais teria chegado até aqui.



Este trabalho foi em parte financiado pelo Projeto POCI-01-0145-FEDER-006984 - Laboratório Associado LSRE-LCM - financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia.





## Índice Geral

Índice de Figuras .....	v
Índice de Tabelas .....	vii
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	ix
Resumo .....	xi
Abstract.....	xiii
Estrutura do trabalho .....	xv
<b>Capítulo 1. ....</b>	<b>1</b>
Introdução.....	1
<b>Capítulo 2. ....</b>	<b>7</b>
Revisão Bibliográfica .....	7
2.1.Azeitona.....	9
2.1.1. Processamento tecnológico.....	9
2.1.1.1. <i>Fermentação Natural</i> .....	10
2.1.1.2. <i>Estilo Sevilhano</i> .....	11
2.1.1.3. <i>Estilo Californiano</i> .....	12
2.1.1.4. <i>Outros tipos de preparação</i> .....	13
2.1.2. Análise sensorial de azeitonas de mesa .....	13
2.2.Língua Eletrónica .....	15
2.2.1. Métodos eletroquímicos .....	16
2.2.2. Sensores químicos .....	17
2.2.3. Processamento de sinais .....	18
2.2.3.1. <i>Métodos não supervisionados</i> .....	18
2.2.3.2. <i>Métodos supervisionados</i> .....	19

2.2.4. Aplicações .....	21
2.3.Perspetivas do trabalho proposto .....	22
<b>Capítulo 3. ....</b>	<b>23</b>
Materiais e Métodos .....	23
3.1.Amostras de azeitonas de mesa .....	25
3.2.Análise organolética de azeitonas de mesa .....	25
3.3.Soluções padrão que mimetizam atributos gustativos .....	27
3.4.Desempenho da LE na avaliação de defeitos organoléticos .....	28
3.4.1. Soluções padrão que mimetizam defeitos sensoriais .....	28
3.4.2. Amostras referência de azeitona de mesa e salmoura com um único defeito sensorial.....	29
3.4.3. Amostras comerciais de Azeitonas de mesa.....	30
3.5.Língua Eletrónica .....	30
3.5.1. Sistema de multi-sensores .....	30
3.5.2. Sensores químicos .....	31
3.5.3. Equipamento.....	33
3.5.4. Análise com a língua eletrónica.....	33
3.5.5. Métodos Estatísticos.....	34
3.5.5.1. <i>Classificação com ADL</i> .....	34
3.5.5.2. <i>Quantificação com RLM</i> .....	36
<b>Capítulo 4. ....</b>	<b>39</b>
Avaliação qualitativa do potencial da LE na classificação de azeitonas de mesa.....	39
4.1.Classificação comercial de azeitonas de mesa segundo painel .....	41
4.2.Avaliação do potencial da LE na discriminação de sabores básicos.....	44
4.3.Avaliação do potencial da LE na discriminação de atributos sensoriais negativos ..48	
4.3.1. Soluções padrão que mimetizam características organoléticas negativas em azeitonas de mesa .....	48

4.3.2. Potencial da LE como discriminante de amostras referência de azeitonas de mesa e salmoura com um único defeito organolético intenso, identificado na análise sensorial.....	52
4.4.Desempenho da LE na classificação de amostras de azeitonas de mesa de acordo com a sua categoria comercial, baseada na presença e intensidade de defeitos sensoriais .....	54
<b>Capítulo 5. ....</b>	<b>59</b>
Avaliação quantitativa das intensidades dos atributos negativos presentes em amostras comerciais de azeitonas de mesa .....	59
5.1.Avaliação das intensidades dos atributos negativos presentes em amostras de azeitonas de mesa e salmoura, detetados pelo painel de provadores.....	61
5.2.Avaliação do potencial da LE na quantificação dos defeitos organoléticos presentes em amostras comerciais de azeitonas de mesa .....	63
<b>Capítulo 6. ....</b>	<b>73</b>
Discussão geral e conclusões.....	73
Referências bibliográficas .....	79
Anexos.....	89
Anexo A: Folha de perfil de azeitona de mesa utilizada pelo painel de provadores (COI, 2011). ....	91



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Sistema de multi-sensores .....	31
<b>Figura 2.</b> Montagem para a análise com a língua eletrônica .....	33
<b>Figura 3.</b> Discriminação de soluções padrão que mimetizam sabores básicos (ácido, amargo e salgado) avaliados em provas sensoriais de azeitonas de mesa, recorrendo a um modelo LE-ADL-AS com base na informação gerada por 5 sensores da LE (S:9, S1:14, S2:4, S2:14, e S2:16): ácido cítrico e tartárico (0,01 a 2 g/L; sabor ácido); cafeína e quinino (0,01 a 3 g/L; sabor amargo); cloreto de sódio e de potássio (0,5 a 25 g/L; salgado). .....	47
<b>Figura 4.</b> Discriminação de soluções padrão que mimetizam atributos negativos associados à fermentação anormal de azeitonas de mesa (butírico, pútrido e sapateira) recorrendo a um modelo LE-ADL-AS com base na informação gerada por 5 sensores da LE (S1:10, S1:12, S2:8, S2:10 e S2:20): ácido n-butírico (0,25 a 2 g/L; defeito butírico); 2-mercaptoetanol (0,05 a 2 g/L; defeito pútrido); ácido ciclohexanocarboxílico (0,075 a 2 g/L; defeito sapateira). .....	51
<b>Figura 5.</b> Discriminação de azeitonas de mesa (pasta de azeitona) e salmouras com um defeito sensorial único intenso ( $DPP \geq 8$ ) de acordo com a avaliação do painel de provadores, por recurso a análise estatística multivariada. (A) Pastas de azeitonas de mesa - modelo LE-ADL-AS com base na informação gerada por 7 sensores da LE (S1:9, S1:15, S2:6, S2:14, S2:15, S2:17 e S2:20): defeitos butírico, avinhado-avinagrado e sapateira. (B) Salmouras - modelo LE-ADL-AS com base na informação gerada por 10 sensores da LE (S1:1, S1:2, S1:16, S1:17, S2:4, S2:7, S2:15, S2:16 e S2:20): butírico, mofo, pútrido, avinhado-avinagrado e sapateira. ....	53
<b>Figura 6.</b> Discriminação de azeitonas de mesa de acordo com a sua categoria comercial recorrendo a um modelo LE-ADL-AS baseado na informação de 25 sinais registados pela LE durante a análise das pastas de azeitona e respetivas salmouras: pasta de azeitonas – sinais de 16 sensores (A_S1:4, A_S1:10, A_S1:11, A_S1:13, A_S1:16, A_S1: 18, A_S2:2, A_S2:3, A_S2:8, A_S2:9, A_S2:12, A_S2:13, A_S2 :14, A_S2:16, A_S2:17 e A_S2:19) e salmoura – sinais de 9 sensores (S_S1:2, S_S1:4, S_S1:6, S_S1:20, S_S2:7, S_S2:11, S_S2:13, S_S2:15 e S_S2:20). A classificação das azeitonas de mesa de acordo	

com a sua qualidade sensorial, (baseada na presença e intensidade de atributos organoléticos negativos avaliados por um painel de provadores) seguiu, a classificação comercial proposta pelo COI (2011) (azeitonas extra, 1ª escolha, 2ª escolha e azeitonas que podem ser comercializadas como azeitonas de mesa (NC)) à qual foi acrescentada uma categoria adicional proposta neste trabalho (azeitonas extra sem defeito). .....57

**Figura 7.** Quantificação das medianas das intensidades do defeito butírico (associado à fermentação anormal) detetado em 44 amostras de azeitonas de mesa (azeitonas e respetivas salmouras) utilizando o modelo LE-RLM-AS com base em 24 perfis de sinais potenciométricos: (A) validação cruzada LOO ( $R^2=0,993$ ); (B) validação cruzada K-folds com repetição (K = 4 folds com 10 repetições,  $R^2= 0,98 \pm 0,02$ .) .....66

**Figura 8.** Quantificação das medianas das intensidades do defeito pútrido presente em 44 amostras de azeitonas de mesa e suas respetivas salmouras utilizando modelos LE-RLM-AS: (A) validação cruzada LOO  $R^2=0,989$ ; perfil de sinais de 29 sensores; (B) validação cruzada K-folds com repetição (K = 4 folds com 10 repetições  $R^2: 0,97 \pm 0,02$ .) .....67

**Figura 9.** Quantificação das medianas das intensidades do defeito sapateira presente em 44 amostras de azeitonas de mesa e suas respetivas salmouras utilizando modelos LE-RLM-AS: (A) validação cruzada LOO:  $R^2=0,988$ ; perfil de sinais de 24 sensores; (B) validação cruzada K-folds com repetição (K = 4 folds com 10 repetições  $R^2: 0,99 \pm 0,04$ ). .....67

**Figura 10.** Quantificação das medianas das intensidades do defeito avinhado-avinagrado (associado à categoria de outros defeitos) presente em 44 amostras de azeitonas de mesa e suas respetivas salmouras utilizando modelos LE-RLM-AS: (A) validação cruzada LOO  $R^2=0,989$ ; perfil de sinais de 28 sensores; (B) validação cruzada K-folds com repetição (K = 4 folds com 10 repetições  $R^2: 0,98 \pm 0,01$ ). .....68

**Figura 11.** Quantificação das medianas das intensidades do defeito mofo presente em 44 amostras de azeitonas de mesa e suas respetivas salmouras utilizando modelos LE-RLM-AS: (A) validação cruzada LOO:  $R^2=0,996$ ; perfil de sinais de 28 sensores; (B) validação cruzada K-folds com repetição (K = 4 folds com 10 repetições  $R^2: 0,98 \pm 0,02$ ). .....68

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Soluções padrão utilizadas no treinamento do painel de provadores de azeitonas de mesa (de acordo com o COI (2011)): atributos gustativos, atributos negativos (associados a fermentação anormal), compostos padrão, concentração e nível de intensidade organolética. ....	27
<b>Tabela 2.</b> Concentração das soluções padrão utilizadas na avaliação da capacidade da LE na identificação/quantificação dos sabores básicos (ácido, amargo e salgado). ....	29
<b>Tabela 3.</b> Detalhes dos sensores da LE (código de identificação; componentes dos pares de plastificantes e aditivos usados na preparação de cada membrana lipo-polimérica)..	32
<b>Tabela 4.</b> Detalhes das amostras de azeitonas de mesa (cultivar, processamento tecnológico e marca de acordo com as informações do rótulo) e classificação de acordo com a categoria comercial com base na avaliação organolética dos provadores (segundo o regulamento COI (2011)). ....	42
<b>Tabela 5.</b> Sensibilidade da membrana da LE na análise de soluções padrão de sabores básicos ácido, amargo e salgado (composto químico, concentração, gama de sinais potenciométricos, sensibilidade e coeficientes de determinação) ....	45
<b>Tabela 6.</b> Sensibilidade das membranas/sensores da LE na análise de soluções padrão de defeitos associados à fermentação anormal (composto químico, gama de concentrações, gama de sinais potenciométricos, sensibilidade e coeficientes de determinação). ....	50
<b>Tabela 7.</b> Mediana dos valores das intensidades de cada defeito identificado pelo painel de provadores (8 painelistas pertencentes a um painel sensorial em formação) durante a avaliação sensorial das amostras de azeitonas de mesa e respectivas salmouras de acordo com o COI (2011). Entre parêntesis indica-se a gama de intensidades registadas pelo painel (intensidade mínima e máxima do defeito perceptível). ....	61
<b>Tabela 8.</b> Modelos LE-RLM-AS estabelecidos para a quantificação da mediana das intensidades de 5 atributos negativos detetados pelo painel de provadores em 44 amostras comerciais de azeitonas. ....	65

**Tabela 9.** Parâmetros da regressão linear simples estabelecida entre os valores das intensidades dos defeitos previstas (validação cruzada LOO (*leave-one-out*) e K-folds com repetição) pelo modelo LE-RLM-AS e os respectivos valores das medianas das intensidades dos defeitos percebidos pelo painel de provadores, para os 5 atributos negativos detetados nas amostras de azeitona de mesa (3 associados à fermentação anormal e 2 que se enquadram na categoria de outros defeitos) (COI, 2011): coeficiente de determinação ( $R^2$ ); declives, ordenadas na origem e respectivos intervalos de confiança (IC) a 95%. ....70

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ADL** – Análise Discriminante Linear

**AS** – Arrefecimento Simulado

**COI** – Conselho Oleícola Internacional

**DPP** – Defeito Predominante Percebido

**LE** – Língua Eletrónica

**MQP**- Mínimos Quadrados Parciais

**MQP-AD** – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

**NP** – Norma Portuguesa

**LOO** – (*leave-one-out*) “deixar um de fora”

**RCP** – Regressão por Componentes Principais

**RLM** – Regressão Linear Múltipla

**VC** – Validação Cruzada



## Resumo

As azeitonas de mesa são consumidas e apreciadas em todo o mundo e, embora a sua classificação comercial não seja legalmente exigida, o Conselho Oleícola Internacional sugere que seja regulamentada com base na avaliação sensorial por um painel de provadores. A implementação de tal requer o cumprimento de diretrizes estabelecidas pelo Conselho Oleícola Internacional, resultando numa tarefa complexa, demorada e cujas avaliações não estão isentas de subjetividade. Neste trabalho, pela primeira vez, uma língua eletrónica foi utilizada com o intuito de classificar azeitonas de mesa em categorias comerciais, estipuladas com base na presença e na mediana das intensidades do defeito organolético predominante percebido pelo painel de provadores. Modelos de discriminação lineares foram estabelecidos com base em subconjuntos de sinais potenciométricos de sensores da língua eletrónica, selecionados recorrendo ao algoritmo de arrefecimento simulado. Os desempenhos qualitativo de previsão dos modelos de classificação estabelecidos foram avaliados recorrendo à técnica de validação cruzada *leave-one-out* e à técnica de validação cruzada K-folds com repetição, que permite minimizar o risco de sobreajustamento, permitindo obter resultados mais realistas. O potencial desta abordagem qualitativa, baseada nos perfis eletroquímicos gerados pela língua eletrónica, foi satisfatoriamente demonstrado: (i) na classificação correta (sensibilidades  $\geq 93\%$ ) de soluções padrão (ácido n-butírico, 2-mercaptoetanol e ácido ciclohexanocarboxílico) de acordo com o defeito sensorial que mimetizam (butírico, pútrido ou sapateira); (ii) na classificação correta (sensibilidades  $\geq 93\%$ ) de amostras de referência de azeitonas e salmouras (presença de um defeito único intenso) de acordo com o tipo de defeito percebido (avinhado-avinagrado, butírico, mofo, pútrido ou sapateira), e selecionadas pelo painel de provadores; e, (iii) na classificação correta (sensibilidade  $\geq 86\%$ ) de amostras de azeitonas de mesa com grande heterogeneidade, contendo um ou mais defeitos organoléticos percebidos pelo painel de provadores nas azeitona e/ou salmouras, de acordo com a sua categoria comercial (azeitona extra sem defeito, extra, 1ª escolha, 2ª escolha e azeitonas que não podem ser comercializadas como azeitonas de mesa). Por fim, a capacidade língua eletrónica em quantificar as medianas das intensidades dos atributos negativos detetados pelo painel nas azeitonas de mesa foi demonstrada recorrendo a modelos de regressão linear múltipla-algoritmo de arrefecimento simulado, com base em subconjuntos selecionados de sinais gerados pela língua eletrónica durante a análise potenciométrica das azeitonas e salmouras. O

desempenho de previsão dos modelos quantitativos foi validado recorrendo às mesmas duas técnicas de validação cruzada. Os modelos estabelecidos para cada um dos 5 defeitos sensoriais presentes nas amostras de azeitona de mesa, permitiram quantificar satisfatoriamente as medianas das intensidades dos defeitos ( $R^2 \geq 0,97$ ). Assim, a qualidade satisfatória dos resultados qualitativos e quantitativos alcançados permite antever, pela primeira vez, uma possível aplicação prática das línguas eletrónicas como uma ferramenta de análise sensorial de defeitos em azeitonas de mesa, podendo ser usada como uma técnica rápida, económica e útil na avaliação organoléptica de atributos negativos, complementar à tradicional análise sensorial por um painel de provadores.

**Palavras-chave:** Azeitonas de mesa; Defeitos sensoriais; Língua eletrónica potenciométrica; Quimiometria.

## Abstract

Table olives are consumed and appreciated all around the world and although its commercial classification is not legally required, the International Olive Council suggests the implementation of specific regulation based on the organoleptic evaluation carried out by sensory panel. The implementation of a trained sensory panel requires the compliance with the guidelines established by the International Olive Council, being a complex and time-consuming task, which evaluations are not without subjectivity. In this work, first, an electronic tongue was used to classify table olives according to commercial categories established based on the presence and median intensities of the predominant organoleptic defects perceived by the taste panel. Linear discrimination models were established based on the most informative subsets of potentiometric signals recorded by the electronic tongue sensors and selected using the simulated annealing algorithm. The qualitative predictive performance of the established classification models were evaluated using the leave-one-out cross-validation and the repeated K-folds cross-validation techniques, the latter the minimizes the risk of overfitting, allowing more realistic results. The potential of this qualitative approach based on electrochemical profiles generated by the electronic tongue, has been satisfactorily demonstrated by: (i) the correct classification (sensitivity  $\geq 93\%$ ) of standard solutions (n-butyric acid, 2-mercaptoethanol and cyclohexanecarboxylic acid) according to the sensory defects that they mimicked (butyric, putrid or zapateria); (ii) the correct classification (sensitivity  $\geq 93\%$ ) of reference samples of olives and brines solutions (possessing a single intense defect) according to the type of defect perceived by the panel (winey-vinegary, butyric, musty, putrid or zapateria ) and selected by the taste panel; and (iii) the correct classification (sensitivity  $\geq 86\%$ ) of table olives samples despite their great heterogeneity, which presented one or more organoleptics defects, identified by the sensory panel during the olive and/or brine solutions evaluation, according to their commercial category (extra olive without defects, extra, 1<sup>st</sup> choice, 2<sup>nd</sup> choice and olives that can not be sold as table olives). Finally, the electronic tongue ability to quantify the median intensities of the negative attributes perceived by the sensory panel in table olives was demonstrated using multiple linear regression models based on subsets of potentiometric signals generated by the electronic tongue during the table olives and brine solutions analysis, and selected using the simulated annealing algorithm. The predictive performances of the quantitative models

was evaluated using the same two cross-validation techniques. The established model, for each of the five sensory defects perceived in the table olives samples allowed to satisfactorily quantify the medians of defects intensities ( $R^2 \geq 0.97$ ). Thus, based on the satisfactory quality and quantitative results achieved allows to foresee, for the first time a possible practical application of electronic tongues as a sensory tool for table olives' defects assessment, being a fast, economic and useful technique for the organoleptic evaluation of negative attributes, complementary to the traditional sensory evaluation carried out by trained sensory panels.

**Keywords:** Table olives; Sensory defects; Potentiometric electronic tongue; Chemometrics.

## **Estrutura do trabalho**

Primeiramente, aborda-se no Capítulo 1, a introdução ao tema bem como a finalidade e os principais objetivos do trabalho proposto.

Em seguida, no Capítulo 2, apresenta-se uma breve revisão sobre o assunto que será tratado ao longo do estudo.

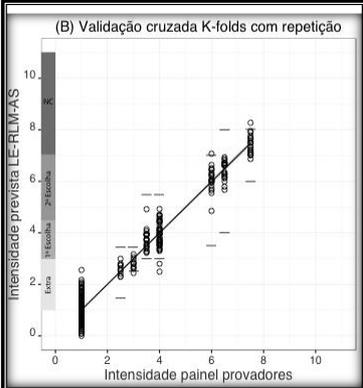
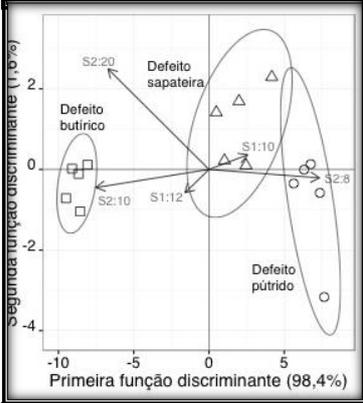
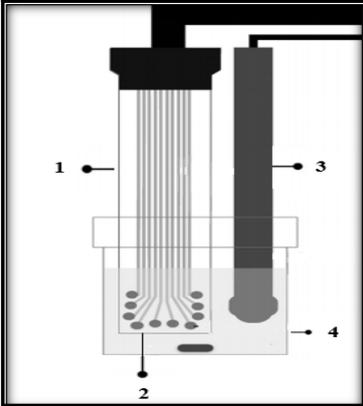
No Capítulo 3, encontram-se descritos os materiais e as metodologias utilizadas durante as análises realizadas.

No Capítulo 4, apresentam-se os resultados obtidos na avaliação qualitativa da Língua Eletrónica como ferramenta na discriminação de defeitos sensoriais, bem como na classificação comercial de azeitonas de mesa.

No Capítulo 5 apresentam-se os resultados quantitativos visando demonstrar a capacidade da Língua Eletrónica na determinação das intensidades dos atributos negativos usualmente presentes em azeitonas de mesa.

Para finalizar, o Capítulo 6 apresenta a discussão geral dos resultados obtidos e as principais conclusões do trabalho, perspetivando algumas linhas futuras de estudo.





# Capítulo 1.

## Introdução



A azeitona é o fruto proveniente da oliveira que pertence à família *Oleaceae*, espécie *Olea europaea* L.. A oliveira é uma árvore nativa de regiões temperadas e tem grande importância comercial na região do Mediterrâneo (Boskou, 2006). Para o fruto se tornar edível é necessário que ocorra um conjunto de alterações físico-químicas com o intuito de remover, pelo menos parcialmente, o seu amargor característico, pois dificilmente são consumidas na sua forma natural. Quando o fruto passa por esse processamento, são designadas azeitonas de mesa (Parinos *et al.*, 2007).

A azeitona continua a ser maioritariamente direcionada para a produção de azeite embora uma parte substancial já se destine à produção de azeitona de mesa, produto muito apreciado pelos consumidores. Com efeito, segundo dados do Sistema de Informação sobre o Azeite e a Azeitona de Mesa (SIAZ) a produção de azeitonas de mesa em Portugal na campanha 2015-2016 foi de aproximadamente 23540 toneladas, tendo-se observado um aumento de 11% em relação à última campanha (SIAZ, 2016).

O controlo de qualidade da azeitona de mesa baseia-se apenas na verificação visual da existência de defeitos visíveis na epiderme dos frutos, avaliação de alguns parâmetros físico-químicos, como exemplo (gordura, humidade, hidratos de carbono, proteína, valor energético e composição em ácidos gordos) e em análises microbiológicas para avaliação da segurança do produto para os consumidores, estando a análise sensorial relegada para segundo plano. Contudo, o aumento da produção de azeitonas de mesa nos últimos anos e a importância económica de que esta prática se reveste, levou o Conselho Oleícola Internacional (COI) a implementar diretrizes para a seleção e treino de painel de provadores capazes de classificar as azeitonas de mesa de acordo com a intensidade dos defeitos presentes na mesma, melhorando assim a confiança do consumidor no momento de adquirir o produto. No entanto, a classificação comercial de azeitonas de mesa com base na sua avaliação sensorial ainda não é obrigatória, devido essencialmente à resistência dos produtores, possivelmente atribuída aos custos acrescidos que tal avaliação acarretaria, sendo atualmente apenas recomendada pelo COI como uma tentativa de melhoria no que diz respeito a essa prática. A Norma do COI (COI/OT/MO No1/Ver.2 Novembro 2011) (COI, 2011), descreve os critérios e os procedimentos necessários para a análise sensorial em azeitonas de mesa. Esta análise baseia-se sobretudo nos defeitos encontrados pelo painel de provadores. De acordo com a presença ou ausência de defeitos sensoriais por fermentação anormal (butírico, pútrido e sapateira), e associado à categoria de outros defeitos (avinhado-avinagrado, cozido, metálico, mofo,

ranço e sabão) e da mediana das intensidades aferidas, as azeitonas de mesa podem ser classificadas em diferentes categorias comerciais (Extra, 1ª escolha, 2ª escolha e azeitonas que não podem ser comercializadas como azeitonas de mesa) (COI, 2011). Contudo, o tempo requerido para o treino de um painel de provadores de acordo com os requisitos oficiais regulamentados pelo COI (2011), as particularidades impostas pela norma (por exemplo, número máximo de amostras que podem ser avaliadas num dado período de tempo), associado a possíveis problemas de reprodutibilidade na avaliação sensorial e subjetividade da mesma, torna imperativo o desenvolvimento de técnicas analíticas que possam ser uma alternativa ou complementares à análise sensorial tradicional. Técnicas cromatográficas têm sido desenvolvidas com o intuito de permitirem uma avaliação da qualidade sensorial de azeitonas de mesa (Navarro *et al.*, 2004; Panagou e Tassou, 2006). Casale e colaboradores (2010), utilizaram cromatografia gasosa para identificação das cultivares de azeitonas de mesa através da determinação da composição de ácidos gordos dos óleos extraídos do fruto. Guzman e colaboradores (2013) recorreram a um sistema de visão por infravermelho para deteção automática da qualidade de azeitonas. O sistema permitiu detetar a presença de defeitos na epiderme do fruto distinguindo facilmente aqueles que não cumprem os requisitos mínimos de qualidade.

No entanto, estas técnicas são demoradas, requerem vários pré-tratamentos da amostra, equipamento dispendioso e técnicos qualificados pelo que podem não ser uma alternativa realista. Assim sendo, a análise sensorial de azeitonas de mesa continua a ser realizada recorrendo a um painel de provadores especificamente treinado o que acarreta custos acrescidos para além do elevado tempo despendido para o efeito.

Panagou e colaboradores (2008) estudaram o potencial de um nariz eletrónico para distinguir a qualidade de azeitonas de mesa com base no seu perfil volátil, isto é, compostos voláteis presentes no fruto, tendo verificado que esta ferramenta permitia obter resultados promissores na análise de azeitonas de mesa.

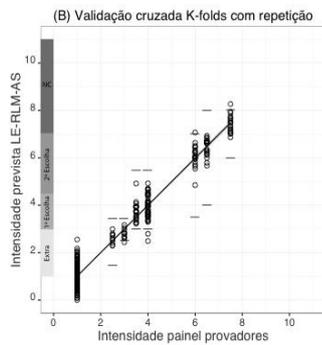
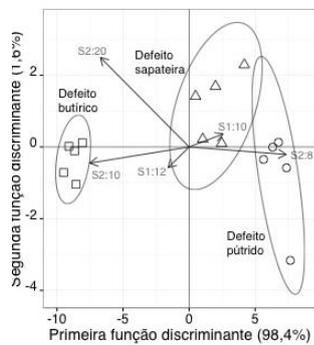
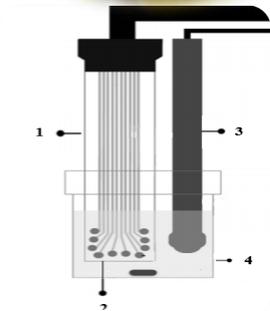
Assim sendo, o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas, de baixo custo e sensíveis para avaliar a qualidade das azeitonas de mesa, nomeadamente ao nível da presença de defeitos organoléticos e da sua intensidade é uma necessidade premente cujo sucesso permitirá suprir uma lacuna existente.

Neste âmbito a utilização de sistemas eletroquímicos de multi-sensores, como por exemplo as Línguas Eletrónicas (LEs), afigura-se um possível caminho. As LEs permitem obter uma informação global, (ou seja, a “impressão digital” de amostras complexas) em virtude de serem capazes de mimetizar a língua humana na avaliação de sabores básicos,

nomeadamente do ácido, salgado, amargo, doce e umami. (Ha *et al.*, 2015). Convém salientar que a informação obtida varia de acordo com as características e tipos de sensores utilizados na LE (Ha *et al.*, 2015). As LEs podem ser usadas para análise qualitativa com o objetivo de reconhecer, identificar, classificar, discriminar ou diferenciar amostras bem como na quantificação de constituintes das amostras (Vlasov *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2009; Escuter-Gilabert *et al.*, 2010). Recentemente, as LEs potenciométricas foram aplicadas com sucesso na classificação de azeites monovarietais virgem extra de acordo com a cultivar de azeitona (Dias *et al.*, 2014b, 2016a) bem como na classificação de azeites monovarietais virgem extra de acordo com a perceção da intensidade sensorial de atributos positivos (verde, amargo e picante) em azeites intensos, médios ou suaves (Velooso *et al.*, 2016).

Deste modo, neste trabalho pretende-se avaliar, pela primeira vez, a potencialidade de uma LE potenciométrica contendo membranas lipídicas de sensibilidade cruzada para: (i) classificar azeitonas de mesa de acordo com os atributos sensoriais, nomeadamente atendendo à presença de atributos negativos (com diferentes intensidades); (ii) classificar azeitonas de mesa de acordo com o sistema de classificação comercial proposto pelo COI (2011) e baseado nas medianas das intensidades de defeitos presentes (azeitonas Extra, de 1<sup>a</sup> escolha, de 2<sup>a</sup> escolha, e azeitonas que não podem ser comercializadas como azeitonas de mesa (NC)); (iii) correlacionar a intensidade dos sinais potenciométricos da LE e a escala de avaliação sensorial do painel, para atributos gustativos positivos (nomeadamente o amargo, ácido e salgado) e negativos (pútrido, butírico, sapateira) associados à fermentação anormal e (mofo e avinhado/avinagrado) associados à categoria de outros defeitos. Dessa forma, pretende-se avaliar e se possível demonstrar a viabilidade da utilização dessa ferramenta analítica na classificação comercial de azeitonas de mesa.





# Capítulo 2.

## Revisão

## Bibliográfica



## 2.1. Azeitona

Botanicamente, a azeitona é constituída pelo epicarpo ou pele, mesocarpo ou polpa, e endocarpo ou caroço. Apresenta algumas diferenças morfológicas e fisiológicas que a distingue de outras drupas (um tipo de fruto carnoso, com apenas uma semente), como um elevado teor de gordura (12-30%). Contudo, essas características dependem da época do ano, do seu estado de maturação e da cultivar da azeitona (COI, 2015).

Segundo a Norma Portuguesa NP-3034 (2012) a designação de “Azeitonas de mesa” refere-se ao produto preparado a partir de frutos de cultivares apropriadas da espécie *Olea europaea* L., em estado de maturação conveniente, submetidos a tratamentos e operações que assegurem as suas características e boa conservação.

### 2.1.1. Processamento Tecnológico

Na escolha da matéria-prima para elaboração de azeitonas de mesa devem ter-se em conta alguns fatores que poderão definir a qualidade final do produto, tais como a escolha das cultivares, o volume e forma do fruto, a boa proporção de polpa em relação ao caroço, e as características da polpa, nomeadamente sabor, firmeza e facilidade de separação do caroço. Por outro lado, é de extrema importância garantir a qualidade e segurança do produto final, informação global das azeitonas de mesa processadas, o que exige uma monitorização das suas propriedades físico-químicas, microbiológicas bem como de parâmetros sensoriais da azeitona e da salmoura ao longo de toda a cadeia de comercialização (Kailis e Harris, 2007).

Atualmente podem encontrar-se no mercado vários tipos de azeitonas de mesa que se distinguem pela sua cor, forma de apresentação, tipo de preparação, entre outros fatores. Segundo o COI (2004) e o *Codex Alimentarius* (2010), podem considerar-se três tipos de azeitona de mesa, consoante o grau de maturação dos frutos:

- **Azeitonas verdes:** Frutos colhidos durante o período de amadurecimento (no início do Outono) e que tenham atingido o tamanho normal. A cor do fruto pode variar de verde à amarelo-palha.
- **Azeitonas mistas:** Frutos colhidos antes de atingirem a completa maturação, com uma cor variável entre tons rosados e acastanhados.

- **Azeitonas pretas:** Frutos colhidos em pleno estado de maturação ou ligeiramente antes. A cor do fruto pode variar de negro-avermelhado a castanho-escuro, passando por tons violáceos, atendendo à região geográfica e época de colheita.

Para além da cor do produto final, as azeitonas podem ainda ser classificadas de acordo com o método de preparação. De entre as diferentes formas de preparação de azeitona de mesa, as de maior importância são o estilo espanhol (Sevilhano), estilo californiano (pretas oxidadas) e por fermentação natural, também conhecido como estilo grego (Garrido-Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006). O tipo de processamento tecnológico utilizado para produção de azeitonas de mesa varia muito de acordo com a região. A seguir, descrevem-se os principais métodos de preparação de azeitonas de mesa.

#### *2.1.1.1. Fermentação natural*

Para este tipo de preparação, os frutos são normalmente colhidos maduros, estes, quando colhidos no final da campanha, apesar de apresentarem uma excelente coloração, após a fermentação natural apresentam uma textura que não é suficientemente firme, devendo-se evitar colheitas tardias para este tipo de processamento (Gómez *et al.*, 2006). No entanto, de acordo com o grau de maturação dos frutos aquando da colheita e da região de produção, os frutos podem ter diversas tonalidades, desde avermelhada-escuro, violeta, violeta-escuro ou mesmo verde-escuro e, mesmo assim, serem adequados para este tipo de processamento (Fernández *et al.*, 1997). Após transporte para as unidades industriais, as azeitonas são escolhidas e calibradas, sendo posteriormente lavadas para remover a sujidade superficial (Fernández *et al.*, 1997). Após lavagem, são colocadas em salmoura, com uma concentração de sal entre 8 e 10%, podendo utilizar-se concentrações inferiores (6%) em zonas frias (Gómez *et al.*, 2006). A partir desse momento dá-se início a uma fermentação natural, resultante da complexa microbiota existente, composta essencialmente por leveduras e bactérias. A fermentação pode ser conduzida tanto em condições aeróbias como anaeróbias (Gómez *et al.*, 2006). Esta fermentação é demorada, essencialmente devido a dois fatores: por um lado a lenta difusão de compostos fermentescíveis através da pele da azeitona para o exterior, como por exemplo açúcares, e por outro lado devido à presença de oleuropeína e outros compostos fenólicos que possuem atividade antimicrobiana (Sousa *et al.*, 2006). A fermentação pode ser afetada se não forem aplicados controlos físicos (arejamento, remoção do CO<sub>2</sub>), químicos

(controle do pH e da concentração de NaCl) e microbiológicos (tipo e quantidade de microrganismos presentes no meio) (Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006). Após a fermentação, os frutos são oxidados por exposição ao ar de modo a melhorar a sua aparência e cor. Este passo não deve exceder 6-48 horas de modo a evitar que a superfície das azeitonas apresente rugas devido à desidratação (Gómez *et al.*, 2006). Depois de oxidadas, as azeitonas de mesa podem ser embaladas e comercializadas, sendo imersas em nova salmoura que poderá provocar ou não uma nova fermentação (Fernández *et al.*, 1997). De modo a melhorar a conservação do produto final, o produto pode ser pasteurizado ou acondicionado por adição de sorbato de potássio ou sorbato de sódio a 0,05% (expressos em ácido sórbico) (Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006).

#### 2.1.1.2. *Estilo Sevillano*

Neste tipo de preparação as azeitonas são colhidas verdes ou com uma tonalidade verde-amareladas. Após chegada à unidade fabril, são escolhidas e calibradas, sendo posteriormente mergulhadas numa solução com 2,0 a 5,0% de hidróxido de sódio (NaOH) com vista a remover quimicamente o amargor natural da azeitona. A concentração de NaOH adequada depende de vários fatores como a temperatura, cultivar e grau de maturação dos frutos aquando do momento da colheita (Fernández *et al.*, 1997). Este tratamento prolonga-se até que a solução de NaOH penetre cerca de dois terços ou três quartos da distância entre a pele e o caroço. As azeitonas são posteriormente lavadas várias vezes com água, por períodos de tempo variáveis, para remover o excesso de NaOH presente (de Castro & Brenes, 2001). Após lavagem, as azeitonas são colocadas em salmouras com uma concentração de NaCl de aproximadamente 10%, onde se inicia uma fermentação láctica (Gómez *et al.*, 2006). A duração da fermentação depende essencialmente das características do tratamento alcalino prévio, cultivar, temperatura e da população microbiana existente no meio.

Uma vez concluída a fermentação, as azeitonas são embaladas e acondicionadas na salmoura onde fermentaram, numa nova salmoura, ou numa mistura de ambas. De modo a estabilizar e preservar o produto final, a embalagem é pasteurizada (15 minutos a 62,4°C) (Sánchez *et al.*, 1989).

### 2.1.1.3. Estilo Californiano (pretas oxidadas)

Para este tipo de processamento o momento óptimo de colheita da azeitona não está definido, podendo-se incluir todos os frutos colhidos após a colheita das azeitonas destinadas ao processamento sevilhano e antes da colheita dos frutos destinados a processamento por fermentação natural (Fernández *et al.*, 1997), desde que possuam uma polpa rija.

Para produzir este tipo de azeitonas pretas oxidadas, os frutos podem ser sujeitos diretamente a processos de oxidação sem qualquer tipo de preservação. As azeitonas são sujeitas a 2 a 5 tratamentos com soluções de NaOH (1 a 2%). A concentração das soluções de NaOH pode variar de acordo com a maturação dos frutos, a cultivar e a temperatura do tratamento e da penetração e velocidade desejada (Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006). A penetração da soda na azeitona é controlada de modo que no primeiro tratamento, aquela passe através da pele do fruto. Nos tratamentos posteriores a penetração na polpa vai aumentando, até que se atinja o caroço no último tratamento (Fernández *et al.*, 1985). Entre cada tratamento, as azeitonas são suspensas em água intensamente arejada por ar injetado através de uma rede de tubos, de modo a oxidar uniformemente as azeitonas. Através de sucessivas suspensões em água com ar forçado a pele e polpa das azeitonas escurecem progressivamente devido à oxidação de *orto*-difenóis como o hidroxitirosol e o ácido cafeico (Brenes *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1992). Após o último tratamento, as azeitonas sofrem sucessivas lavagens para remover o excesso de NaOH e baixar o pH da polpa para valores próximos de 8 (Fernández *et al.*, 1985).

A coloração negra obtida nas azeitonas é instável e pode perder-se ao longo da vida de prateleira do produto acabado. Para evitar a descoloração apenas é permitido o uso de gluconato ferroso e de lactato ferroso (García *et al.*, 1986). Os sais ferrosos são adicionados à última água de lavagem numa concentração de 100 ppm em ião ferro. A difusão do ferro na polpa estará completa após 10 horas de contato, mas a etapa é prolongada e concluída após 24 horas de contato (Garcia *et al.*, 2001). A partir deste ponto as azeitonas são calibradas e embaladas em diferentes contentores e imersas em salmouras com cerca de 2 a 4% de NaCl e 10 a 40 ppm de ferro de forma a prevenir a deterioração da cor (Garrido *et al.*, 1995). Também podem ser adicionados sais de cálcio, de forma a melhorar a firmeza das azeitonas (García *et al.*, 1994; Romero *et al.*, 1995). Uma vez que

o produto final apresenta uma acidez baixa, a preservação deste tipo de azeitonas de mesa pode passar pela adição de ácidos, como ácido láctico ou ácido glucónico, aplicando-se também pasteurizações (Gómez *et al.*, 2006).

#### 2.1.1.4. Outros tipos de preparações

Na região de Trás-os-Montes existe um tipo de azeitonas de mesa tradicional, conhecido como “*alcaparras*”, que difere substancialmente na maneira como são fabricadas em relação aos três tipos já descritos. Estas são processadas a partir de azeitonas saudáveis verdes ou verde-amarelo, que são quebradas usando um martelo de madeira, sendo a polpa e o caroço separados. A polpa é cortada em duas partes aproximadamente iguais, perpendicularmente ao eixo maior do fruto, e colocada em água, a qual é mudada três ou quatro vezes numa semana. Este tratamento remove a amargura das azeitonas podendo assim serem consumidas (Sousa *et al.*, 2008).

### 2.1.2. Análise sensorial de azeitonas de mesa

Devido à importância económica das azeitonas de mesa e a necessidade de padronização do produto, o Conselho Oleícola Internacional (COI) estabeleceu uma forma de classificação comercial com base na análise sensorial através de painel treinado. Porém, essa prática ainda não se faz obrigatória, como para os azeites, devido à resistência dos produtores. As características avaliadas pelo painel de provadores são os atributos negativos (butírico, pútrido e sapateira) associados à fermentação anormal e (avinhado-avinagrado, mofo, ranço e etc.) relacionados à categoria de outros defeitos, atributos gustativos (salgado, amargo e ácido) e sensações cinestésicas (dureza, fibrosidade e crocância). O painel deve ser constituído por um grupo de 8-10 provadores e um líder que coordenará a sessão de provas. Os painelistas recebem uma folha de avaliação numeradas entre 1 (menor valor) e 11 (maior valor), correspondente à intensidade das sensações percebidas durante a prova (COI, 2011).

A classificação comercial da azeitona de mesa é feita de acordo com o defeito predominantemente percebido (DPP) e a mediana da sua intensidade. O líder do painel é o responsável pela realização dos cálculos que seguem a metodologia descritas pelo COI (2011) a fim de se chegar no valor esperado. Sendo assim, as azeitonas de mesa podem

ser classificadas como: extra (mediana  $1 < DPP \leq 3$ ), 1ª escolha ( $3 < DPP \leq 4,5$ ), 2ª escolha ( $4,5 < DPP \leq 7,0$ ) e azeitonas que não podem ser comercializadas como azeitonas de mesa (NC) ( $7 < DPP \leq 11$ ). As azeitonas que são destinadas ao processamento tecnológico, devem apresentar boas características de sanidade, para isso, os cuidados durante a colheita, armazenamento e transporte devem ser respeitados, bem como as boas práticas de fabrico de forma a evitar o aparecimento de “defeitos” organoléticos, os referidos atributos negativos, no produto final, que segundo o COI (2011), são:

**(i) Fermentação Anormal:** Sensação olfativa percebida direta ou retronasal, característica de fermentações anormais. Podendo ser:

- Butírico: sensação reminiscência de manteiga ou queijo.

- Pútrido: sensação que lembra o odor de decomposição matéria orgânica.

- Sapateira: sensação provocada pela combinação volátil de ácidos gordos que lembra couro podre.

**(ii) Mofo:** sensação olfato-gustativa percebida direta ou retronasal, característica de azeitonas atacadas por fungos.

**(iii) Ranço:** sensação olfativa percebida direta ou retronasal, característica de azeitonas que tenham sido submetidos a um processo de ranço.

**(iv) Cozido:** sensação olfativa percebida direta ou retronasal, característica de azeitonas que tenham sido submetidos a aquecimento excessivo em termos de temperatura e/ou a duração durante a pasteurização ou esterilização.

**(v) Sabão:** sensação olfato-gustativa que lembra o sabão.

**(vi) Metálico:** sensação olfato gustativa que lembra os metais.

**(vii) Terra:** sensação olfato-gustativa que lembra solo ou poeira.

**(viii) Avinhado-avinagrado:** sensação olfato-gustativa que lembra o vinho ou vinagre.

É importante salientar que determinados atributos negativos podem estar associados ao tipo de processamento tecnológico empregado. Como por exemplo o sabão, que pode ser originado pela adição de hidróxido de sódio durante o processo ou então o

cozido, que pode estar relacionado ao tratamento térmico empregado principalmente nas azeitonas pretas oxidadas. Já o ranço pode ser encontrado em azeitonas desidratadas. O avinhado-avinagrado está relacionado à variedade, sendo característico da cultivar Galega. A presença de tais atributos negativos (associados à categoria outros defeitos) no produto é permitida em baixas intensidades por serem relacionados ao processo ou proveniente da cultivar.

## 2.2. Língua eletrónica

A Língua Eletrónica (LE) é um sistema de multi-sensores não específicos e de baixa seletividade, ou seja, constituído por sensores químicos com resposta reprodutível, de elevada estabilidade e sensibilidade cruzada a diferentes espécies em solução e que, por isso, fornecem perfis de sinais que traduzem a informação global sobre as amostras (i.e., uma “impressão digital” das amostras). No processamento dos perfis de sinais recorre-se em geral a métodos estatísticos multivariados, que podem ser qualitativos (classificação e discriminação de amostras) ou quantitativos (Vlasov *et al.*, 2005).

O sistema de multi-sensores de uma LE pretende mimetizar o funcionamento da língua humana. Quando a LE é imersa num líquido obtém-se um padrão de sinais eletroquímicos 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 (Vlasov *et al.*, 2005; Toko, 2000).

Nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, a análise sensorial geralmente é realizada por painelistas treinados de acordo com regulamentos oficiais estabelecidos por entidades internacionais reconhecidas. 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, nomeadamente o doce, o ácido, o amargo, o salgado e o umami (Escuter-Gilbert *et al.*, 2010; Toko, 1998a; Toko, 1998b). No entanto, as avaliações organolépticas resultantes do painel de provadores, mesmo treinado, podem apresentar subjetividade e falta de reprodutibilidade, por vezes devido ao cansaço e *stress* dos painelistas. O possível uso de sensores gustativos ou LE podem contribuir para melhorar esta situação. São

sistemas com merecido interesse pois permitem adquirir informação global sobre amostras complexas que não é possível com outras metodologias analíticas, principalmente mimetizar a língua humana na apreciação de sabores. Esta informação varia de acordo com as características da LE usada (Ha *et al.*, 2015).

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 (Escuter-Gilabert *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2009; Vlasov *et al.*, 2005).

### **2.2.1. Métodos eletroquímicos**

As LEs funcionam de acordo com diferentes métodos eletroquímicos: potenciométrico (Toko, 2000; Legin *et al.*, 2003), voltamétrico (Heyden *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2013), amperométrico (Burattia *et al.*, 2004) e impedância eletroquímica (Ulloa *et al.*, 2013), 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 eletroativo. O método potenciométrico baseia-se na medição do potencial de uma célula na ausência de corrente, sendo proporcional ao logaritmo da concentração da substância a determinar (Escuter-Gilabert *et al.*, 2010; Scholz, 2010; Wang, 2006). No trabalho em questão, a LE utilizada baseia-se no método potenciométrico, com 40 sensores de membranas lipo/poliméricas de sensibilidade cruzada.

A célula analítica típica potenciométrica possui dois elétrodos imersos numa solução contendo a substância a analisar, cuja concentração é para ser medida. O elétrodo de referência (ER) possui uma constante contribuição para o sinal, de forma independente da matriz de solução. Normalmente contém um elétrodo de metal em contato com um sal insolúvel do mesmo metal (segundo tipo de elétrodo) e o seu potencial só depende da solubilidade do sal. O ER mais utilizado é a prata / cloreto de prata (Ag / AgCl). O segundo é o elétrodo indicador (EI) que contém uma membrana sensível ao composto a ser analisado, assim, o seu potencial depende da concentração do composto. O analito da

solução amostra entra no eletrodo de membrana causando uma mudança no potencial da mesma devido à modificação das propriedades eletroquímicas. Um potenciômetro de impedância elevada é utilizado para medir o potencial entre os dois eletrodos. Estes dois eletrodos são usados separadamente ou combinados em um único corpo. Os EIs mais comuns são sensíveis à atividade de íões e não à concentração destes (Scholz, 2010).

Em eletrodos de baixa seletividade, montados como conjuntos de sensores, várias membranas podem ser usadas como sensores potenciométricos, nomeadamente vidros calcogenetos e membranas lipídicas poliméricas (Vlasov *et al.*, 2005). Estas matrizes constituem ferramentas analíticas cuja capacidade de desempenho depende dos eletrodos selecionados mas também da finalidade prática. Análise qualitativa, semi- quantitativa e quantitativa são possíveis usando técnicas quimiométricas avançadas.

### **2.2.2. Sensores químicos**

O tipo de sensores usados nas LEs depende do princípio de detecção utilizado nas mesmas. Vários tipos de sensores têm sido usados, podendo os sistemas de multi-sensores conterem uma só família de sensores químicos ou misturas de vários tipos, como por exemplo: sensores de vidro de calcogenetos (Legin *et al.*, 2003; Rudnitskaya *et al.*, 2009), membranas poliméricas lipídicas de sensibilidade cruzada (Legin *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2008; Eckerta *et al.*, 2011) e membranas seletivas a íões (Legin *et al.*, 2003; Gallardo *et al.*, 2005;). Alguns destes tipos de sensores são seletivos, sendo usados na LE por permitirem uma diferenciação de amostras por meio de parâmetros químicos específicos. No entanto, o critério de seleção de um sensor para um sistema de multi-sensores que se pretende usar como LE é ter baixa seletividade e alta sensibilidade cruzada. Esta característica consiste na capacidade de um sensor responder a um número diferente de espécies em solução e, num sistema de multi-sensores, implica que diferentes sensores vão produzir sinais diferentes para a mesma matriz, que constituem um perfil de sinais tipo “espectro” da amostra. O perfil de sinais corresponde a uma impressão digital de multicomponentes da amostra, permitindo o uso de ferramentas multivariadas de estatística para análise qualitativa e quantitativa. As características de uma LE dependem quer dos materiais usados (composição) na preparação dos sensores, quer dos sensores usados na preparação do multi-sistema, sendo definidas pelos mesmos parâmetros que para um sensor discreto (seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, etc). Na

análise qualitativa, os trabalhos incidem no reconhecimento ou identificação de soluções ou amostras (Dias, 2013).

O número de sensores num sistema de multi-sensores depende do trabalho que se pretende efetuar. Os sistemas com um elevado número de sensores permitem um maior conjunto de aplicações porque, quer na classificação de amostras, quer na análise quantitativa de componentes em amostras, usando técnicas de seleção de variáveis acoplados às metodologias de análise estatística multivariada, possibilitam, selecionar os sensores mais adequados para o trabalho em curso (Alberto, 2014).

### **2.2.3. Processamento de sinais**

O processamento dos sinais pode ser efetuado usando métodos estatísticos multivariados não supervisionados ou supervisionados.

#### *2.2.3.1. Métodos não supervisionados*

Nos métodos não supervisionados estuda-se a variabilidade natural existente nas amostras analisadas com o objetivo de procurar algum padrão ou estrutura entre as amostras do mesmo tipo. São métodos exploratórios, sem qualquer controlo do investigador, que permitem identificar possíveis amostras estranhas e agrupamentos. A metodologia mais usada é a análise de componentes principais (ACP) (Dias *et al.*, 2008; Escuder-Gilabert *et al.*, 2010). A 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 (Maroco, 2003).

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 de variáveis 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 (Maroco, 2003). A ACP pode também ser usada, por exemplo, na identificação de possíveis extremos (i.e., "outliers") e na identificação de grupos de indivíduos (clusters). 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 (Maroco, 2003).

#### 2.2.3.2. Métodos supervisionados

Na aplicação dos métodos supervisionados é necessário fornecer informação inicial sobre as amostras agrupando-as em grupos pré-definidos para que seja possível estabelecer modelos de classificação (análise qualitativa) e fornecendo níveis de concentração para estabelecer modelo de calibração (análise quantitativa) com os sinais da LE. Dentro desta categoria, as metodologias mais usadas para classificação são os métodos análise discriminante linear (ADL), o método de análise de discriminante por mínimos quadrados parciais (MQP-AD) e redes neurais artificiais (RNA); para a análise quantitativa, os mais aplicados são a regressão linear múltipla (RLM) e o método dos mínimos quadrados parciais (MQP) (Escuder-Gilabert *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2011).

A ADL e RLM são técnicas multivariadas supervisionadas que visam a obtenção de modelos matemáticos lineares das variáveis independentes (sinais dos sensores) que melhor separem os diferentes grupos (variável dependente) em que se pretendem classificar as amostras ou quantifiquem o parâmetro físico-químico da amostra (variável dependente), respetivamente. A aplicação de tais metodologias implica a execução de 2 passos: a seleção das variáveis independentes (sensores) para obter o melhor modelo; e depois, o estudo da robustez do modelo selecionado associado à classificação ou quantificação das amostras. Estes passos têm como objetivo definir as características que distinguem as amostras de um grupo de outro, de modo que se possa prever a que grupo pertence uma nova amostra. Ao nível dos pressupostos de aplicação desta técnica, é importante verificar se há presença de *outliers*, normalidade nas variáveis, homogeneidade das matrizes de variância-covariância nos grupos e diferenças significativas entre os grupos. Mas, globalmente, a validação do modelo ADL é efetuada testando a sua capacidade de previsão pois, mesmo que um ou dois dos pressupostos não sejam observados, se for robusto, um modelo pode ser usado na previsão do grupo onde se inserem novas amostras (McGarigal *et al.*, 2000). O estudo da previsão, quando o número de amostras de cada grupo de classificação não é muito elevado, baseia-se principalmente nos resultados de classificação correta obtidos com a validação cruzada

(VC) usando a técnica “deixar um de fora” (LOO, *leave-one-out*). Avaliando o desempenho do modelo na previsão ao remover uma amostra do estudo (contém  $n$  amostras) e prevendo a sua classificação com o modelo ADL obtido com as restantes ( $n-1$ ). Este processo é repetido  $n$  vezes, de forma a obterem-se os erros de classificação de todas as amostras, sendo o erro global a soma dos erros de cada teste dividido por  $n$ . Na análise quantitativa usando RLM, a capacidade de previsão do modelo é verificada usando também a validação cruzada LOO. Os resultados da previsão quantitativa são avaliados por comparação com os dados esperados de cada amostra que são os experimentais. A comparação é visualizada numa relação linear entre os valores previstos e os valores esperados, cujo declive e ordenada na origem se esperam ter valores um e zero, respetivamente (Dias, 2013).

Na seleção de variáveis (redução) podem-se aplicar vários métodos que se diferenciam na forma como selecionam e testam as variáveis. As metodologias clássicas, presentes na maior parte dos programas de estatísticas comerciais, são chamados de métodos heurísticos (métodos de seleção de um subconjunto de variáveis) incluídos na classe chamada *greedy*, porque são métodos que fazem uma escolha no momento, mas, mais tarde, não verificam se foi uma boa opção (Graham, 2001). Como exemplo, temos os métodos de seleção sequencial para a frente (*sequential forward selection method*), de seleção sequencial por eliminação posterior (*sequential backward elimination method*) e seleção por etapas (*stepwise method*). Estes métodos são importantes quando no estudo existem poucas variáveis e se pretende ordenar as variáveis selecionadas em termos da sua importância. No caso das LE, onde se utilizam um grande número de sensores, tem-se multi-colinearidade, por isso, os métodos heurísticos nem sempre escolhem o melhor conjunto de variáveis independentes. Nesta situação, os métodos de seleção de variáveis meta-heurísticos permitem obter o melhor subconjunto de variáveis que correspondem a um ótimo global para um dado critério de aproximação a uma determinada função, num grande espaço de busca de outros subconjuntos de variáveis. Dois exemplos destes métodos são o algoritmo genético e o algoritmo arrefecimento simulado (AS). No AS, a melhor solução é obtida num espaço selecionado aleatoriamente na vizinhança da solução corrente e testada segundo as regras de um processo de arrefecimento simulado, uma técnica que consiste em aquecer uma substância até à sua fusão seguida, de uma lenta diminuição da temperatura para que, a substância possa atingir a configuração mais regular possível (livre de defeitos) da sua malha cristalina (estado cristalino de energia

mínimo). O método meta-heurístico de seleção de variáveis permite ter modelos com menor número de variáveis (elimina variáveis irrelevantes ou que contribuem da mesma forma para o estudo), aumentando a robustez e exatidão de previsão. O modelo será mais simples, mais fácil de interpretar e, por se conhecerem as variáveis corretas, mais rápido nos cálculos, permitindo melhores resultados de previsão (Graham, 2001).

#### **2.2.4. Aplicações**

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 demorados e são inadequados, em geral, para monitorização *in-situ*. As LEs têm sido descritas como possíveis alternativas a estes métodos apresentando várias vantagens como fácil utilização, baixo custo, muito promissoras na avaliação da qualidade dos alimentos, especialmente em situações onde é necessário resultado rápido (Escuder-Gilabert *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2009; Vlasov *et al.*, 2005).

Na área alimentar, as LEs potenciométricas têm sido usadas em análise qualitativa, semi-quantitativa e quantitativa, por exemplo, na distinção de bebidas (Toko, 2000; Dias *et al.*, 2011), classificação de vinhos (Legin *et al.*, 2003), identificação de adulterações no leite (Dias *et al.*, 2009), quantificação de sabores e alguns compostos (Legin *et al.*, 2000; Toko, 2000), classificação de cervejas (Ciosek *et al.*, 2006), discriminação do mel em diferentes grupos de méis florais (Dias *et al.*, 2013), análise semi-quantitativa de sumos e quantitativa de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais (Sequeira, 2012). Para além das LE potenciométricas, na literatura podem encontrar estudos realizados com LE voltamétricas, que permitem também identificar adulterações no vinho, monitorizar processos de lavagem no processamento do leite e distinguir as diferentes origens do leite (Winquist *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2006), entre outras aplicações.

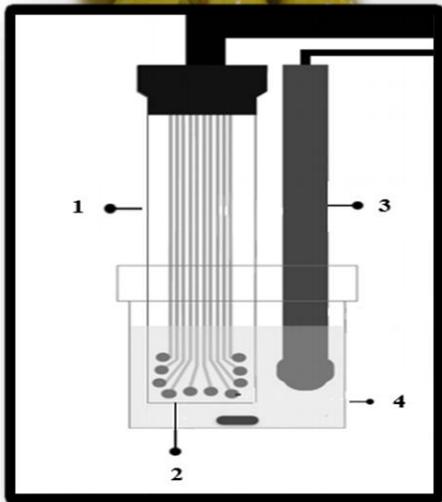
No que diz respeito à área oleícola, estudos vem obtendo resultados promissores. Veloso e colaboradores (2016) estudaram a capacidade de uma LE com membranas lipo/poliméricas de sensibilidade cruzada para classificar azeites de acordo com a sua intensidade da percepção frutado, amargor e pungência. Estes atributos são geralmente

avaliados por um painel de provadores, sendo comercializados como intenso, médio ou light, de acordo com a intensidade. Os autores concluíram que a LE permitiu classificar corretamente 91% dos azeites de acordo com seu grau sensorial intensidade. Já Dias e colaboradores (2016a) utilizaram da mesma ferramenta para discriminar oito amostras de azeites extra virgem monovarietal, tratando os dados a partir do método de análise de discriminante linear com seleção de algoritmo de arrefecimento simulado; os autores obtiveram a classificação dos azeites com 100% de acerto.

### **2.3. Perspetivas do trabalho proposto**

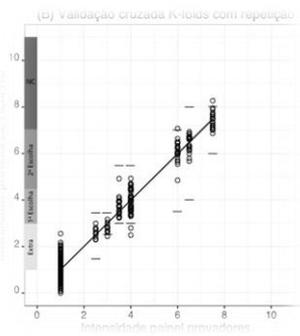
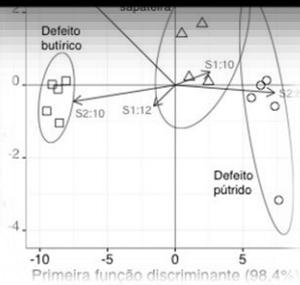
O levantamento bibliográfico realizado não permitiu encontrar qualquer referência de aplicação de LEs na avaliação e/ou monitorização da qualidade de azeitonas de mesa ou na classificação das mesmas de acordo com categorias comerciais. Também não foi possível encontrar qualquer trabalho relativo à identificação dos principais defeitos sensoriais avaliados em azeitonas de mesa.

Este facto realça a novidade do trabalho proposto, cujo esperado sucesso poderá contribuir para a confirmação das LEs como ferramentas úteis na análise de produtos da fileira da azeitona.



# Capítulo 3.

## Materials e Métodos





### **3.1. Amostras de azeitonas de mesa**

Quarenta e quatro amostras comerciais de azeitonas de mesa de diferentes marcas (18 marcas) foram adquiridas em supermercados locais em Bragança (Portugal) e Zamora (Espanha), sendo, de acordo com a informação disponibilizada no rótulo, 36 obtidas por fermentação natural (aromatizadas ou não), 6 de estilo espanhol (aromatizadas ou não), 1 estilo californiano (não aromatizado) e 1 aromatizada de estilos variados (fermentação natural, estilo espanhol e estilo californiano). No total as azeitonas usadas na produção das azeitonas de mesa eram 7 cultivares portuguesas e espanholas, incluindo Cobrançosa, Empeltre, Hojiblanca, Galega, Gordal, Manzanilla e Negrinha de Freixo. As amostras foram armazenadas nas embalagens originais, ao abrigo de luz e à temperatura ambiente (~ 20 °C) até análise, e depois de abertas no frigorífico a 4 °C, tendo sido todas as amostras analisadas dentro do prazo de validade.

### **3.2. Análise organolética de azeitonas de mesa (painel de provadores)**

O painel de provadores (em formação), constituído por 8 membros, foi selecionado de entre um conjunto inicial de 12 voluntários que estudam ou trabalham na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. Os 8 membros selecionados são de ambos os sexos e as suas idades variam entre os 22 e 56 anos. O treino do painel de provadores seguiu as diretrizes da norma COI/MO No.1/Ver.2 de novembro de 2011 do Conselho Oleícola Internacional (COI, 2011), sendo realizadas duas sessões de treino semanais, cada uma com 1 hora de duração. Tal como referido, os provadores iniciais (12) foram sujeitos a um processo de seleção, em que na fase de pré-seleção tiveram de demonstrar o interesse e disponibilidade, garantir que se encontram em bom estado de saúde e não são alérgicos aos alimentos a provar, bem como demonstrar capacidade ao cheiro, estabilidade emocional e facilidade de comunicação. A fase de seleção do painel não tem como objetivo avaliar o rigor das respostas, mas selecionar um número mínimo de provadores (8) que se afigurem os mais indicados para uma fase posterior de treino. O treino tem por objetivos, ampliar a memória sensorial; assegurar a sensibilidade dos resultados; obter reprodutibilidade dos resultados; familiarizar-se com o vocabulário específico; e memorizar as texturas, sabores, cheiros e aromas característicos (*Codex Alimentarius*, 1987; COI, 2004). Como mencionado, no âmbito

deste estudo foram selecionados oito provadores, o mínimo recomendado pelo COI (2011).

A formação do painel de provadores prosseguiu em três etapas. Primeiro: introdução ao assunto, definições, identificação dos defeitos e escala de classificação. Segundo: avaliação dos atributos negativos, gustativos e cinestésicos, utilizando padrões estabelecidos pelo COI (2011). Terceiro: avaliação de diferentes amostras de azeitona de mesa a partir de diferentes processos tecnológicos, com presença ou ausência de defeitos sensoriais, preparados a partir de diferentes cultivares e de regiões distintas nacionais e internacionais.

A classificação comercial das azeitonas de mesa é feita a partir da mediana da intensidade dos atributos negativos no produto de acordo com o defeito predominantemente percebido (DPP), na análise simultânea de azeitonas e das repetivas salmouras. Para efeitos de classificação, o líder do painel deve tomar apenas em consideração a mediana do defeito percebido com maior intensidade que esteja em conformidade com os requisitos especificados na seção anterior. As amostras devem, então, ser classificadas como segue de acordo com a intensidade: Extra:  $DPP \leq 3$ ; 1ª escolha:  $3 < DPP \leq 4,5$ ; 2ª escolha:  $4,5 < DPP \leq 7,0$ ; Azeitonas que não podem ser comercializadas como azeitonas de mesa (NC):  $DPP > 7,0$ . Para calcular os resultados utiliza-se o programa (CALC-ENG V08 01-06-14 COI) fornecido pelo COI (2011). Neste estudo foi ainda proposta uma nova categoria de classificação, extra sem defeito, que engloba as amostras de azeitonas de mesa para as quais nenhum provador detetou qualquer defeito sensorial, quer na azeitona quer na respetiva salmoura.

A preparação das amostras (azeitonas e salmouras) para avaliação pelo painel de provadores seguiu as recomendações do COI (2011). Em anexo (Anexo A) encontra-se uma cópia da folha de prova (COI, 2011) usada no âmbito deste trabalho e na qual cada um dos membros do painel de provadores devia registar para cada defeito percebido, após a prova de cada amostra, a sua intensidade do atributo numa escala de 1 (atributo não detetado) a 11.

### 3.3. Desempenho da LE nos atributos gustativos

O potencial da LE para identificação dos sabores básicos, nomeadamente ácido, amargo e salgado foi avaliado utilizando 2 soluções padrão para cada sabor, cada uma com 9 níveis de concentrações ( $2 \times 3 \times 9$ ). O sabor ácido foi mimetizado usando o ácido cítrico (Fisher Scientific, p.a.) e o ácido (L+)–tartárico (Panreac, p.a.). Para o sabor amargo foram utilizadas soluções padrão de cafeína (Panreac, p.a.) e quinino anidro (Fluka, pureza  $\geq 98\%$ ). Para o sabor básico salgado utilizaram-se soluções de cloreto de sódio e cloreto de potássio (Panreac, p.a.). Estas soluções padrão foram preparadas utilizando água mineral comercial (pH  $5,8 \pm 0,2$ ; mineralização total de  $48 \pm 7$  mg/L), visando simular as soluções reais usadas na avaliação sensorial pelo painel de provadores (para o qual a água deionizada ou destilada não pode ser usada). Para cada ensaio eletroquímico foram utilizados 20 mL de solução padrão. A Tabela 1 apresenta as concentrações utilizadas neste estudo, cujas gamas e componentes químicos foram estabelecidos de acordo com Meilgaard *et al.* (2007).

**Tabela 1.** Concentração das soluções padrão (g/L) utilizadas na avaliação da capacidade da LE na identificação de sabores básicos, nomeadamente dos atributos gustativos usualmente avaliados nas provas sensoriais de azeitonas de mesa (ácido, amargo e salgado).

Concentrações das soluções padrão preparadas em água mineral (g/L)					
Sabor ácido		Sabor amargo		Sabor salgado	
Ácido Cítrico	Ácido Tartárico	Quinino anidro	Cafeína	Cloreto de potássio	Cloreto de sódio
2	0,5	0,1	3	25	15
1,75	0,45	0,09	2,6	22,5	12,5
1,5	0,4	0,08	2,25	20	10
1,25	0,3	0,07	1,75	17,5	7,5
1	0,25	0,06	1,3	15	5
0,75	0,2	0,05	0,95	12,5	3,5
0,5	0,1	0,04	0,6	10	2
0,25	0,05	0,02	0,3	5	1
0,125	0,01	0,01	0,15	2	0,5

### **3.4. Desempenho da LE na avaliação de defeitos organoléticos**

A capacidade da LE para discriminar defeitos organoléticos atribuídos à fermentação anormal (butírico, pútrido e sapateira) ou outros defeitos sensoriais (como avinhado-avinagrado e mofo), foi avaliada utilizando: (i) soluções padrão que mimetizam atributos negativos presentes em azeitonas de mesa (compostos químicos referidos no regulamento oficial do COI (2011): ácido n-butírico, 2-mercaptoetanol e ácido ciclohexanocarboxílico que mimetizam os defeitos butírico, pútrido e sapateira); (ii) amostras de azeitona de mesa e de salmoura, para as quais um defeito único intenso (DPP >8) foi identificado pelo painel de provadores; e (iii) amostras comerciais de azeitonas de mesa e respectivas salmouras.

#### **3.4.1. Soluções padrão que mimetizam defeitos sensoriais**

Tal como referido na norma do COI (2011) utilizaram-se as soluções padrão recomendadas (composto químico e gama de concentrações) para mimetizar os defeitos sensoriais habituais detetados em azeitonas de mesa (azeitonas e salmouras), devido à fermentação anormal: butírico, pútrido e sapateira. De acordo com o regulamento referido, e como indicado na Tabela 2, o defeito pútrido foi mimetizado utilizando soluções aquosas de 2-mercaptoetanol (Acros Organics, pureza = 99%), o atributo negativo butírico foi mimetizado usando soluções aquosas do ácido n-butírico (Acros Organics, pureza >99%) e, finalmente, o defeito sapateira foi simulado utilizando soluções aquosas do ácido ciclohexanocarboxílico (Acros Organics, pureza >98%). Embora para formação do painel de provadores estabelecido pelo COI (2011), a avaliação de cada defeito organolético deva ser feita a 2 níveis de concentração, que correspondem a duas intensidades sensoriais pré-estabelecidas (Tabela 2), neste trabalho foram utilizadas 5 concentrações de cada solução padrão, que incluem a gama de concentrações recomendada pelo COI (2011): 0,05 a 2 g/L para o 2-mercaptoetanol; 0,25 a 2 g/L para o ácido n-butírico; e 0,075 a 2 g/L para o ácido ciclohexanocarboxílico. Todas as soluções padrão foram preparadas utilizando água mineral comercial, com o objetivo de simular as condições de prova do painel de provadores. Para a análise eletroquímica foram utilizados 20 ml de cada solução padrão.

**Tabela 2.** Soluções padrão que mimetizam atributos negativos (associados à fermentação anormal) (COI, 2011): atributo mimetizado, composto químico, gama de concentrações e gama de intensidades organoléticas percebidas.

Classe	Atributos	Compostos padrão (Fórmula química)	Concentração (g/L)	Intensidade (1 a 11 escala)
Atributos negativos associados à fermentação anormal	Butírico	Ácido n-butírico (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> )	0,5 e 1.0	3,5 e 7
	Pútrido	2- Mercaptoetanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	0,1 e 1.0	2,5 e 8
	Sapateira	Ácido ciclohexanocarboxílico (C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> CO <sub>2</sub> H)	0,15 e 1,0	4 e 9

### 3.4.2. Amostras referência de azeitona de mesa e salmoura com um único defeito sensorial

O desempenho da LE na discriminação de defeitos sensoriais típicos de azeitonas de mesa também foi avaliado usando, como mencionado anteriormente, as amostras selecionadas de azeitonas de mesa (e as respectivas soluções de salmoura), para as quais apenas um defeito intenso foi identificado pelo painel de provadores ( $DPP \geq 8$ , numa escala de 11 graus de intensidade). Convém referir que estas amostras só foram usadas para esta finalidade. Assim sendo o painel de provadores conseguiu selecionar 3 amostras de azeitonas de mesa contendo um único defeito organolético muito intenso, dois deles relacionados com a fermentação anormal (butírico ou sapateira) e o terceiro da categoria de outros defeitos (avinhado-avinagrado), de acordo com a classificação estabelecida pelo COI (2011). Em relação às salmouras, o painel de provadores conseguiu selecionar 5 amostras com um único defeito muito intenso: butírico, pútrido, sapateira, avinhado-avinagrado e mofo (os 3 primeiros relacionados com a fermentação anormal e os 2 últimos pertencentes à categoria de outros defeitos).

Para os ensaios na LE as amostras de azeitona de mesa foram inicialmente descaroçadas e depois trituradas utilizando uma trituradora de facas (Moulinex®), obtendo-se uma pasta de grão fino. Antes da análise eletroquímica, cada pasta foi diluída com água mineral comercial, resultando em 5 diferentes proporções: 9 gramas de pasta de azeitona de mesa e 6 mL de água mineral até 5 gramas de pasta de azeitona de mesa e 10 mL de água mineral.

Em relação às 5 amostras de salmoura com diferentes defeitos sensoriais, foi analisada a salmoura sem diluição (20 mL) e mais 4 sub-amostras obtidas por diluição com água mineral: desde 16 mL de salmoura e 4 mL de mineral de água até 4 mL de salmoura e 16 mL de água mineral, com o intuito de obter soluções (volume total 20 mL) com 5 intensidades para cada defeito analisado.

### **3.4.3. Amostras comerciais de Azeitonas de mesa**

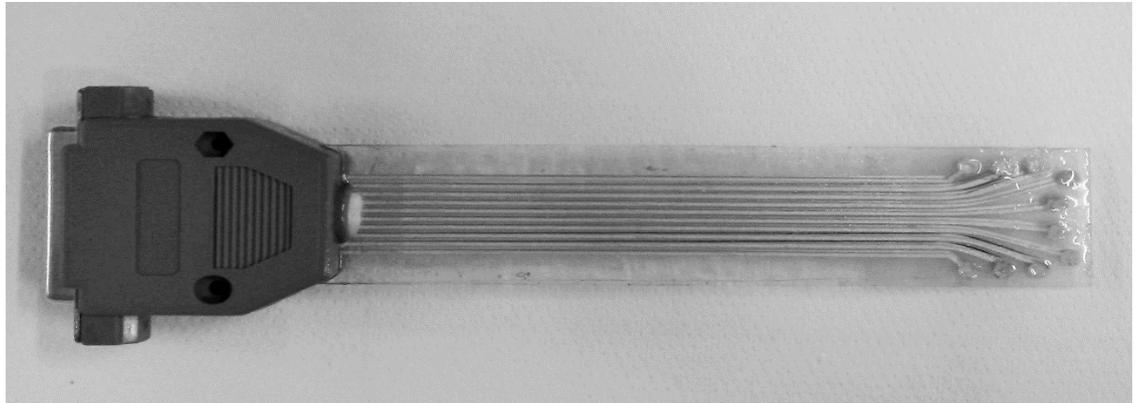
Analisaram-se 44 amostras de azeitonas de mesa de diferentes marcas obtidas recorrendo a 3 tipos de processamento tecnológico e de diferentes cultivares de azeitonas. As amostras de azeitona de mesa foram adquiridas em supermercados da região de Bragança (Portugal) e de Zamora (Espanha). Para realizar a análise com a LE, as azeitonas foram previamente descaroçadas e trituradas com um triturador de facas Moulinex®, o que permitiu obter uma pasta de grão fino, a qual foi diluída na proporção de 9 gramas de pasta para 6 mL de água mineral. Para as salmouras, recolheram-se 20 mL de cada amostra, que foram analisados sem qualquer tipo de pré-tratamento.

## **3.5. Língua Eletrónica**

### **3.5.1. Sistema de multi-sensores**

O sistema de multi-sensores é constituído por uma placa de cloreto de polivinilo (PVC) (9,5 cm de altura e 2,5 cm de largura) por impressão, nas duas faces da placa, de um circuito usando o método *print-screen*, onde aplica-se uma pasta epoxilica condutora de prata (EPO-TK E4110, Epoxy Technology, Inc.) de cura a baixas temperaturas, preparada por mistura de dois reagentes (pasta + endurecedor). Em cada face do sistema é possível aplicar 10 sensores químicos (em poços com 3,6 mm de diâmetro 0,3 mm de profundidade), ou seja, cada sistema permite monitorizar o sinal de 20 sensores. O processo de cura foi realizado a 40 °C, permitindo a secagem da pasta em 8 horas. Após corte e limpeza do circuito impresso, vedaram-se os pontos de colocação do sensor químico e de ligação à ficha RS-232, para posterior impermeabilização do sistema, usando como revestimento uma resina acrílica (PLASTIK 70, Kontakt Chemie) aplicada por pulverização. A fase final consistiu na colocação da ficha RS-232 de 25 pinos no sistema, envolvendo a sua fixação e ligação ao circuito impresso (Figura 1). Cada sistema

foi testado com um multivoltímetro para confirmar se todas as ligações permitiam a condução de sinal elétrico.



**Figura 1:** Sistema de multi-sensores

### **3.5.2. Sensores químicos**

Os sensores químicos usados correspondem a diferentes membranas de sensibilidade cruzada, preparadas com combinações de diferentes aditivos lipídicos (entre 2,8 e 3,2%) e plastificantes (entre 64,7 e 65,2%). O polímero usado foi o PVC (entre 31,9 e 32,3%) da Fluka. Usaram-se 4 substâncias aditivas: octadecilamina, álcool olefílico, cloreto de metiltrioctilamônio e ácido oleico (todos Fluka, p.a.). As 5 substâncias plastificantes usadas foram: adipato de bis(1-butilpentilo), sebacato de dibutilo, 2-nitrofeniloctil éter, fosfato de 2-etil-hexilo e fosfonato de dioctilfenilo (todos da Fluka, p.a.) como apresentado na Tabela 3.

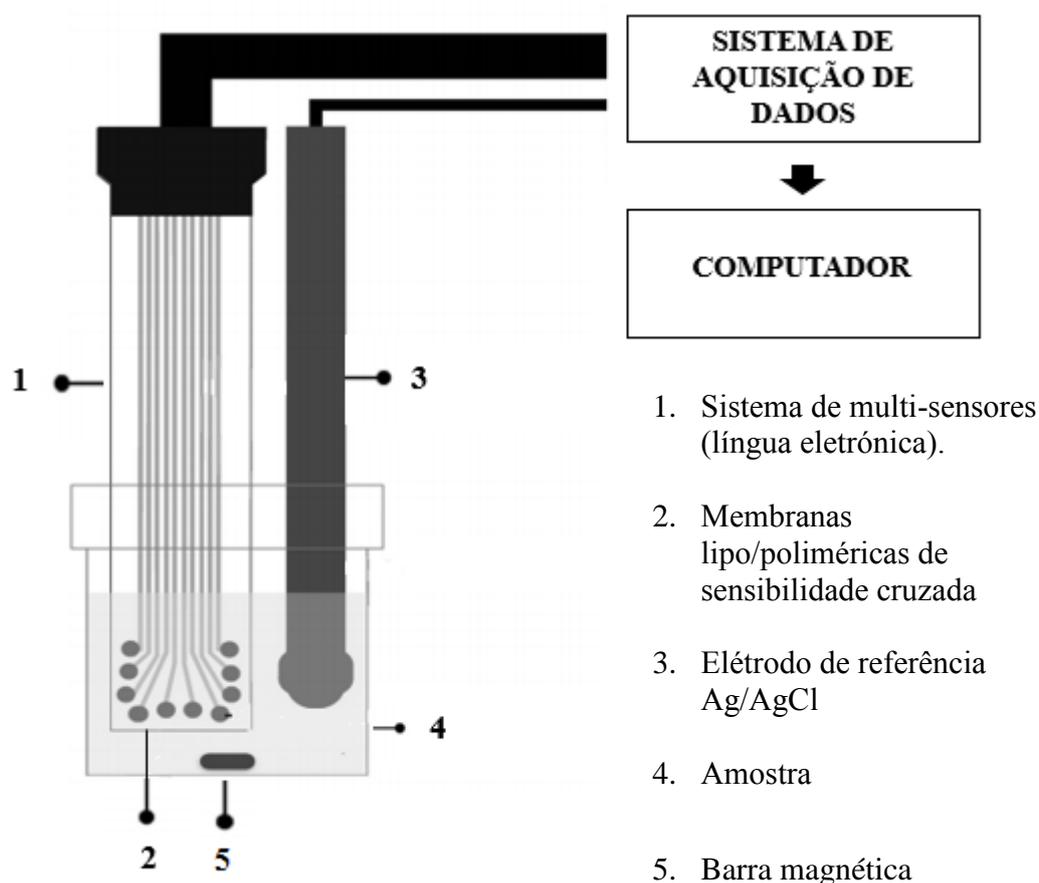
**Tabela 3.** Detalhes dos sensores da LE (código de identificação; componentes dos pares de plastificantes e aditivos usados na preparação de cada membrana lipo / polimérica).

Nº		Plastificante	Aditivo
S1:1	S2:1	2-nitrofeniloctil éter	Octadecilamina
S1:2	S2:2		Álcool Oleílico
S1:3	S2:3		Cloreto de metiltrioctilamónio
S1:4	S2:4		Ácido Oleico
S1:5	S2:5	Fosfanato de dioctilfenilo	Octadecilamina
S1:6	S2:6		Álcool Oleílico
S1:7	S2:7		Cloreto de metiltrioctilamónio
S1:8	S2:8		Ácido Oleico
S1:9	S2:9	Adipato de bis(1- butilpentilo )	Octadecilamina
S1:10	S2:10		Álcool Oleílico
S1:11	S2:11		Cloreto de metiltrioctilamónio
S1:12	S2:12		Ácido Oleico
S1:13	S2:13	Sebacato de dibutilo	Octadecilamina
S1:14	S2:14		Álcool Oleílico
S1:15	S2:15		Cloreto de metiltrioctilamónio
S1:16	S2:16		Ácido Oleico
S1:17	S2:17	Fosfato de 2-etil-hexilo	Octadecilamina
S1:18	S2:18		Álcool Oleílico
S1:19	S2:19		Cloreto de metiltrioctilamónio
S1:20	S2:20		Ácido Oleico

Cada mistura foi preparada por pesagem de massas pré-estabelecidas de cada um dos três produtos e dissolvidos com tetrahidrofurano (Sigma, p.a.) de forma a obter-se uma solução homogénea e viscosa. A formação de cada membrana no sistema de multi-sensores foi efetuada usando a técnica de gota-a-gota (adições de uma gota a intervalos de tempo de 3-5 minutos para permitir a evaporação completa do solvente antes da nova adição) até à formação de uma membrana polimérica transparente e de aparência cristalina.

### 3.5.3. Equipamento

A LE utilizada neste trabalho é um sistema analítico constituído por eléctrodos potenciométricos “tudo-estado-sólido”, o que lhe confere robustez na sua utilização. É um dispositivo constituído por dois sistemas de multi-sensores, iguais na sua constituição ao nível dos sensores químicos, e um eléctrodo de referência Ag/AgCl de dupla junção. Cada sistema de sensores químicos é ligado a um datalogger (Agilent 34970). A aquisição do sinal de cada membrana foi efetuada através de um computador usando o software “Agilent BenchLink Data Logger”. As análises foram efetuadas em soluções sob agitação magnética (VELP Scientifica, modelo ARE Heating magnetic stirrer). A Figura 2 apresenta o esquema de montagem utilizada nas análises eletroquímicas com a LE.



**Figura 2:** Montagem para a análise com a língua eletrônica (adaptado de Veloso *et al.*, 2016).

### 3.5.4. Análise com a língua eletrônica

As análises com a LE requerem apenas uma lavagem cuidadosa do sistema analítico com água deionizada e enxugamento leve com papel absorvente, entre ensaios.

O sistema permite a monitorização contínua dos sinais dos sensores, pelo que é possível inspecionar visualmente a variação do sinal em função do tempo para cada uma das 40 membranas poliméricas incluídas na LE. Cada análise envolvia um período de estabilização do sinal de 5 minutos, com agitação magnética (líquidos), sendo a LE removida da solução durante a preparação do novo ensaio. Todas as experiências foram efetuadas à temperatura ambiente (~20 °C). Os perfis de sinais potenciométricos de cada membrana polimérica foram transferidos para o programa Excel para posterior tratamento de dados.

### **3.5.5. Métodos estatísticos**

Os métodos estatísticos de análise multivariada permitem a redução do número de variáveis independentes inicialmente avaliadas, bem como realizar análises qualitativas (classificação/discriminação) e quantitativas (obtenção de modelos de calibração e previsão) (Neto *et al.*, 2006). Neste trabalho, foram utilizados diferentes métodos quimiométricos.

#### *3.5.5.1. Classificação com análise discriminante linear*

A análise discriminante linear (ADL) é um método de análise estatística supervisionada onde os grupos a que as amostras pertencem são previamente estabelecidos. É uma técnica aplicável quando a variável dependente é qualitativa (identificação/classificação dos grupos) e as variáveis independentes são quantitativas, permitindo obter funções lineares das variáveis que potenciam o distanciamento entre os grupos em estudo. Com o modelo ADL é possível classificar a que grupo pertencem novas amostras. Esta metodologia é sensível à multi-colinearidade entre as variáveis independentes embora, em último caso, a robustez do modelo possa ser avaliada ao nível da previsão. Por isso, e de forma a evitar problemas de multi-colinearidade, a seleção de variáveis é um aspeto muito importante para a obtenção de modelos de previsão robustos, permitindo também, em muitas situações, reduzir o ruído dos dados analíticos, ao remover/eliminar variáveis sem informação relevante para o estudo. Os sinais dos sensores da língua eletrónica apresentam elevada colinearidade e, por isso, é fundamental usar um algoritmo de seleção de variáveis que permita a escolha dos sensores mais

relevantes para o estudo em causa. Neste estudo a qualidade dos resultados foi inferida ao nível da percentagem de classificações corretas (sensibilidades) obtidas com modelos baseados em diferentes subconjuntos de sensores contendo entre 2 e 42 sensores (o número máximo de sensores deverá ser sempre inferior ao número total de amostras utilizadas, que neste trabalho foram 44). Para tal usou-se o algoritmo de arrefecimento simulado (AS), que é um algoritmo meta-heurístico de seleção de subconjuntos de variáveis por busca local (corresponde a um ótimo global para um dado critério de aproximação a uma determinada função). Na seleção de cada subconjunto de variáveis (sensores/sinais) fixou-se um máximo de 10000 tentativas (valor que permitia chegar à mesma solução com repetição do procedimento). O critério de qualidade usado para avaliar o ajuste entre a variável dependente (grupos) usando os subconjuntos de sensores estabelecidos pelos algoritmos foi o critério  $c_{r12}$ , índice equivalente à maximização da primeira raiz de Roy (valor conceitualmente equivalente à razão F na análise de variância univariada) (Cadima *et al.*, 2004; 2012). Os modelos obtidos para cada subconjunto de sensores (2 a 42 sensores) foram testados na sua capacidade de classificação das amostras nos grupos pré-definidos, quer para os dados originais quer para a metodologia de validação cruzada “deixar um de fora” (*leave-one-out*, LOO). Esta técnica avalia o desempenho de previsão de um modelo ao remover uma amostra do universo de  $n$  amostras em estudo e prever a que grupo pertence com base no modelo ADL-AS obtido com as restantes  $(n-1)$  amostras. Ao repetir este processo  $n$  vezes, obtém-se os erros de classificação de todas as amostras, sendo o erro global a soma dos erros de cada teste dividido por  $n$ . O melhor modelo de discriminação será o que permite ter modelos com menor número de variáveis, mais simples e mais fácil de interpretar, e o que permite ter melhores resultados de previsão.

Esta abordagem estatística (ADL-AS) acoplada à informação electroquímica obtida com a LE, tem sido usada com sucesso no estudo de várias matrizes alimentares, nomeadamente na análise qualitativa de mel (Sousa *et al.*, 2014), sumos de fruta (Dias *et al.*, 2014a) e, mais recentemente, de azeites comerciais (Dias *et al.*, 2014b, 2016a). Mais ainda, os modelos LE-ADL-AS estabelecidos apresentam uma maior capacidade de previsão na classificação de amostras comparativamente a outras estratégias estatísticas multivariadas usuais como a análise de discriminante linear (ADL) ou a análise de discriminante por mínimos quadrados parciais (MQP-AD) (Dias *et al.*, 2016b). Assim

sendo, neste estudo optou-se por usar a ADL acoplada ao algoritmo AS como técnica estatística multivariada supervisionada para a análise qualitativa dos dados.

A abordagem que mostrou a melhor capacidade de previsão foi ainda avaliada usando o procedimento de validação cruzada K vezes com repetição (K-folds). Esta estratégia foi utilizada com o objetivo de minimizar o risco demasiado otimista dos resultados normalmente relatados com o LOO (*leave-one-out*) (Dias *et al.*, 2016a, 2016b). Para o segundo procedimento de validação cruzada, os dados foram divididos em K subconjuntos que permitiram a obtenção de K modelos, cada um equipado considerando K-1 subconjuntos, como o conjunto de treino, deixando de fora um dos subconjuntos para validação interna, para calcular o erro de predição para o modelo obtido (Venables e Ripley, 2002). O número de K-folds foi definido igual a 4, permitindo a formação de subconjuntos de ensaio com 25% dos dados iniciais. Além disso, através da aplicação de um procedimento de validação cruzada K-folds com repetição (com 10 repetições), a incerteza das estimativas poderia ser significativamente reduzida. Para normalizar o peso de cada variável no modelo linear de classificação final, foram aplicados procedimentos de dimensionamento de variável e de centragem.

#### *3.5.5.2. Quantificação com RLM*

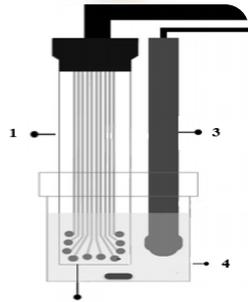
A regressão linear múltipla (RLM) permite obter um modelo de previsão que representa a relação entre uma variável dependente e uma combinação linear de várias variáveis independentes. Esta técnica envolve uma série de pressupostos para a sua aplicação: verificação da linearidade dos dados experimentais, independência dos erros, homogeneidade das variâncias dos resíduos, normalidade de distribuição dos erros e a ausência de multi-colinearidade entre as variáveis independentes (Maroco, 2003). Embora o cumprimento dos pressupostos seja desejável para garantir a aplicabilidade do modelo, verifica-se que é possível ultrapassar algumas destas questões desde que se verifique a robustez do modelo RLM ao nível da previsão. Tal como na análise discriminante linear, a multi-colinearidade presente nos sinais dos sensores é um problema. Esta situação também pode ser minimizada recorrendo ao algoritmo AS, usando como critério de qualidade o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (Cadima *et al.*, 2004; 2012). Os modelos RLM obtidos para cada subconjunto de sensores (2 a 42 sensores) selecionados pelo algoritmo AS foram avaliados ao nível da previsão

quantitativa da variável dependente quer com dados originais quer para a validação cruzada LOO. O melhor modelo é também aquele que possui o menor número de sensores e que permite obter um coeficiente de determinação para os dados da validação cruzada LOO mais elevado. Este modelo é testado na sua capacidade de previsão através da relação linear entre os valores previstos pela validação cruzada LOO no estabelecimento do modelo e os valores experimentais, através dos valores do declive e ordenada na origem (bem como, os respetivos intervalos de confiança), além do coeficiente de determinação ajustado.

Assim como para a classificação, o modelo que melhor mostrou a capacidade de previsão foi ainda avaliada usando o procedimento de validação cruzada K vezes com repetição (K-folds). O número de K-folds foi definido igual a 4 com 10 repetições. A possibilidade de utilizar a LE como ferramenta para a quantificação de defeitos sensoriais em azeitonas de mesa foi ainda verificada avaliando se os valores da ordenada na origem e do declive para procedimentos de validação cruzada com as técnicas LOO ou K-folds com repetição eram estatisticamente iguais aos valores teoricamente esperados (zero e um, respectivamente) ao representar os valores previstos, estimados pelos modelos de regressão em relação ao de dados experimentais (Roig e Thomas, 2003a, 2003b). Os dados obtidos experimentalmente neste trabalho foram tratados estatisticamente com o programa de estatística R (versão 2.15.1) com nível de significância de 5%.

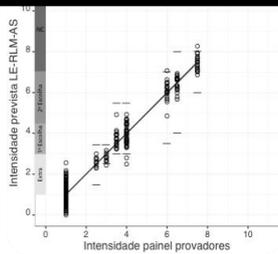
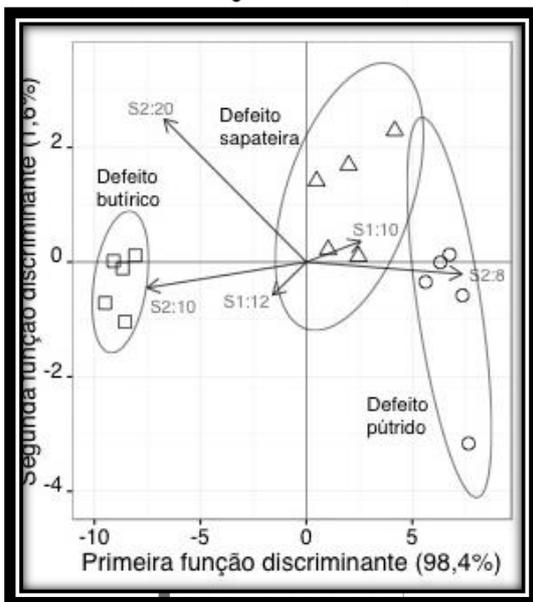
No presente estudo optou-se pela utilização do modelo LE-RLM-AS pois foi evidenciado em trabalhos anteriores (análise de azeites) que com esta abordagem, na previsão, era possível alcançar melhores percentagens de classificações corretas comparativamente a outros modelos estatísticos de classificação, como os mínimos quadrados parciais (MQP) e a regressão por componentes principais (RCP) (Rodrigues *et al.*, 2016).





## Capítulo 4.

# Avaliação qualitativa do potencial da LE na classificação de azeitonas de mesa





#### **4.1. Classificação comercial de azeitonas de mesa segundo painel**

Cada amostra de azeitona de mesa foi avaliada sensorialmente por 8 membros pertencentes a um painel de provadores em formação de acordo com o regulamento estabelecido pelo COI (2011). O nível da intensidade e o tipo dos atributos negativos (isto é, defeitos organoléticos relacionados à fermentação anormal ou outros defeitos sensoriais) presentes em cada uma das 44 amostras independentes de azeitonas de mesa e respectivas soluções de salmoura foram avaliados por cada membro do painel. De acordo com a análise sensorial (que leva em conta a simultânea avaliação de azeitonas de mesa e soluções de salmoura), para 7 amostras de azeitonas de mesa e suas respectivas soluções de salmoura o painel de provadores não foi capaz de identificar qualquer defeito organolético, sendo classificado como extra sem defeitos (extra\_sd). Para as outras 37 amostras de azeitonas de mesa e / ou soluções de salmoura, o painel de provadores identificou pelo menos um dos cinco defeitos organoléticos (isto é, pútrido, butírico, sapateira, mofo e / ou avinhado-avinagrado). Com base no nível da mediana da intensidade do defeito predominante percebido (como descrito na seção 3.1) avaliada em ambas as azeitonas e soluções de salmoura, as amostras foram classificadas de acordo com a categoria comercial, identificando os defeitos da seguinte forma: 11 amostras foram classificadas como extra ( $1,5 \leq DPP \leq 3$ ), 13 amostras como 1ª escolha ( $3,5 \leq DPP \leq 4,5$ ), 7 amostras como 2ª escolha ( $5 \leq DPP \leq 7,0$ ) e as 6 restantes foram classificadas como azeitonas que não podem ser comercializadas como azeitonas de mesa (NC) ( $7,5 \leq DPP \leq 10$ ), conforme demonstrado na Tabela 4 .

**Tabela 4.** Detalhes das amostras de azeitonas de mesa (cultivar, processamento tecnológico e marca de acordo com as informações do rótulo) e classificação de acordo com a categoria comercial com base na avaliação organolética dos provadores (segundo o regulamento COI (2011)).

Número amostra	Cultivar <sup>a</sup>	Processamento tecnológico <sup>b</sup>	Marca	DPP <sup>c</sup>	Classificação comercial <sup>d</sup>
1	Galega	Fermentação Natural	A	Pútrido	Extra
2	Galega	Fermentação Natural	B	Avinhado-avinagrado	1 <sup>a</sup> escolha
3	Galega	Fermentação Natural	A	Sapateira	Extra
4	Galega	Fermentação Natural	E	Avinhado-avinagrado	Extra
5	Galega	Fermentação Natural	C	Pútrido	NC
6	Galega	Fermentação Natural	C	Avinhado-avinagrado	1 <sup>a</sup> escolha
7	Galega	Fermentação Natural	C	Pútrido	2 <sup>a</sup> escolha
8	Galega	Fermentação Natural	C	Pútrido	2 <sup>a</sup> escolha
9	Galega	Fermentação Natural	C	Pútrido	2 <sup>a</sup> escolha
10	Galega	Fermentação Natural	C	Pútrido	1 <sup>a</sup> escolha
11	Galega	Fermentação Natural	D	Mofo	Extra
12	Galega	Fermentação Natural	D	Avinhado-avinagrado	1 <sup>a</sup> escolha
13	Galega	Fermentação Natural	D	Avinhado-avinagrado	Extra
14	Galega	Fermentação Natural	D	Avinhado-avinagrado	1 <sup>a</sup> escolha
15	Galega	Fermentação Natural	D	Pútrido	NC
16	Galega	Fermentação Natural	A	Butírico	2 <sup>a</sup> escolha
17	Galega	Fermentação Natural	A	Butírico	1 <sup>a</sup> escolha
18	Galega	Fermentação Natural	A	Sapateira	1 <sup>a</sup> escolha
19	Galega	Fermentação Natural	A	Pútrido	1 <sup>a</sup> escolha
20	Galega	Fermentação Natural	A	Pútrido	1 <sup>a</sup> escolha
21	Galega	Fermentação Natural	E	Mofo	2 <sup>a</sup> escolha
22	Galega	Fermentação Natural	B	Avinhado-avinagrado	1 <sup>a</sup> escolha

<sup>a</sup>Cultivar das azeitonas de mesa como mencionado no rótulo da embalagem.

<sup>b</sup>Processamento tecnológico utilizado para produzir as azeitonas de mesa de acordo com o rótulo da embalagem.

<sup>c</sup>Atributo negativo predominante percebido pelo painel de provadores em cada amostra de azeitona de mesa (DPP). S.D (sem defeito): Não foi identificado defeito na amostra segundo o painel de provadores.

<sup>d</sup>Classificação das azeitonas de mesa segundo categoria comercial de acordo com as 4 classes recomendadas pelo COI (2011) (com base na intensidade mediana do defeito predominante percebido, DPP, pelo painel de provadores: extra,  $DPP \leq 3$ ; 1<sup>a</sup> escolha,  $3 < DPP \leq 4,5$ ; 2<sup>a</sup> escolha,  $4,5 < DPP \leq 7$ ; NC: não comercializável como azeitona de mesa,  $DPP > 7$ ) e uma outra proposta neste trabalho (Extra\_sd: quando nenhum defeito organolético é identificado pelo painel de provadores).

**Tabela 4.** (continuação).

<b>Número amostra</b>	<b>Cultivar<sup>a</sup></b>	<b>Processamento tecnológico<sup>b</sup></b>	<b>Marca</b>	<b>DPP<sup>c</sup></b>	<b>Classificação comercial<sup>d</sup></b>
23	Mistura	Fermentação Natural	F	Sapateira	Extra
24	Galega	Fermentação Natural	G	Mofo	Extra
25	Mistura	Fermentação Natural	G	Sapateira	Extra
26	Negrinha de freixo	Fermentação Natural	G	Avinhado-avinagrado	Extra
27	Mistura	Fermentação Natural	G	S.D	Extra_sd
28	Manzanilla	Estilo Espanhol	I	S.D	Extra_sd
29	Hojiblanca	Estilo Espanhol	H	S.D	Extra_sd
30	Galega	Fermentação Natural	J	Avinhado-avinagrado	2ª escolha
31	Mistura	Todos Processos	G	S.D	Extra_sd
32	Gordal	Estilo Espanhol	M	S.D	Extra_sd
33	Hojiblanca	Estilo Californiano	H	S.D	Extra_sd
34	Hojiblanca	Estilo Espanhol	H	S.D	Extra_sd
35	Mistura	Estilo Espanhol	G	Avinhado-avinagrado	1ª escolha
36	Manzanilla	Fermentação Natural	L	Avinhado-avinagrado	1ª escolha
37	Empeltre	Fermentação Natural	N	Mofo	1ª escolha
38	Mistura	Fermentação Natural	K	Pútrido	2ª escolha
39	Mistura	Fermentação Natural	K	Avinhado-avinagrado	Extra
40	Galega	Fermentação Natural	J	Avinhado-avinagrado	Extra
41	Cobrançosa	Estilo Espanhol	O	Butírico	NC
42	Cobrançosa	Fermentação Natural	P	Butírico	NC
43	Cobrançosa	Fermentação Natural	Q	Mofo	NC
44	Negrinha de freixo	Fermentação Natural	R	Butírico	NC

<sup>a</sup>Cultivar das azeitonas de mesa como mencionado no rótulo da embalagem.

<sup>b</sup>Processamento tecnológico utilizado para produzir as azeitonas de mesa de acordo com o rótulo da embalagem.

<sup>c</sup>Atributo negativo predominante percebido pelo painel de provadores em cada amostra de azeitona de mesa (DPP).

S.D (sem defeito): Não foi identificado defeito na amostra segundo o painel de provadores.

<sup>d</sup>Classificação das azeitonas de mesa segundo categoria comercial de acordo com as 4 classes recomendadas pelo COI (2011) (com base na intensidade mediana do defeito predominante percebido, DPP, pelo painel de provadores: extra,  $DPP \leq 3$ ; 1ª escolha,  $3 < DPP \leq 4,5$ ; 2ª escolha,  $4,5 < DPP \leq 7$ ; NC: não comercializável como azeitona de mesa,  $DPP > 7$ ) e uma outra proposta neste trabalho (Extra\_sd: quando nenhum defeito organoléptico é identificado pelo painel de provadores).

#### 4.2. Avaliação do potencial da LE na discriminação de sabores básicos

Embora de acordo com o COI (2011) a classificação comercial de azeitonas de mesa ser baseada exclusivamente na percepção sensorial de defeitos organoléuticos, a avaliação de três sabores básicos, nomeadamente do ácido, amargo e salgado é também recomendada e em geral, realizada durante as provas sensoriais de azeitonas de mesa. Deste modo, a capacidade da LE na discriminação de sabores básicos foi avaliada utilizando os seguintes padrões: (i) ácido cítrico e ácido tartárico para mimetizar o sabor ácido; (ii) quinino e cafeína para mimetizar o sabor amargo; e, (iii) cloreto de sódio e cloreto de potássio para mimetizar o sabor salgado. Para cada padrão, utilizaram-se 9 concentrações, totalizando 54 amostras ( $2 \times 3 \times 9$ ), como descrito na seção (3.3), sendo que os níveis testados incluem os geralmente indicados pelo COI (2011) para o treino de painel de provadores.

Da análise da Tabela 5 verifica-se que para o ácido cítrico, a intensidade do sinal potenciométrico aumenta linearmente com o aumento do logaritmo decimal da concentração (como se pode inferir pelos valores positivos da sensibilidade, que representam o declive da regressão linear) enquanto que para o ácido tartárico, a tendência linear é negativa, isto é, diminuição do sinal com o aumento da concentração do padrão. Estes resultados permitem inferir que no primeiro caso a resposta é resultado da sensibilidade ao catião e no outro ao anião. Para o sabor amargo, verifica-se que para ambos os padrões utilizados (cafeína e quinino anidro) o comportamento eletroquímico dos sensores incluídos na LE é semelhante, aumentando o sinal com o aumento da concentração, apresentando valores de sensibilidade da mesma ordem de grandeza (embora ligeiramente superiores para o quinino).

Verifica-se ainda que a LE apresenta uma maior sensibilidade para o amargo comparativamente ao ácido (maiores valores de sensibilidade, em valor absoluto). Por outro lado, no caso específico do quinino, o comportamento observado é similar ao descrito anteriormente na bibliografia (Veloso *et al.*, 2016). Estes autores reportaram sensibilidades na gama de  $14 \pm 2$  a  $25 \pm 6$  mV/década para a resposta de membranas lipídicas poliméricas ao aumento da concentração de quinino monoclóridrato dihidratado. Relativamente ao sabor salgado, pode constatar-se que a LE apresenta uma resposta semelhante para ambos os padrões estudados, sendo que a intensidade do sinal diminui com o aumento da concentração de cada composto, apresentando sensibilidade negativas

da mesma ordem de grandeza, o que permite atribuir a resposta à presença do anião cloreto em solução. Globalmente pode concluir-se que as membranas lipídicas utilizadas na LE apresentam sensibilidade individual aos três sabores básicos usualmente avaliados pelo painel de provadores de azeitonas de mesa. Convém contudo referir que, o objetivo da LE é obter uma avaliação global da matriz em estudo que permita estabelecer modelos multivariados qualitativos e/ou quantitativos, por oposição à eventual resposta individual de cada sensor.

**Tabela 5.** Sensibilidade da membrana da LE na análise de soluções padrão de sabores básicos ácido, amargo e salgado (composto químico, concentração, gama de sinais potenciométricos, sensibilidade e coeficientes de determinação).

Sabor básico	Solução padrão	Gama de concentrações (g/L)	Gama de sinais potenciométricos registados com LE (mV)	Gama de sensibilidades (mV/década)	Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> )
Ácido	Ácido cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0,125 a 2	-50 a +210 V	+9 a +20	0,831 ≤ R <sup>2</sup> ≤ 0,950
	Ácido tartárico (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub> )	0,01 a 0,5	-80 a +210	-20 a -0.01	0,830 ≤ R <sup>2</sup> ≤ 0,971
Amargo	Cafeína (C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	0,15 a 3	-75 a +197	+20 a +31	0,830 ≤ R <sup>2</sup> ≤ 0,831
	Quinino (C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0,01 a 0,1	-67 a +191	+19 a +48	0,830 ≤ R <sup>2</sup> ≤ 0,980
Salgado	Cloreto de potássio (KCl)	2 a 25	-200 a +150	-51 a -14	0,840 ≤ R <sup>2</sup> ≤ 0,980
	Cloreto de sódio (NaCl)	0,5 a 15	-220 a +150	-39 a -11	0,814 ≤ R <sup>2</sup> ≤ 0,970

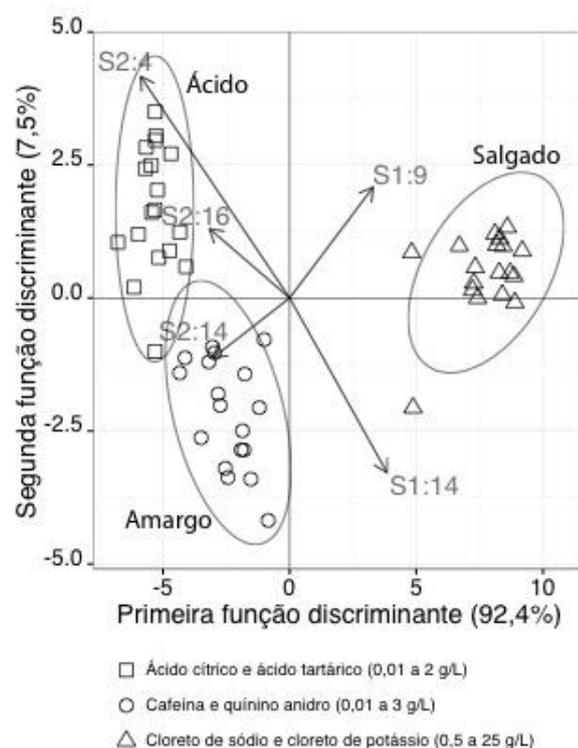
Estudos anteriores (Dias *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2010; Veloso *et al.*, 2016) têm demonstrado a capacidade de sistemas de LE em discriminar com sucesso atributos sensoriais básicos, como por exemplo os 5 atributos gustativos (ácido, amargo, salgado, doce e umami). Contudo, convém referir que nesses estudos as soluções padrão eram preparadas com água deionizada ou destilada, contrariamente ao procedimento adotado neste trabalho, onde se utilizou água mineral comercial com o intuito de mimetizar as condições reais a que estão sujeitos os provadores. Assim sendo, neste trabalho, o

potencial da LE para discriminar qualitativamente os três atributos gustativos organoléticos (ácido, amargo e salgado) usualmente aferidos nas provas sensoriais de azeitonas de mesa, foi avaliado recorrendo análise discriminante linear (ADL), que é uma técnica estatística multivariada supervisionada, acoplado a um algoritmo de seleção de variáveis meta-heurístico, nomeadamente o algoritmo de arrefecimento simulado (AS). Estudos recentes (Dias *et al.*, 2014b, 2016b) demonstraram a versatilidade desta abordagem estatística multivariada (LE-ADL-AS) e o seu superior desempenho de previsão comparativamente a outras estratégias estatísticas multivariadas comuns tais como análise de discriminante linear (ADL) ou a análise de discriminante por mínimos quadrados parciais (MQP-AD).

O modelo LE-ADL-AS visa identificar o menor subconjunto de sensores da LE (entre os 20 sensores e as suas respetiva réplicas), que contenha informação capaz de permitir discriminar as amostras de acordo com as propriedades qualitativas em estudo, evitando a inclusão de sensores com informação redundante e diminuindo possíveis perturbações devido a efeitos de ruído nos modelos de previsão.

Os resultados obtidos demonstram a potencialidade dos modelos de LE-ADL-AS para classificar as 6 soluções padrão (cada com 9 níveis de concentração) de acordo com o atributo sensorial que mimetizam. Com efeito foi possível estabelecer, um modelo discriminante linear com 2 funções significativas ( $P < 0,0001$ ; explicando 92,4% e 7,5% da variabilidade dos dados originais) com base nos perfis de sinais potenciométricos de 5 sensores (S1:9, S1:14, S2:4, S2:14, e S2:16) cujas membranas poliméricas continham como aditivos o álcool olefílico e o ácido oleico. O modelo LE-ADL-AS permitiu classificar corretamente 100% dos dados originais (Figura 3) e prever com sucesso o atributo sensorial de 98% das soluções padrão com base na validação cruzada usando a técnica “deixar um de fora” (LOO, *leave-one-out*) tendo verificado que apenas uma solução foi mal classificada (isto é, uma solução ácida foi classificada como amarga). O modelo LE-ADL-AS selecionado inclui um sensor e a sua respetiva réplica (S1:14 e S2:14) cujos perfis de sinais embora semelhantes, não são colineares, possuindo informação relevante e não redundante. Este facto pode ser atribuído a pequenas variações na composição da membrana bem como das suas propriedades físicas (transparência e porosidade) que podem ocorrer devido ao uso da técnica de gota-a-gota, que pode conduzir à formação de membranas não homogéneas (Dias *et al.*, 2014a). Convém ainda salientar que, como descrito na literatura (Correia *et al.*, 2005), a inclusão de sensores

repetidos em modelos multivariados pode melhorar o desempenho de previsão do mesmo. Para testar a robustez do modelo de classificação LE-ADL-AS na previsão do tipo de sabor básico (ácido, amargo e salgado), a que cada solução padrão pertenceria, foi aplicado um procedimento de validação cruzada K-folds (K-grupos) com repetição (4 folds  $\times$  10 repetições). No total, os dados foram divididos aleatoriamente 40 vezes, em dois subconjuntos, um para fins de treino (contendo 75% dos dados) e o outro para validação interna (contendo 25% dos dados, que não são usados para estabelecer o modelo de classificação). Para os sabores básicos, os melhores resultados qualitativos de previsão foram obtidos com um modelo de LE-ADL-AS baseado nos mesmos 5 sensores selecionados para o procedimento de validação cruzada LOO (*leave-one-out*). Com este modelo  $98\% \pm 3\%$  (entre 91% e 100% para o conjunto de 40 tentativas de classificação) das soluções padrão foram corretamente classificadas de acordo com o sabor básico que mimetizavam.



**Figura 3.** Discriminação de soluções padrão que mimetizam sabores básicos (ácido, amargo e salgado) avaliados em provas sensoriais de azeitonas de mesa, recorrendo a um modelo LE-ADL-AS com base na informação gerada por 5 sensores da LE (S:9, S1:14, S2:4, S2:14, e S2:16): ácido cítrico e tartárico (0,01 a 2 g/L; sabor ácido); cafeína e quinino (0,01 a 3 g/L; sabor amargo); cloreto de sódio e de potássio (0,5 a 25 g/L; salgado).

Por fim, convém salientar que os resultados satisfatórios de previsão obtidos com os modelos LE-ADL-AS estabelecido a partir da informação eletroquímica contida nos perfis de sinais potenciométricos de 5 sensores da LE, permitem constatar a potencialidade da LE como um sensor de sabores (isto é., um *taste sensor device*) capaz de discriminar soluções padrão que mimetizam os 3 sabores básicos, usualmente avaliados em provas de azeitonas de mesa.

#### **4.3. Avaliação do potencial da LE na discriminação de atributos sensoriais negativos**

A capacidade da LE potenciométrica em discriminar os defeitos organoléticos habitualmente detetados em azeitonas de mesa e/ou nas respectivas salmouras foi avaliada usando soluções padrão de compostos químicos de referência recomendados pelo COI (2011), ou usando amostras reais (de azeitonas de mesa e de salmoura) identificadas pelo painel de provadores como possuindo um só defeito sensorial muito intenso (ou seja, amostras para as quais a mediana das intensidades do defeito foi igual ou superior a 8, de acordo com a análise sensorial). Neste contexto foram avaliados os defeitos organoléticos relacionados com a fermentação anormal (butírico, pútrido e sapateira) ou outros defeitos sensoriais comumente encontrados, como por exemplo o avinhado-avinagrado e o mofo (COI, 2011).

##### **4.3.1. Soluções padrão que mimetizam características organoléticas negativas em azeitonas de mesa, devido à fermentação anormal**

O desempenho da LE na discriminação de defeitos sensoriais foi avaliado usando soluções padrão de compostos químicos que de acordo com o COI (2011) mimetizam os atributos negativos associados à fermentação anormal (butírico, pútrido e sapateira). Para tal utilizaram-se soluções padrão de 3 compostos químicos (5 soluções de diferentes concentrações para cada padrão, incluindo a gama de concentrações recomendada pelo COI (2011) no treino de painel de provadores), preparadas com água mineral comercial (para simular as condições usadas durante o treino de um painel de provadores). Cada solução (3 × 5) foi analisada eletroquimicamente com a LE, e os resultados obtidos encontram-se sumariados na Tabela 6.

Os resultados apresentados na Tabela 6 permitem identificar duas tendências para a variação da intensidade do sinal potenciométrico com a concentração do ácido n-butírico, que mimetiza o defeito butírico, com base na gama de sensibilidades obtidas (declives da reta de regressão entre a intensidade do sinal versus o logaritmo decimal da concentração), independentemente do tipo de plastificante e/ou aditivo constituinte de cada sensor. Cerca de metade dos sensores apresentaram um decréscimo da intensidade de sinal com o aumento da concentração de padrão e, para a outra metade de sensores da LE a intensidade do sinal aumentou para concentrações crescentes. Já para o atributo negativo pútrido, o sinal registado por cada sensor ou réplica, diminui para crescentes da solução padrão de 2-mercaptoetanol. Contrariamente, para o composto que mimetiza o defeito sapateira (ácido ciclohexanocarboxílico), todos os sensores da LE apresentaram uma tendência linear crescente da intensidade do sinal potenciométrico com incremento da concentração da solução padrão.

As membranas lípido-plastificante-PVC são diferentes na sua composição pelo tipo de plastificante (aumenta a absorção de solutos por diminuição da rigidez da membrana) e compostos aditivo (substâncias lipídicas) que conferem propriedades diferentes em função do pH e interações hidrofóbicas e hidrofílicas. As moléculas do polímero de PVC têm polaridades internas positiva e negativa, enquanto que moléculas de plastificante e aditivo têm partes polares e não-polares. Além disso, uma vez que a membrana se comporta como um polímero, a sua permeabilidade depende do tamanho molecular dos solutos.

Os resultados descritos demonstram, pela primeira vez, que membranas lipídicas de sensibilidade cruzada aplicadas numa LE, apresenta uma resposta linear com a concentração de soluções padrão que mimetizam atributos organoléticos negativos presentes geralmente em azeitonas de mesa (butírico, pútrido e sapateira).

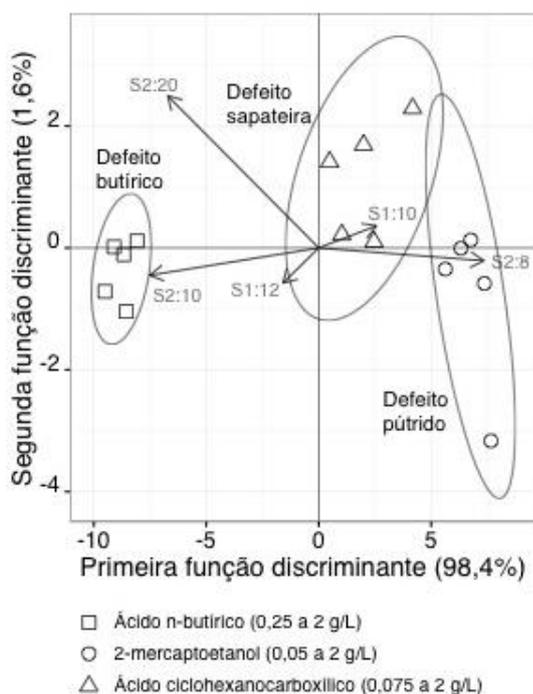
**Tabela 6.** Sensibilidade das membranas/sensores da LE na análise de soluções padrão de defeitos associados à fermentação anormal (composto químico, gama de concentrações, gama de sinais potenciométricos, sensibilidade e coeficientes de determinação).

<b>Atributo Negativo</b>	<b>Solução padrão</b>	<b>Gama de concentrações (g/L)</b>	<b>Gama de sinais potenciométricos registados com LE (mV)</b>	<b>Gama de sensibilidades (mV/déc)</b>	<b>Coefficiente de determinação (R<sup>2</sup>)</b>
Butírico	Ácido n-butírico (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> )	0,25 a 2	-110 a +220	-287 a -67	0,923 ≤ R <sup>2</sup> ≤ 0,999
				+14 a +197	0,901 ≤ R <sup>2</sup> ≤ 0,998
Pútrido	2-mercaptoetanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	0,05 a 2	-250 a +220	-156 a -10	0,810 ≤ R <sup>2</sup> ≤ 0,999
Sapateira	Ácido ciclohexanocarboxílico (C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> CO <sub>2</sub> H)	0,075 a 2	-70 e +200	+4 a +78	0,908 ≤ R <sup>2</sup> ≤ 0,995

A possibilidade de discriminar qualitativamente os atributos negativos organoléticos associados à fermentação anormal, recorrendo aos perfis de sinais potenciométricos registados com a LE, foi também avaliado. Para tal, selecionou-se o modelo de LE-ADL-AS com o menor subconjunto de sensores capaz de permitir a máxima classificação correta para o método de validação cruzada LOO (*leave-one-out*). Foi possível estabelecer um modelo LE-ADL-AS a com 2 funções significativas (P < 0,0001; explicando 98,4% e 1,6% da variabilidade dos dados originais) com base nos perfis de sinais potenciométricos de 5 sensores (S1:10, S1:12, S2:8, S2:10 e S2:20), os quais incluem um sensor (S1:10) e a respetiva réplica (S2:10), que permitiu discriminar satisfatoriamente as soluções padrão de acordo com o defeito sensorial associado. Tal como para o modelo LE-ADL-AS obtido para as soluções padrão associadas aos sabores básicos, os sensores selecionados pelo algoritmo AS para classificar os defeitos organoléticos também incluíram o álcool oleílico e ácido oleico como aditivos. O modelo LE-ADL-AS permitiu a classificação correta de 100% dos dados originais (Figura 4) e 93% das soluções-padrão para a validação cruzada LOO (*leave-one-out*). No último caso, apenas uma solução padrão referente ao defeito sapateira foi erroneamente classificada como defeito pútrido.

A robustez do procedimento LE-ADL-AS foi ainda testada recorrendo à validação cruzada K-folds com repetição (como descrito na seção 4.2). Para a discriminação dos 3

atributos negativos (butírico, pútrido e sapateira) com base nas soluções padrão que os mimetizam (ácido n-butírico, 2-mercaptoetanol e ácido ciclohexanocarboxílico), os melhores resultados de previsão foram obtidos utilizando um modelo de LE-ADL-AS com base nos mesmos 5 sensores que permitiram atingir uma classificação correta média de  $97\% \pm 8\%$  (entre 75% e 100% de classificações corretas obtidas para as 40 tentativas de classificação decorrentes da implementação da validação cruzada K-folds com repetição: 4 folds  $\times$  10 repetições).



**Figura 4.** Discriminação de soluções padrão que mimetizam atributos negativos associados à fermentação anormal de azeitonas de mesa (butírico, pútrido e sapateira) recorrendo a um modelo LE-ADL-AS com base na informação gerada por 5 sensores da LE (S1:10, S1:12, S2:8, S2:10 e S2:20): ácido n-butírico (0,25 a 2 g/L; defeito butírico); 2-mercaptoetanol (0,05 a 2 g/L; defeito pútrido); ácido ciclohexanocarboxílico (0,075 a 2 g/L; defeito sapateira).

Em conclusão, convém destacar que os resultados satisfatórios de previsão obtidos com o modelo LE-ADL-AS estabelecido a partir dos perfis de sinais potenciométricos de 5 sensores da LE, demonstram, pela primeira vez, a capacidade da LE como um sensor de defeitos capaz de discriminar soluções padrão que mimetizam os 3 atributos negativos atribuídos à fermentação anormal de azeitonas, usualmente detetados na avaliação

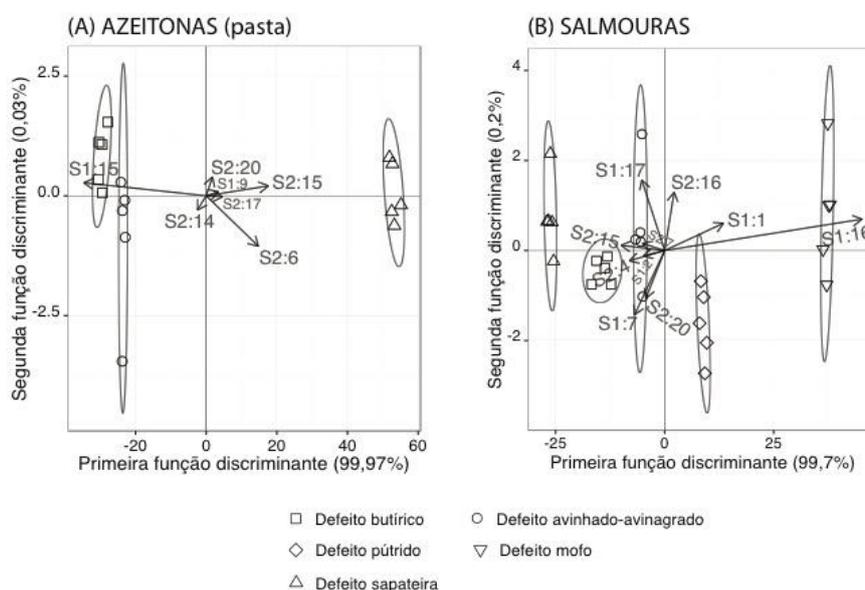
sensorial de azeitonas de mesa por painel de provadores, na gama de intensidades sensoriais avaliadas (Tabela 3) no treino do referido painel (COI, 2011): butírico (intensidade entre 3,5 e 7), pútrido (intensidade entre 2,5 e 8) e sapateira (intensidade entre 4 e 9).

#### **4.3.2. Potencial da LE na discriminação de amostras de referência de azeitonas de mesa e salmoura possuindo um único defeito organolético intenso, identificado na análise sensorial**

A capacidade da LE em discriminar defeitos organoléticos específicos muito intensos (mediana das intensidades do defeito predominante percebido, DPP  $\geq$  8; numa escala de 1 a 11) em amostras reais foi avaliada através da análise de amostras identificadas como amostras de referência de azeitonas de mesa e de salmoura, pelo painel de provadores. A análise sensorial permitiu identificar amostras reais de azeitona de mesa com 3 defeitos organoléticos específicos muito intensos (butírico, avinhado-avinagrado e sapateira) e amostras reais de salmoura com 5 defeitos individuais muito intensos (butírico, mofo, pútrido, avinhado-avinagrado e sapateira). A partir de cada amostra de azeitona de mesa ou de salmoura, foram obtidas 5 sub-amostras com diferentes intensidades de defeitos por diluição da amostra inicial com água mineral (tal como descrito na seção 3.4.2), resultando num total de 15 e 25 sub-amostras independentes (pasta de azeitonas e salmouras, respetivamente), as quais foram analisados eletroquimicamente. Os sinais potenciométricos variaram entre  $-0,27$  V e  $+0,28$  V, para os ensaios eletroquímicos de pastas de azeitona de mesa e de salmouras.

Os resultados obtidos durante a análise potenciométrica das amostras de azeitona de mesa (pasta de azeitona) com defeitos organoléticos muito intensos permitiram estabelecer um modelo LE-ADL-AS com 2 funções significativas (que explicam 99,97% e 0,03% da variabilidade dos dados originais) com base nos perfis de sinais eletroquímicos de 7 sensores da LE (S1:9, S1:15, S2:6, S2:14, S2:15, S2:17 e S2:20). Os resultados mostraram que o modelo é capaz de classificar corretamente 100% das pastas obtidas a partir das azeitonas de mesa de acordo com os 3 defeitos principais identificados (butírico, avinhado-avinagrado ou sapateira), para os dados originais (Figura 5A) e para a validação cruzada LOO (*leave-one-out*). A capacidade da LE em classificar corretamente as amostras de referência de salmoura de acordo com cada um dos 5 defeitos

identificados pelo painel de provadores (pútrido, butírico, sapateira, avinhado-avinagrado e mofo) foi igualmente avaliada, tendo-se obtido um modelo LE-ADL-AS (para o qual as duas primeiras funções discriminantes explicam 99,7% e 0,2% da variabilidade dos dados originais) com base nos perfis de sinais de 10 sensores da LE (S1:1, S1:2, S1:16, S1:17, S2:4, S2:7, S2:15, S2:16 e S2:20). O modelo permitiu a classificação correta de 100% das amostras de salmoura de acordo com o defeito sensorial tanto para os dados originais (Figura 5B) como para validação cruzada LOO (*leave-one-out*).



**Figura 5.** Discriminação de azeitonas de mesa (pasta de azeitona) e salmouras com um defeito sensorial único intenso ( $DPP \geq 8$ ) de acordo com a avaliação do painel de provadores, por recurso a análise estatística multivariada. (A) Pastas de azeitonas de mesa - modelo LE-ADL-AS com base na informação gerada por 7 sensores da LE (S1:9, S1:15, S2:6, S2:14, S2:15, S2:17 e S2:20): defeitos butírico, avinhado-avinagrado e sapateira. (B) Salmouras - modelo LE-ADL-AS com base na informação gerada por 10 sensores da LE (S1:1, S1:2, S1:16, S1:17, S2:4, S2:7, S2:15, S2:16 e S2:20): butírico, mofo, pútrido, avinhado-avinagrado e sapateira.

Por fim, para verificar o potencial de previsão dos modelos LE-ADL-AS baseados nos sinais da LE para classificar as amostras referência de azeitona de mesa ou de salmoura de acordo com o tipo de atributo negativo sensorial presente, recorreu-se à validação cruzada K-folds com repetição. Mais uma vez fixou-se o número de K-folds igual a 4, para garantir que no mínimo 25% das amostras com o mesmo defeito eram usadas para fins de validação interna. O procedimento foi repetido 10 vezes para minimizar o risco de sobreajuste (*overfitting*). Os resultados mostraram que para as

amostras referência de azeitonas de mesa ou de salmoura, os modelos LE-ADL-AS com melhores desempenhos de previsão foram baseados em 7 ou 10 sensores da LE (os mesmos que os mencionados anteriormente para os dados originais e validação cruzada LOO), permitindo obter sensibilidades (ou seja, percentagem de classificações corretas) médias, respetivamente, de  $93\% \pm 12\%$  (sensibilidades entre 67% e 100% para as 40 repetições) e  $98\% \pm 5\%$  (sensibilidades entre 83% e 100%). Os resultados de previsão ligeiramente melhores obtidos para a classificação das amostras de salmoura podem ser atribuídos à maior dificuldade em realizar a análise eletroquímica nas amostras de pasta de azeitonas.

#### **4.4. Desempenho da LE na classificação de amostras de azeitonas de mesa de acordo com a sua categoria comercial, baseada na presença e intensidade de defeitos sensoriais**

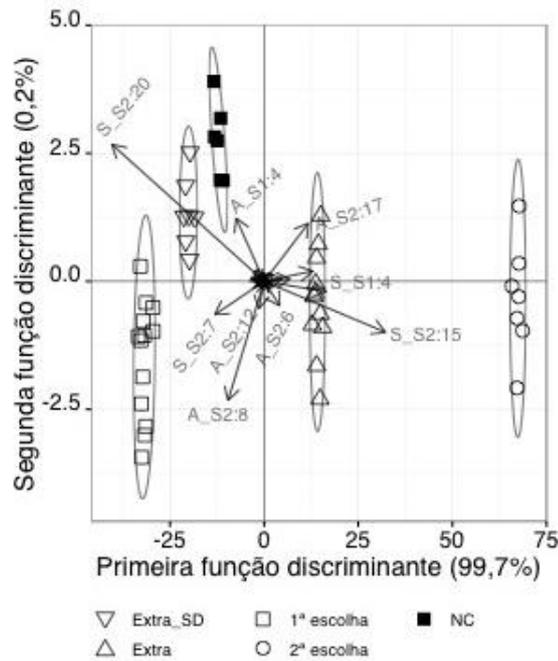
A fim de avaliar a capacidade da LE para classificação azeitonas de mesa de acordo com a sua categoria comercial (extra, 1ª escolha, 2ª escolha e azeitonas que não podem ser comercializadas como azeitonas de mesa, seguindo as diretivas do COI (2011) baseadas na avaliação sensorial de defeitos presentes nas amostras) utilizaram-se 44 amostras comerciais de azeitonas de mesa adquiridas em supermercados da região de Bragança - Portugal e Zamora - Espanha, tendo sido avaliadas as azeitonas (pasta de azeitona) e as respetivas salmouras (uma vez que nem todos os defeitos estão presentes em ambas as matrizes e com igual intensidade), totalizando 88 amostras (44 pastas de azeitonas e 44 salmouras). As características gerais das amostras de azeitonas de mesa estudadas, com base na informação constante na embalagem, o defeito predominante detetado pelo painel de provadores durante a avaliação organolética das azeitonas e respetivas salmouras bem como a classificação comercial das amostras atendendo à análise sensorial encontram-se descritos na Tabela 4. Convém referir que no âmbito deste estudo, para além das 4 categorias comerciais de azeitonas de mesa (extra, 1ª escolha, 2ª escolha e não comercializáveis como azeitonas de mesa (NC)) regulamentadas pelo COI (2011) foi acrescentada uma nova categoria referente à qualidade sensorial, que diz respeito a amostras de azeitona de mesa para as quais o painel de provadores não detetou qualquer defeito sensorial quer na azeitona quer na salmoura (extra sem defeito).

Os perfis de sinais potenciométricos registados durante a análise eletroquímica das 44 amostras de azeitona (pasta de azeitona) e das 44 salmouras com a LE (cujo procedimento experimental se encontra descrito na seção 3.4.3.) foram usados para estabelecer modelos LE-ADL-AS de classificação das 44 amostras de azeitonas de mesa de acordo com as 5 categorias comerciais (4 estabelecidas pelo COI (2011) e uma proposta neste estudo). Durante a análise das pastas de azeitonas e das respetivas salmouras a LE registou sinais que variaram entre  $-0,24$  V e  $+0,15$  V. Para a obtenção do modelo LE-ADL-AS de classificação sensorial das amostras reais foram selecionados os sinais mais informativos de entre os registados pelos 40 sensores da LE durante a análise das pastas e das salmouras (totalizando 80 sinais independentes para cada amostra, isto é, sinais de 40 sensores relativos à análise de cada pasta de azeitona e sinais dos mesmos 40 sensores relativos à análise de cada salmoura; código A\_S1:1 a A\_S2:20 e S\_S1:1 a S\_S2:20, respetivamente). Deste modo foi possível estabelecer um modelo LE-ADL-AS com 4 funções discriminantes significativas (sendo que as 2 primeiras funções explicavam 99,7% e 0,2% da variabilidade dos dados originais) com base nos perfis de sinais eletroquímicos de 16 sensores para a análise das pastas de azeitonas (A\_S1:4, A\_S1:10, A\_S1:11, A\_S1:13, A\_S1:16, A\_S1: 18, A\_S2:2, A\_S2:3, A\_S2:8, A\_S2:9, A\_S2:12, A\_S2:13, A\_S2 :14, A\_S2:16, A\_S2:17 e A\_S2:19; onde a letra A indica medições realizadas nas soluções de pasta de azeitona) e 9 sensores para a análise das respetivas salmouras (S\_S1:2, S\_S1:4, S\_S1:6, S\_S1:20, S\_S2:7, S\_S2:11, S\_S2:13, S\_S2:15 e S\_S2:20; onde a primeira letra S indica medições realizadas nas salmouras). O recurso a uma maior informação potenciométrica obtida durante a análise da pasta de azeitona comparativamente com a recolhida durante a análise das salmouras era expectável, uma vez que na análise sensorial efetuada pelo painel de provadores, em geral, a percepção de defeitos organoléticos e da sua intensidade é mais fácil na prova da azeitona do que da salmoura. O modelo LE-ADL-AS permitiu classificar corretamente 100% dos dados originais (Figura 6) e 97,7 % das amostras de azeitonas de mesa para o procedimento de validação cruzada LOO (*leave-one-out*), sendo apenas uma amostra das 44 amostras mal classificada (1 amostra classificada pelo painel como NC foi classificada pelo modelo LE-ADL-AS como extra\_sd).

A robustez do potencial de previsão dos modelos LE-ADL-AS para classificar as amostras comerciais de azeitonas de mesa de acordo com a sua categoria comercial baseada na percepção e intensidade de defeitos sensoriais foi ainda testada recorrendo à validação cruzada K-folds com repetição. Assim sendo, e como descrito nas seções

anteriores (4.2 e 4.3) o número de K-folds fixado em 4, e o procedimento foi repetido 10 vezes para minimizar o risco de sobreajuste (*overfitting*), avaliando-se o desempenho de previsão do modelo LE-ADL-AS selecionado para após dividir a base de dados 40 vezes (4 folds × 10 repetições), reservando em cada tentativa pelo menos 25% dos dados de cada categoria comercial para validação interna. Os resultados mostraram que o melhor modelo LE-ADL-AS de previsão era baseado no mesmo conjunto de sinais da LE registados durante a análise simultânea das pastas de azeitona (16 sensores) e respetivas salmouras (9 sensores), permitindo obter uma sensibilidade média de 86% ± 9% (sensibilidades entre 73% e 100% para as 40 tentativas realizadas). O resultado global alcançado demonstra claramente o potencial de previsão da LE para a classificação comercial de azeitonas de mesa de acordo com a sua categoria comercial, baseada na presença e intensidade do defeito sensorial predominante. De facto, uma sensibilidade média de 86% para validação é satisfatório e encorajador atendendo à heterogeneidade das amostras de azeitonas de mesa utilizadas no presente trabalho, as quais eram oriundas de diferentes marcas e cultivares, sendo produzidas de acordo com diferentes processos tecnológicos (18 marcas, 7 cultivares e 3 estilos de processamento tecnológico). Mais ainda, amostras de azeitona de mesa pertencentes à mesma categoria comercial podem apresentar diferentes defeitos predominantes, como se pode constatar pela análise da Tabela 4 (amostras classificadas como extra possuem defeitos avinhado-avinagrado, mofo, pútrido e sapateira como DPP; amostras classificadas como 1ª escolha possuem defeitos avinhado-avinagrado, butírico, pútrido e sapateira como DPP; amostras classificadas como 2ª escolha possuem defeitos avinhado-avinagrado, butírico, pútrido e mofo como DPP; e, amostras classificadas como não comercializáveis possuem defeitos butírico, pútrido e mofo como DPP), aumentando a complexidade da tarefa de classificação sensorial das amostras com a LE, uma vez que esta responde de modo diferente consoante o defeito presente na azeitona e/ou salmoura (como discutido na seção 4.3.2.).

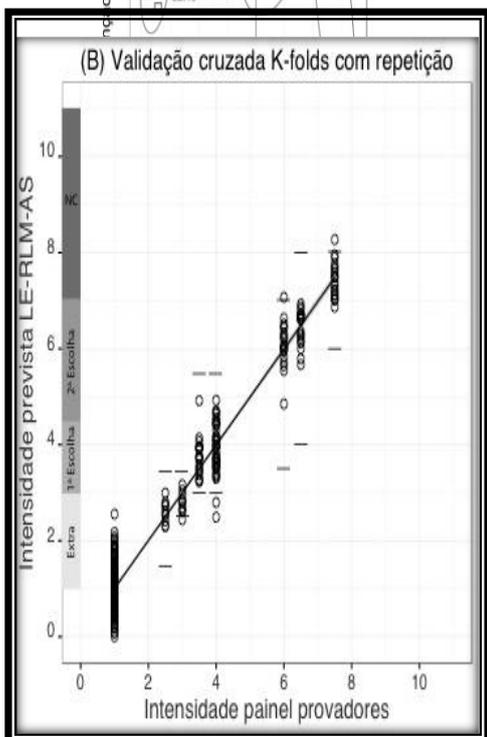
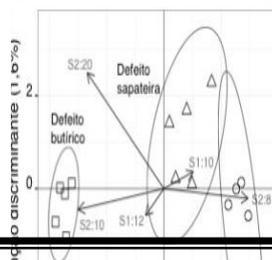
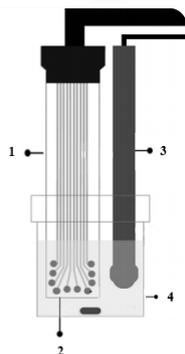
Como já referido anteriormente, pela primeira vez foi utilizada uma LE para avaliação qualitativa de azeitonas de mesa de acordo com a sua qualidade sensorial (atendendo à presença e intensidade de atributos organoléticos negativos percebidos por um painel de provadores), que embora ainda não seja uma exigência legal, vai de encontro às segue as categorias comerciais de azeitonas de mesa estabelecidas pelo COI (2011).



**Figura 6.** Discriminação de azeitonas de mesa de acordo com a sua categoria comercial recorrendo a um modelo LE-ADL-AS baseado na informação de 25 sinais registados pela LE durante a análise das pastas de azeitona e respetivas salmouras: pasta de azeitonas – sinais de 16 sensores (A\_S1:4, A\_S1:10, A\_S1:11, A\_S1:13, A\_S1:16, A\_S1: 18, A\_S2:2, A\_S2:3, A\_S2:8, A\_S2:9, A\_S2:12, A\_S2:13, A\_S2:14, A\_S2:16, A\_S2:17 e A\_S2:19) e salmoura – sinais de 9 sensores (S\_S1:2, S\_S1:4, S\_S1:6, S\_S1:20, S\_S2:7, S\_S2:11, S\_S2:13, S\_S2:15 e S\_S2:20). A classificação das azeitonas de mesa de acordo com a sua qualidade sensorial, (baseada na presença e intensidade de atributos organoléticos negativos avaliados por um painel de provadores) seguiu, a classificação comercial proposta pelo COI (2011) (azeitonas extra, 1ª escolha, 2ª escolha e azeitonas que podem ser comercializadas como azeitonas de mesa(NC)) à qual foi acrescentada uma categoria adicional proposta neste trabalho (azeitonas extra sem defeito).

Com efeito, na literatura apenas foi possível encontrar estudos baseados na aplicação de sensores, nomeadamente na utilização de dispositivos eletrónicos desenvolvidos para caracterização eletroquímica qualitativa e/ou quantitativa de azeites. Estes estudos têm demonstrado o potencial da aplicação única ou simultânea línguas, nariz e/ou olhos eletrónicos (LE, NE ou OE) na caracterização sensorial de azeites (Apetrei *et al.*, 2004, 2007, 2010, 2016a; Rodríguez-Méndez *et al.*, 2010; Veloso *et al.*, 2016), na discriminação de azeites virgem extra, virgem e lampantes (Apetrei e Apetrei, 2013; Apetrei *et al.*, 2005; Escuderos *et al.*, 2010, 2011; García-González e Aparicio, 2004; Oliveri *et al.*, 2009), na identificação da origem geográfica dos azeites (Apetrei *et al.*, 2010; Cosio *et al.*, 2006; Haddi *et al.*, 2011, 2013; Oliveri *et al.*, 2009) ou na classificação de azeites virgem extra monovarietais de acordo com a cultivar da azeitona

(Cimato *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2014b, 2016a). Além disso, tem sido reportada a capacidade destes dispositivos eletroquímicos para determinar as concentrações de polifenóis em azeites (Apetrei e Apetrei, 2013; Rodríguez-Méndez *et al.*, 2008), bem como a capacidade de NE e ou LE para avaliar indiretamente a oxidação de azeites virgem extra de acordo com o tempo de e condições de armazenamento (Cosio *et al.*, 2007). Mais recentemente, Rodrigues *et al.* (2016) propuseram o uso de uma LE para monitorizar a evolução de parâmetros físico-químicos (índice de peróxidos, coeficientes de extinção e estabilidade oxidativa) de azeites virgem extra durante o seu armazenamento.



## Capítulo 5.

*Avaliação quantitativa  
das intensidades dos  
atributos negativos  
presentes em amostras  
comerciais de  
azeitonas de mesa*



### 5.1. Avaliação das intensidades dos atributos presentes em amostras de azeitonas de mesa e salmoura, detetados pelo painel de provadores

Cada amostra de azeitona de mesa e suas respectivas salmouras foi avaliada sensorialmente por 8 membros que integram um painel de provadores que se encontra em formação de acordo com o regulamento estabelecido pelo COI (2011). As intensidades dos atributos negativos presentes em cada uma das 44 amostras independentes de azeitonas de mesa foram avaliadas por cada membro do painel tendo em conta a análise organolética das azeitonas e respectivas salmouras (Tabela 7).

**Tabela 7.** Mediana dos valores das intensidades de cada defeito identificado pelo painel de provadores (8 painelistas pertencentes a um painel sensorial em formação) durante a avaliação sensorial das amostras de azeitonas de mesa e respectivas salmouras de acordo com o COI (2011). Entre parêntesis indica-se a gama de intensidades registadas pelo painel (intensidade mínima e máxima do defeito perceptível).

Amostra	Defeito sensorial e respetivas intensidades				
	Fermentação anormal <sup>a</sup>			Outros Defeitos <sup>b</sup>	
	<i>Butírico</i>	<i>Pútrido</i>	<i>Sapateira</i>	<i>Avinhado-avinagrado</i>	<i>Mofo</i>
1	N.D	3 (2,5-3,5)	N.D	2,5 (1,5-4,5)	N.D
2	N.D	N.D	N.D	4 (2,5-4,5)	N.D
3	N.D	N.D	3 (1,5-3,5)	N.D	N.D
4	N.D	N.D	N.D	2,5 (1,5-3)	N.D
5	N.D	7,5 (6-8)	N.D	N.D	N.D
6	N.D	3,5 (3-5,5)	N.D	4,5 (3-7,5)	N.D
7	N.D	6,5 (4-8)	N.D	4 (2,5-4,5)	N.D
8	N.D	6 (5,5-7)	N.D	3 (1,5-4)	N.D
9	N.D	6,5 (5-7,5)	N.D	3,5 (3-4)	N.D
10	N.D	4 (3,5-5)	N.D	3,5 (1,5-4,5)	N.D
11	N.D	N.D	2,5 (1-3,5)	N.D	3 (1,5-4,5)
12	N.D	N.D	3,5 (3-4)	4,5 (3-5)	N.D
13	N.D	N.D	2,5 (1,5-3)	3 (3-4)	N.D
14	N.D	N.D	N.D	4 (2,5-4,5)	N.D
15	5,5 (4,5-7)	7,5 (6,5-8)	N.D	2,5 (1,5-3)	N.D
16	6 (4,5-7)	N.D	N.D	1 (1-3)	4,5 (3,5-5,5)
17	4,5 (3-5,5)	N.D	N.D	3 (2,5-4)	N.D
18	N.D	N.D	4,5 (2,5-6)	3 (2,5-3,5)	N.D
19	N.D	4 (3-5)	N.D	3,5 (3-4,5)	N.D
20	N.D	4 (3-4)	N.D	3,5 (2,5-4,5)	N.D
21	N.D	3,5 (3-4)	N.D	N.D	5 (4,5-6)
22	N.D	N.D	N.D	4,5 (3-5)	N.D

<sup>a</sup>Defeitos associados à categoria de fermentação anormal (butírico, pútrido e sapateira) (COI,2011).

<sup>b</sup>Defeitos associados à categoria de outros defeitos (avinhado-avinagrado e mofo) (COI, 2011).

ND: Defeito não detetado pelo painel de provadores (i.e., intensidade igual a 1 para efeitos de tratamento de dados numa escala de intensidades de 1 a 11).

**Tabela 7.** (continuação).

Amostra	Defeito sensorial e respetivas intensidades				
	Fermentação anormal <sup>a</sup>			Outros Defeitos <sup>b</sup>	
	<i>Butírico</i>	<i>Pútrido</i>	<i>Sapateira</i>	<i>Avinhado-avinagrado</i>	<i>Mofo</i>
23	N.D	N.D	3 (2-5)	N.D	N.D
24	N.D	N.D	N.D	2,5 (1,5-3,5)	3 (2,5-5)
25	N.D	N.D	3 (1,5-4)	N.D	N.D
26	N.D	N.D	N.D	2,5 (1,5-3)	N.D
27	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
28	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
29	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
30	N.D	4 (3,5-4,5)	N.D	6 (5-6,5)	N.D
31	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
32	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
33	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
34	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
35	N.D	2,5 (1,5-3,5)	N.D	4,5 (3-5)	N.D
36	N.D	N.D	2,5 (1,5-3,5)	4,5 (3,5-6)	2,5 (1,5-3,5)
37	N.D	N.D	N.D	N.D	4 (3-4)
38	N.D	6 (3,5-7)	N.D	2,5 (1,5-4,5)	N.D
39	N.D	N.D	N.D	2,5 (1,5-6)	N.D
40	N.D	N.D	N.D	3 (1,5-3,5)	N.D
41	7 (6-8,5)	N.D	N.D	N.D	5 (4-5,5)
42	8 (7-8,5)	N.D	N.D	N.D	5 (4-7)
43	N.D	N.D	N.D	N.D	10 (8-10,5)
44	8 (7-8,5)	N.D	N.D	N.D	7 (6,5-8)

<sup>a</sup>Defeitos associados à categoria de fermentação anormal (butírico, pútrido e sapateira) (COI,2011).

<sup>b</sup>Defeitos associados à categoria de outros defeitos (avinhado-avinagrado e mofo) (COI, 2011).

ND: Defeito não detetado pelo painel de provadores (i.e., intensidade igual a 1 para efeitos de tratamento de dados numa escala de intensidades de 1 a 11).

A Tabela 7 apresenta as medianas das intensidades atribuídas para cada defeito organolético detetado em cada uma das amostras analisadas bem como a gama de intensidades (menor valor atribuído e maior valor atribuído pelo painel).

De acordo com a análise sensorial (que leva em conta a avaliação simultânea das azeitonas e das salmouras), apenas em 7 amostras de azeitonas de mesa e suas respetivas salmouras é que o painel de provadores não foi capaz de identificar qualquer defeito organolético (Tabela 4). Para todas as outras 37 amostras, pelo menos um atributo negativo de um conjunto de 5 defeitos sensoriais (avinhado-avinagrado, butírico, pútrido, mofo e sapateira) foi detetado.

## **5.2. Avaliação do potencial da LE na quantificação da intensidade de defeitos organoléticos presentes em amostras comerciais de azeitonas de mesa**

A ocorrência de uma fermentação anormal na produção de azeitonas de mesa pode levar ao aparecimento de um ou mais de 3 atributos organoléticos negativos (butírico, pútrido e sapateira) (COI, 2011). No presente trabalho para além de avaliar qualitativamente o desempenho da LE na discriminação (recorrendo a modelos LE-ADL-AS) destes defeitos utilizando soluções padrão, também foi possível determinar seu potencial na identificação destes defeitos em amostras reais de azeitonas de mesa (e soluções de salmoura) contendo um único defeito sensorial muito intenso (intensidades entre 8 e 11 numa escala de 1 a 11, com base na avaliação sensorial do painel de provadores). Foi ainda demonstrado a capacidade da LE em discriminar amostras reais de azeitonas de mesa com base na sua categoria comercial, estabelecida de acordo com a mediana da intensidade do defeito predominante (obtida com base na análise sensorial com painel de provadores).

No presente capítulo, pretendeu-se avaliar a possibilidade de usar os sinais potenciométricos da LE (tendo em conta simultaneamente a análise das pastas de azeitonas e das respetivas salmouras) para quantificar a mediana da intensidade de cada defeito detetado pelo painel de provadores nas 44 amostras comerciais de azeitonas de mesa, comparando o seu desempenho com a mediana das intensidades atribuídas pelo mesmo, bem como com a gama de intensidades registada (Tabela 7).

Assim sendo, o potencial da LE na quantificação dos níveis de intensidade dos atributos negativos presentes em amostras comerciais de azeitonas de mesa foi avaliado por recurso de regressão linear múltipla (RLM) acoplado ao algoritmo de arrefecimento simulado (AS). Como já mencionado, o algoritmo AS é um método de seleção de variáveis meta-heurístico que foi implementado para selecionar o menor subconjunto de sensores da LE (entre os 80 sinais registados pelos 40 sensores da LE durante a análise das pastas de azeitonas e das respetivas salmouras) capaz de permitir obter o melhor desempenho quantitativo de previsão. Neste estudo recorreu-se a modelos de LE-RLM-AS uma vez que num estudo recente Rodrigues e co-autores (2016) constaram que esta estratégia de modelização apresentava um desempenho de previsão superior comparativamente a modelos de RCP e MQP.

A capacidade de previsão dos modelos LE-RLM-AS estabelecidos (contendo entre 2 e 42 sinais de sensores de entre os 80 registados durante a análise das pastas e das salmouras) para cada um dos 5 defeitos detetados nas amostras foi avaliada recorrendo à validação cruzada LOO (*leave-one-out*) e à validação cruzada K-folds com repetições. Este último procedimento de validação cruzada foi implementado para 4 folds e para 10 repetições, permitindo minimizar o risco de sobreajuste (*overfitting*) (responsável pelo estabelecimento de modelos de previsão são pouco realistas (isto é, otimistas)), uma vez que pelo menos 25% das amostras originais são utilizadas exclusivamente para efeitos de previsão

Na Tabela 8 encontra-se sumariada a informação relativa aos modelos LE-RLM-AS estabelecidos para a quantificação da mediana das intensidades de cada um dos 5 atributos negativos (butírico, pútrido e sapateira, associados à fermentação anormal e avinhado-avinagrado e mofo, associados à categoria de outros defeitos) detetados pelo painel de provadores durante a análise das 44 amostras comerciais de azeitonas (com base na avaliação sensorial simultânea das azeitonas e respetivas salmouras), a gama de intensidades atribuídas pelos 8 membros do painel sensorial se encontra descrita na Tabela 7.

A qualidade dos resultados de regressão obtidos para os 2 procedimentos de validação cruzada utilizados neste trabalho (LOO e K-folds com repetição) pode ser visualizada nas Figuras 7 a 11 para os defeitos butírico, pútrido, sapateira, avinhado-avinagrado e mofo, respetivamente. Como era esperado, no caso da validação cruzada K-folds com 10 repetições, as previsões obtidas com os modelos LE-RLM-AS para as medianas dos defeitos apresentam uma maior variabilidade comparativamente à técnica de LOO (sendo no entanto este último menos realista devido a possíveis efeitos de sobreajuste (*overfitting*) dos modelos LOO estabelecidos). De facto, a situação que melhor poderá mimetizar a variabilidade das intensidades percebidas para cada defeito por cada um dos 8 membros do painel de provadores na avaliação de cada amostra de azeitona de mesa, (como se indica na Tabela 7) e a obtida para o procedimento K-folds com repetição. É de realçar que a variabilidade encontrada nos resultados de previsão dos modelos LE-RLM-AS para a técnica de validação cruzada K-folds com repetição, para cada defeito, é regra geral, inferior ou da mesma ordem de grandeza da variabilidade das intensidades dos defeitos percebidos pelo painel de provadores para uma mesma amostra. Esta constatação pode ser observada nas 7B a 11B, onde os resultados de previsão

(símbolo “○”) estão compreendidos entre as intensidades mínima e máxima percebidas (como indicado na Tabela 7) pelos membros do painel de provadores (símbolo “\_\_\_”).

**Tabela 8.** Modelos LE-RLM-AS estabelecidos para a quantificação da mediana das intensidades de 5 atributos negativos detetados pelo painel de provadores em 44 amostras comerciais de azeitonas.

Classe do defeito	Atributo negativo	Modelos LE-RLM-AS <sup>a</sup>		
		Nº de sinais <sup>b</sup>	Coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> )	
sensorial		Validação cruzada		
			<i>LOO</i> <sup>c</sup>	<i>K-folds com repetição</i> <sup>d</sup>
Fermentação anormal	Butírico	24 <sup>e</sup>	0,993	0,98 ± 0,02
	Pútrido	29 <sup>f</sup>	0,989	0,97 ± 0,02
	Sapateira	24 <sup>g</sup>	0,988	0,99 ± 0,04
Outros defeitos	Avinhado-avinagrado	28 <sup>h</sup>	0,989	0,98 ± 0,01
	Mofo	28 <sup>i</sup>	0,996	0,98 ± 0,02

<sup>a</sup> Modelo de regressão linear múltipla (RLM) baseado em sinais da língua eletrônica (LE) selecionados recorrendo ao algoritmo de arrefecimento simulado (AS).

<sup>b</sup> Número de sinais incluídos no modelo LE-RLM-AS, selecionados de entre 80 sinais eletroquímicos registados pela LE durante a análise de cada pasta de azeitona (40 sinais referentes aos 40 sensores da LE) e respetiva salmoura (40 sinais referentes aos 40 sensores da LE).

<sup>c</sup> Método de validação cruzada LOO (*leave-one-out*), ou seja, deixar um de fora.

<sup>d</sup> Método de validação cruzada K-folds com repetição (K = 4 folds garantindo que pelo menos 25% dos dados originais são usados para validação interna, com 10 repetições)

<sup>e</sup> Sinais incluídos no modelo LE-RLM-AS: 11 sinais registados durante a análise das salmouras (S1:8, S1:12, S1:16, S1:20, S2:1, S2:3, S2:4, S2:10, S2:12, S2:13 e S2:15) e os restantes relativos à resposta de 13 sensores durante a análise das pastas de azeitona (S1:6, S1:9, S1:10, S1:11, S1:13, S1:15, S1:16, S2:2, S2:4, S2:5, S2:8, S2:13 e S2:16)

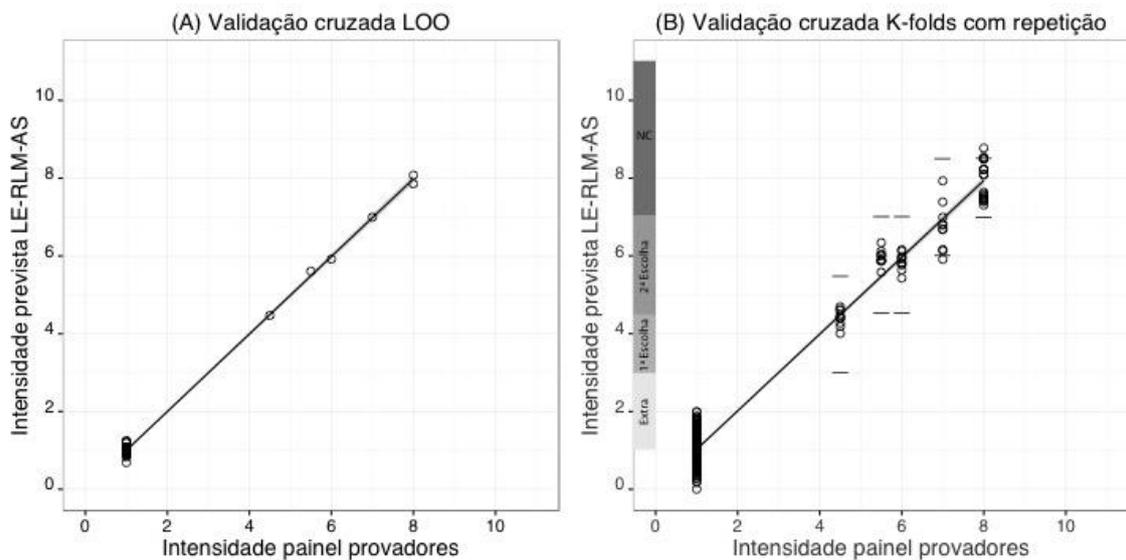
<sup>f</sup> Sinais incluídos no modelo LE-RLM-AS: 14 sinais registados durante a análise das salmouras (S1:2, S1:6, S1:12, S1:15, S1:16, S1:18, S1:19, S2:1, S2:3, S2:9, S2:12, S2:14, S2:16 e S2:17) e os restantes relativos à resposta de 15 sensores durante a análise das pastas de azeitona (S1:5, S1:6, S1:7, S1:9, S1:13, S1:15, S1:17, S1:19, S2:1, S2:3, S2:7, S2:13, S2:16, S2:17 e S2:19),

<sup>g</sup> Sinais incluídos no modelo LE-RLM-AS: 13 sinais registados durante a análise das salmouras (S1:1, S1:3, S1:4, S1:5, S1:8, S1:18, S1:19, S2:1, S2:6, S2:8, S2:10, S2:12, S2:15) e 11 durante a análise de pasta de azeitonas: (S1:4, S1:6, S1:7, S1:9, S2:2, S2:4, S2:9, S2:10, S2:14, S2:16 e S2:17).

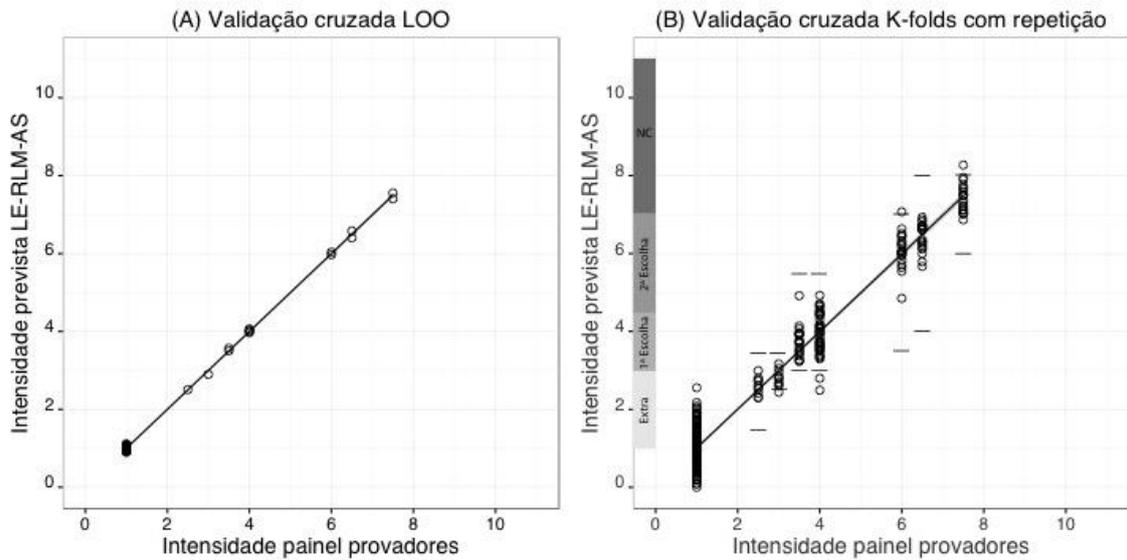
<sup>h</sup> Sinais incluídos no modelo LE-RLM-AS: 17 sinais registados durante a análise das salmouras (S1:2, S1:3, S1:4, S1:8, S1:9, S1:11, S1:15, S1:17, S1:18, S1:19, S1:20, S2:4, S2:9, S2:11, S2:12, S2:13 e S2:20) e os restantes 11 durante a análise das pastas de azeitonas (S1:3, S1:13, S1:17, S1:18, S2:3, S2:4, S2:9, S2:11, S2:12, S2:13 e S2:15).

<sup>i</sup> Sinais incluídos no modelo LE-RLM-AS: 16 sinais registados durante a análise das salmouras (S1:2, S1:3, S1:4, S1:9, S1:10, S1:12, S1:13, S1:20, S2:3, S2:4, S2:9, S2:12, S2:14, S2:15, S2:18 e S2:40) e 12 durante os ensaios eletroquímicos das pastas de azeitona (S1:1, S1:3, S1:9, S1:12, S1:14, S2:1, S2:8, S2:11, S2:12, S2:13, S2:17 e S2:18).

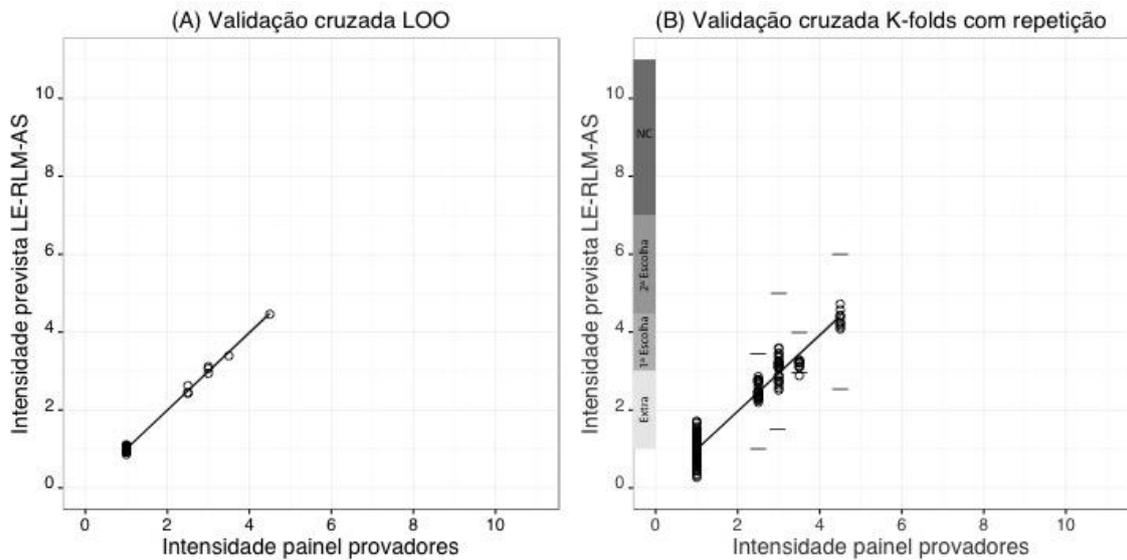
Mais ainda, com base na informação constante nas referidas Figuras, é ainda possível verificar que, apesar da variabilidade obtida nas previsões das intensidades de cada defeito com os modelos de LE-RLM-AS, a maioria das amostras seriam classificadas corretamente de acordo com a categoria comercial estabelecida seguindo as diretrizes de classificação do COI (2011) e discutidas, de um ponto de vista qualitativo, no capítulo 4.



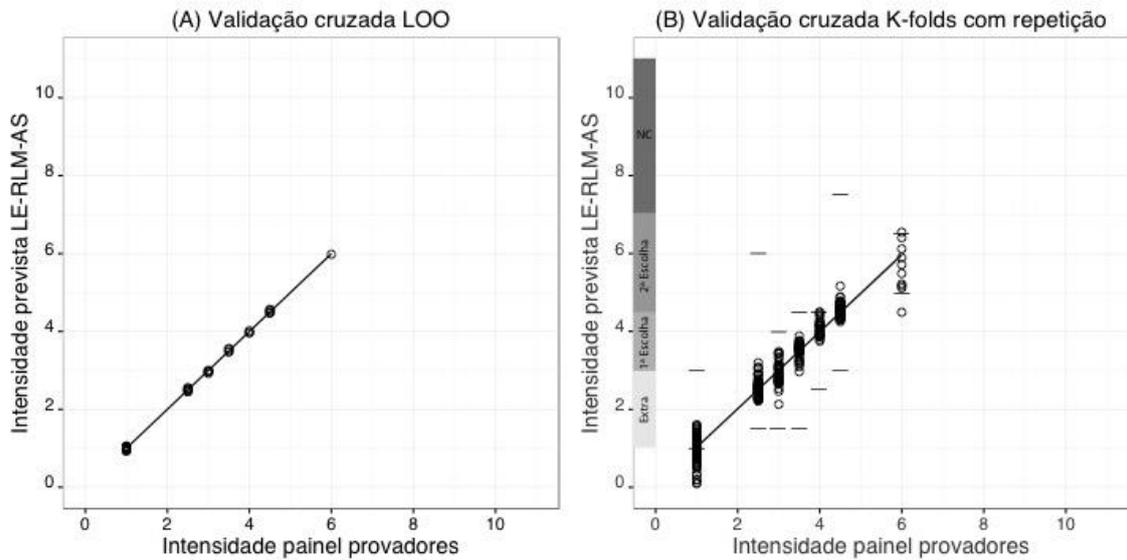
**Figura 7.** Quantificação das medianas das intensidades do defeito butírico (associado à fermentação anormal) detetado em 44 amostras de azeitonas de mesa (azeitonas e respetivas salmouras) utilizando o modelo LE-RLM-AS com base em 24 perfis de sinais potenciométricos: (A) validação cruzada LOO ( $R^2=0,993$ ); (B) validação cruzada K-folds com repetição ( $K = 4$  folds com 10 repetições,  $R^2= 0,98 \pm 0,02$ .)



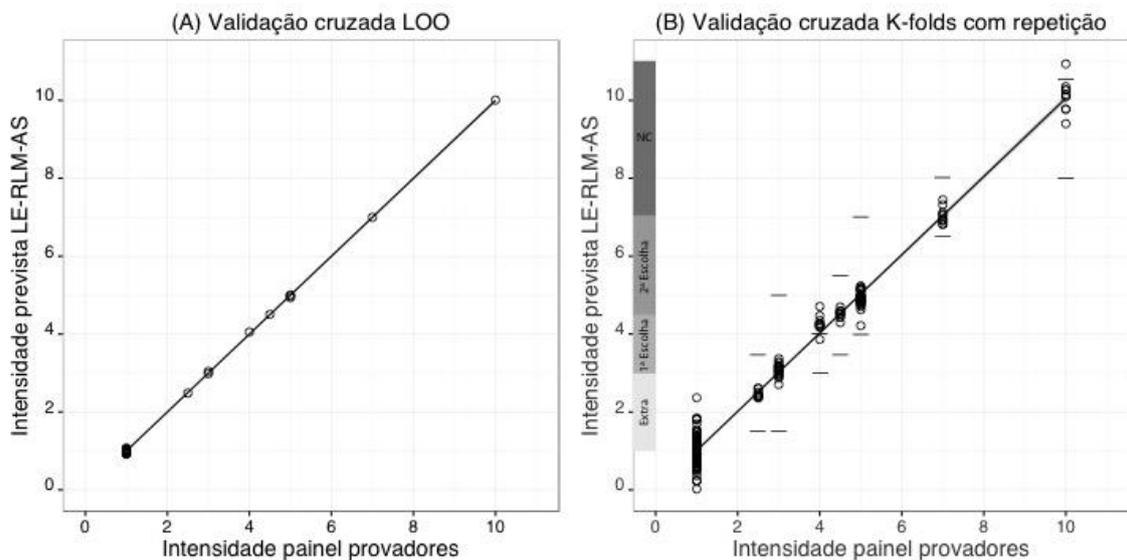
**Figura 8.** Quantificação das medianas das intensidades do defeito pútrido presente em 44 amostras de azeitonas de mesa e suas respectivas salmouras utilizando modelos LE-RLM-AS: (A) validação cruzada LOO  $R^2=0,989$ ; perfil de sinais de 29 sensores; (B) validação cruzada K-folds com repetição (K = 4 folds com 10 repetições  $R^2: 0,97 \pm 0,02$ .)



**Figura 9.** Quantificação das medianas das intensidades do defeito sapateira presente em 44 amostras de azeitonas de mesa e suas respectivas salmouras utilizando modelos LE-RLM-AS: (A) validação cruzada LOO:  $R^2=0,988$ ; perfil de sinais de 24 sensores; (B) validação cruzada K-folds com repetição (K = 4 folds com 10 repetições  $R^2: 0,99 \pm 0,04$ .)



**Figura 10.** Quantificação das medianas das intensidades do defeito avinhado-avinagrado (associado à categoria de outros defeitos) presente em 44 amostras de azeitonas de mesa e suas respectivas salmouras utilizando modelos LE-RLM-AS: (A) validação cruzada LOO  $R^2=0,989$ ; perfil de sinais de 28 sensores; (B) validação cruzada K-folds com repetição (K = 4 folds com 10 repetições  $R^2: 0,98 \pm 0,01$ ).



**Figura 11.** Quantificação das medianas das intensidades do defeito mofo presente em 44 amostras de azeitonas de mesa e suas respectivas salmouras utilizando modelos LE-RLM-AS: (A) validação cruzada LOO:  $R^2=0,996$ ; perfil de sinais de 28 sensores; (B) validação cruzada K-folds com repetição (K = 4 folds com 10 repetições  $R^2: 0,98 \pm 0,02$ ).

Por fim, a potencialidade dos modelos de LE-RLM-AS previamente desenvolvidos como uma metodologia complementar ou alternativa às provas sensoriais

realizadas por um painel treinado de provadores foi avaliada, com base nos parâmetros obtidos a partir da regressão linear simples (declive e ordenada na origem) entre as intensidades de cada defeito previstas pelos referidos modelos multivariados versus os valores das medianas das intensidades percebidas pelo painel de provadores (método de referência para a análise sensorial de azeitonas de mesa, de acordo com o COI (2011). Assim sendo, a metodologia LE-RLM-AS só pode ser considerada uma técnica alternativa/complementar do método de referência se o declive e a ordenada na origem da regressão linear simples forem, de um ponto de vista estatístico, iguais aos teoricamente esperados para um ajuste linear perfeito, ou seja, iguais a um e zero, respetivamente (Roig and Thomas, 2003a, 2003b).

Na Tabela 9 apresentam-se os resultados relativos às regressões lineares simples estabelecidas para cada um dos 5 defeitos organoléticos avaliados, nomeadamente, os coeficientes de determinação ( $R^2$ ), os valores dos declives, ordenadas na origem e respetivos intervalos de confiança (a 95%). Os resultados obtidos, quer para a validação cruzada LOO quer para a validação cruzada K-folds com repetição demonstram que, para um nível de significância de 5%, os declives e ordenadas na origem (relativos a cada regressão linear simples) são estatisticamente iguais aos valores teóricos esperados, uma vez que os respetivos intervalos de confiança contêm os valores um e zero, respetivamente. Estes resultados confirmaram a potencialidade dos modelos LE-RLM-AS propostos e permitem antever a sua possível aplicação prática na avaliação sensorial de azeitonas de mesa, reduzindo o número total de amostras que têm de ser sujeitas à avaliação sensorial por painel treinado de provadores. Com efeito, o desempenho quantitativo global satisfatório alcançado é um indicador de que a abordagem proposta poderia ser implementada, como uma técnica de rotina, complementarmente da tradicional análise sensorial de azeitonas de mesa. Este facto, aliado à simplicidade dos sistemas eletroquímicos (LE), ao seu baixo custo, rapidez de análise e quase ausência de pré-tratamento das amostras (requerendo apenas uma diluição com água e posterior esmagamento no caso das azeitonas) constituem as principais vantagens das LE, que podem ser vistas não só como sistemas de sensores de sabores básicos mas também de atributos sensoriais negativos.

**Tabela 9.** Parâmetros da regressão linear simples estabelecida entre os valores das intensidades dos defeitos previstas (validação cruzada LOO (*leave-one-out*) e K-folds com repetição) pelo modelo LE-RLM-AS e os respectivos valores das medianas das intensidades dos defeitos percebidos pelo painel de provadores, para os 5 atributos negativos detetados nas amostras de azeitona de mesa (3 associados à fermentação anormal e 2 que se enquadram na categoria de outros defeitos) (COI, 2011): coeficiente de determinação ( $R^2$ ); declives, ordenadas na origem e respectivos intervalos de confiança (IC) a 95%.

Parâmetros de regressão linear	Defeitos sensoriais associados à fermentação anormal									
	Butírico (24 sinais-LE)		Pútrido (29 sinais-LE)		Sapateira (24 sinais-LE)		Avinhado-avinagrado (28 sinais-LE)		Mofo (28 sinais-LE)	
	<i>LOO</i> <sup>c</sup>	<i>K-folds</i> <sup>d</sup>	<i>LOO</i> <sup>c</sup>	<i>K-folds</i> <sup>d</sup>	<i>LOO</i> <sup>c</sup>	<i>K-folds</i> <sup>d</sup>	<i>LOO</i> <sup>c</sup>	<i>K-folds</i> <sup>d</sup>	<i>LOO</i> <sup>c</sup>	<i>K-folds</i> <sup>d</sup>
$R^2$	0,993	0,965	0,989	0,961	0,989	0,931	0,989	0,967	0,996	0,982
Declive	0,990	0,989	1,002	0,998	0,976	0,978	0,993	0,988	0,999	1,006
Declive IC <sup>a</sup>	[0,954; 1,026]	[0,971; 1,001]	[0,970; 1,034]	[0,979; 1,017]	[0,922; 1,030]	[0,952; 1,002]	[0,961; 1,026]	[0,971; 1,004]	[0,981; 1,023]	[0,993; 1,020]
Ordenada na origem	0,020	0,003	-0,003	-0,001	0,021	0,013	0,005	0,040	0,004	-0,0003
Ordenada na origem IC <sup>b</sup>	[-0,07; 0,114]	[-0,147; 0,008]	[0,100; 0,095]	[-0,058; 0,056]	[-0,065; 0,107]	[-0,003; 0,053]	[-0,085; 0,096]	[0,001; 0,009]	[-0,047; 0,055]	[-0,003; 0,003]

<sup>a</sup>Intervalo de confiança a 95% para o declive.

<sup>b</sup>Intervalo de confiança a 95% para a ordenada na origem.

<sup>c</sup>Técnica de validação cruzada LOO (*leave-one-out*).

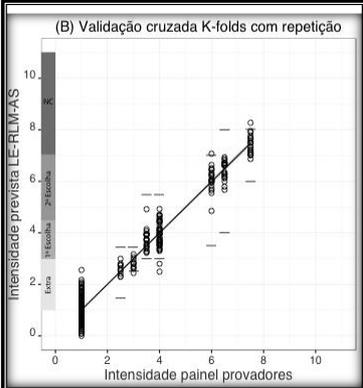
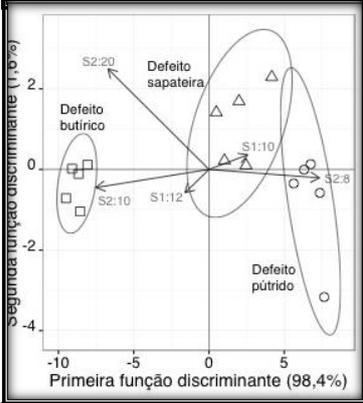
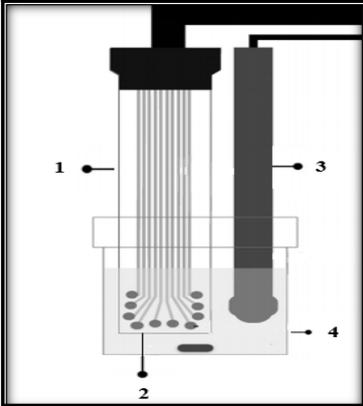
<sup>d</sup>Técnica de validação cruzada K-folds com repetição (K=4; 10 repetições).

A qualidade do desempenho quantitativo dos modelos multivariados LE-RLM-AS na previsão das intensidades de defeitos organoléticos habitualmente presentes em amostras de azeitonas de mesa constitui uma das principais novidades e contributos do presente estudo no âmbito da análise sensorial de azeitonas de mesa podendo ser visto como prova da aplicabilidade de estratégias eletroquímicas (LE) no controlo de qualidade sensorial de azeitonas de mesa bem como na classificação das mesmas de acordo com a categoria comercial recomendada pelo COI (2011).

De facto, é de salientar que não foi possível encontrar na literatura, nenhum trabalho relativo à aplicação de sensores eletroquímicos, como por exemplo LE potenciométricas, na avaliação organolética da qualidade de azeitonas de mesa, com base na análise quantitativa de atributos negativos em geral detetados por painel de provadores durante as provas sensoriais de azeitonas e usados na classificação comercial de azeitonas de mesa de acordo com as diretivas do COI (2011). Com efeito, no que respeita à análise sensorial de produtos olivícolas, tal como já referido, a aplicação de LE (potenciométricas e/ou voltamétricas) tem-se restringido à avaliação de atributos sensoriais positivos em azeites (Rodríguez-Méndez *et al.*, 2010; Apetrei *et al.*, 2010, 2016) ou à classificação de azeites de acordo com a sua intensidade (intenso, médio ou suave), com base na intensidade de atributos organoléticos positivos, avaliados por um painel de provadores (Velo *et al.*, 2016). Alguns estudos têm sido descritos igualmente para a avaliação sensorial de azeites (atributos positivos) com base em sistemas eletroquímicos que tentam mimetizar a sensação do olfato - narizes eletrónicos (Escuderos *et al.*, 2010, 2011).

Relativamente à avaliação de defeitos sensoriais, os estudos disponíveis na literatura referem-se à análise de azeites (Borràs *et al.*, 2015; Caciotta *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016). Borràs e colaboradores (2016) propuseram uma metodologia baseada em espectroscopia de infravermelho acoplada a métodos estatísticos multivariados para identificar defeitos organoléticos (avinhado-avinagrado, mofo, ranço e tulha) para distinguir azeites virgem extra dos de menor qualidade. Mais recentemente, Caciotta e co-autores (2016) obtendo um mapeamento bidimensional dos aromas com base em modelos não-lineares procederam à avaliação de atributos positivos (verde/frutado) e negativos (avinhado-avinagrado e ranço) em azeites virgem extra recorrendo a painel de provadores e redes neurais. Por fim, Zhu e colaboradores (2016) utilizaram microextração em fase sólida acoplada à técnica de cromatografia gasosa-espectrometria de massa para quantificarem defeitos organoléticos (ranço, tulha, avinhado-avinagrado) em azeites

virgens. Desse modo, evidencia-se a promissoriedade da utilização de métodos eletroquímicos na avaliação da qualidade de produtos olivícolas.



# Capítulo 6.

## Discussão geral e conclusões



A avaliação da qualidade sensorial de azeitonas de mesa, nomeadamente a classificação do produto de acordo com a sua categoria comercial segue as normas estabelecidas pelo COI e tem por base a avaliação de defeitos organoléticos percebidos por um painel de provadores treinado durante as provas conjuntas de azeitonas e respetivas salmouras. Este procedimento reveste-se não só de um certo grau de subjetividade intrínseco ao processo de cariz individual de avaliação por parte de cada membro do painel, cujo treino é uma tarefa complexa, demorada e dispendiosa. Para além disso, o recurso a um painel de provadores limita em muito o número máximo de amostra que podem ser avaliadas diariamente, atendendo não só aos tempos de espera exigidos entre provas como também à disponibilidade de tempo de cada membro do painel para realizá-las.

De modo a suprir a necessidade de metodologias analíticas rápidas, económicas e eficazes para a avaliação sensorial de azeitonas de mesa (que requer a avaliação organolética de defeitos presentes em azeitonas e respetivas salmouras) estudou-se, pela primeira vez, a viabilidade de utilizar uma LE para esse fim. Com efeito, a simplicidade, rapidez e baixo custo das LE, aliado ao mínimo pré-tratamento das amostras, constituem as principais vantagens deste tipo de sistemas de multi-sensores eletroquímicos, que embora sejam reconhecidos como sensores de sabores básicos, poderão também ser aplicados como sensores atributos sensoriais negativos.

Neste trabalho procedeu-se ao desenvolvimento de modelos estatísticos multivariados qualitativos (ADL acoplada ao algoritmo AS) e quantitativos (RLM acoplado ao algoritmo AS), estabelecidos com base em informação relevante contida nos perfis de sinais potenciométricos dos sensores da LE, para aferir indireta- ou diretamente da presença e intensidade de atributos organoléticos negativos geralmente presentes nas amostras de azeitonas de mesa, e de acordo com a avaliação sensorial do painel de provadores.

A capacidade da abordagem LE-ADL-AS foi demonstrada com sucesso:

- i) Na classificação correta (sensibilidades de previsão  $\geq 98\%$ ) de soluções padrão (ácido cítrico, ácido tartárico, cafeína, quinino, cloreto de sódio e cloreto de potássio) de acordo com o sabor básico que mimetizam (ácido, amargo e salgado);
- ii) Na classificação correta (sensibilidades de previsão  $\geq 93\%$ ) de soluções padrão (ácido n-butírico, 2-mercaptoetanol e ácido ciclohexanocarboxílico) de acordo com o defeito sensorial que mimetizam (butírico, pútrido ou sapateira);

- iii) Na classificação correta (sensibilidades de previsão  $\geq 93\%$ ) de amostras de referência de azeitonas e salmouras (presença de um defeito único intenso) de acordo com o tipo de defeito percebido pelo painel (avinhado-avinagrado, butírico, mofo, pútrido ou sapateira), e selecionadas pelo painel de provadores (sensibilidades  $\geq 93\%$ ); e,
- iv) Na classificação correta (sensibilidade  $\geq 86\%$ ) de amostras de azeitonas de mesa com grande heterogeneidade, contendo um ou mais defeitos organoléticos percebidos pelo painel de provadores nas azeitonas e/ou salmouras, de acordo com a sua categoria comercial (azeitona extra sem defeito, extra, 1ª escolha, 2ª escolha e azeitonas que não podem ser comercializadas como azeitonas de mesa).

Por fim, o potencial da LE para quantificar as medianas das intensidades dos atributos negativos detetados pelo painel de provadores em azeitonas de mesa foi demonstrado recorrendo a modelos de RLM-AS. Os modelos estabelecidos para cada um dos defeitos sensoriais (butírico, pútrido, sapateira, avinhado-avinagrado e mofo) presentes nas amostras de azeitona de mesa, de acordo com a avaliação sensorial das azeitonas e salmouras realizada pelo painel de provadores, permitiram prever satisfatoriamente as medianas das intensidades dos defeitos ( $R^2 \geq 0,97$ ).

Globalmente, os resultados obtidos aliados à rapidez da análise eletroquímica (5-10 min), permitem antever a possibilidade de usar a LE como uma ferramenta complementar na classificação sensorial de azeitonas de mesa e/ou determinação da intensidade de defeitos organoléticos individuais presentes em amostras reais. A implementação deste tipo de sistema de multi-sensores permite, em teoria, reduzir substancialmente o tempo associado à avaliação sensorial (comparativamente com o requerido pelo painel de provadores), aumentar consideravelmente o número de amostras de azeitonas de mesa que podem ser aferidas diariamente, e conseqüentemente reduzir o número total de amostras (duvidosas) que têm de ser sujeitas à avaliação por um painel de provadores treinado, diminuindo substancialmente o custo associado a este tipo de avaliação.

Tendo em conta o desempenho satisfatório da LE relativamente à análise da qualidade sensorial de azeitonas de mesa, nomeadamente ao nível de atributos negativos, em trabalhos futuros, pode-se sugerir a utilização da LE juntamente com métodos quimiométricos na análise de parâmetros físico-químicos (como por exemplo,

composição em ácidos gordos, polifenóis e composição em tocoferóis) de azeitonas de mesa ou mesmo de azeitonas utilizadas na produção de azeite, contribuindo deste modo para aumentar a competitividade comercial da fileira oleícola, que é uma fileira estratégica na política agrícola e na economia portuguesa e europeia.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apetrei, C., Apetrei, I.M., Villanueva, S., de Saja, J.A., Gutierrez-Rosales, F., Rodriguez-Mendez, M.L., (2010). Combination of an e-nose, an e-tongue and an e-eye for the characterisation of olive oils with different degree of bitterness. *Anal Chim Acta*, 663, 91-97.

Apetrei, I.M., Apetrei, C., (2013). Voltammetric e-tongue for the quantification of total polyphenol content in olive oils. *Food Research International*, 54, 2075-2082.

Apetrei, C., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Apetrei, I.M., (2016). Chapter 27 - Olive Oil and Combined Electronic Nose and Tongue. In M. R. Mendez (Ed.), *Electronic Noses and Tongues in Food Science*, (pp. 277-289), Oxford: Academic Press, Elsevier Inc.

Boskou, G., Salta, F.N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A. & Andrikopoulos, N.K., (2006). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from Greek market. *Food Chemistry*, 94, 558-564.

Borràs, E., Mestres, M., Acenã, L., Busto, O., Ferré, J., Boqué, R., Calvo, A., (2015). Identification of olive oil sensory defects by multivariate analysis of mid infrared spectra. *Food Chemistry*, 187, 197–203.

Brenes, M., Garcia, P. & Garrido, A., (1992). Phenolic compounds related to the black color formed during the elaboration of ripe olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1192-1196.

Caciotta, M., Giarnetti, S., Leccese, F., Orioni, B., Oreggia, M., Pucci, C., Rametta, S., (2016). Flavors mapping by Kohonen network classification of Panel Tests of Extra Virgin Olive Oil. *Measurement*, 78, 366–372.

Cadima, J., Cerdeira, J. O., & Minhoto, M., (2004). Computational aspects of algorithms for variable selection in the 410 context of principal components. *Computational Statistics & Data Analysis*, 47, 225-236.

Cadima, J., Cerdeira, J. O., Silva, P. D. & Minhoto, M., (2012). The subselect R package, (<http://cran.rproject.org/web/packages/subselect/vignettes/subselect.pdf>).

Codinachs, L.M., Kloock, J.P., Schöning, M.J., Baldi, A., Ipatov, A., Bratov, A., *et al.*, (2008). Electronic integrated multisensor tongue applied to grape juice and wine analysis, *Analyst*, 133, 1440–1448.

Casale, M., Zunin, P., Elisabetta, M.C., Pistarino, E., Perego, P., Lanteri, S., (2010). Characterisation of table olive cultivar by NIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 122, 1261–1265.

Chen, R., Hidekazu, I., Toko, K., (2010). Development of sensor with high selectivity for saltiness and its application in taste evaluation of table salt, *Sensors and Materials*, 22, 313–325.

Cimato, A., Dello-Monaco, D., Distante, C., Epifani, M., Siciliano, P., Taurino, A.M., Zuppa, M., Sani, G., (2006). Analysis of single-cultivar extra virgin olive oils by means of Electronic Nose and HS-SPME/GC/MS methods. *Sensors Actuators B*, 114:674-680.

*Codex Alimentarius*, (2010). Proposed Draft Codex Standard for Table Olives (Revision of Codex Stan, 66-1981).

COI - Conselho Oleícola Internacional, (2004). Trade standard applying to table olives. (<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/222-standards>). Acedido em 10 de janeiro de 2016.

COI - Conselho Oleícola Internacional, (2011). Method For The Sensory Analysis Of Table Olives. (<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/224-testing-methods>). Acedido em 10 de fevereiro de 2016.

COI - Conselho Oleícola Internacional, (2013). Olive oil Market and informative newsletter (p.5). <http://www.internationaloliveoil.org/news/view/682-year-2015-news/585-market-newsletter-march-2015>. Acedido em 22 janeiro de 2016.

COI - Conselho Oleícola Internacional, (2015). Market Newsletter N° 97 September (p.5). (<http://www.internationaloliveoil.org/news/view/682-year-2015-news/628-market-newsletter-september-2015>). Acedido em 9 de fevereiro de 2016.

Correia, D.P.A., Magalhães, J.M.C.S., Machado, A.A.S.C., (2005). Array of potentiometric sensors for simultaneous analysis of urea and potassium, *Talanta*, 67, 773–782.

Cosio, M.S., Ballabio, D., Benedetti, S., Gigliotti, C., (2006). Geographical origin and authentication of extra virgin olive oils by an electronic nose in combination with artificial neural networks. *Analytica Chimica Acta*, 567, 202-210.

De Castro, A. & Brenes, M., (2001). Fermentation of washing waters of Spanish-style green olive processing. *Process Biochemistry*, 36, 797-802.

Dias, L. G., Peres, A. M., Vilas-Boas, M., Rocha, M. A., Estevinho, L., Machado, A. A. S. C., (2008). An electronic tongue for honey classification, *Microchimica Acta*, 163, 97-102.

Dias, L.G. Peres, A. M., Veloso, F. Reis, M. Vilas-Boas, Machado, A., (2009). An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk, *Sensors and Actuators B*, 136, 209–217

Dias, L.G., Peres, A.M., Barcelos, T.P., Sá Morais, J., Machado, A.A.S.C., (2011). Semi-quantitative and quantitative analysis of soft drinks using an electronic tongue, *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 154, 111-118.

Dias L.G., Sequeira C., Veloso A.C.A., Sousa M.E.B.C., Peres A.M., (2014a). Evaluation of Healthy and Sensory Indexes of Sweetened Beverages using an Electronic Tongue, *Analytica Chimica Acta*, 848, 32-42.

Dias L.G., Fernandes A., Veloso A.C.A., Machado A.A.S.C., Pereira J.A., Peres A.M., (2014b). Single-cultivar extra virgin olive oil classification using a potentiometric electronic tongue, *Food Chemistry*, 160, 321–329.

Dias, L.G., Rodrigues N., Veloso, A.C.A., Pereira J.a, Peres, A.M., (2016a). Monovarietal extra virgin olive oils classification: a fusion of human sensory attributes and na electronic tongue, *European Food Research and Technology*, 242, 259-270.

Dias, L.G., Alberto, Z., Veloso, A.C.A., Peres, A.M., (2016b). Electronic tongue: a versatile tool for mineral and fruit-flavored waters recognition. *Journal of Food Measurement and Characterization*, (DOI: 10.1007/s11694-015-9303-y).

Dias, M.E.B.C.D.S., (2013). Língua eletrónica potenciométrica : uma ferramenta para análise da qualidade do mel . Mestrado em Química. Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.

Escuder-Gilabert, L., Peris, M., (2010). Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis, *Analytica Chimica Acta*, 665, 15–25.

Escuderos, M.E., Sánchez, S., Jiménez, A., (2010). Virgin olive oil sensory evaluation by an artificial olfactory system, based on Quartz Crystal Microbalance (QCM) sensors. *Sensors Actuators B*, 147, 159–164.

Escuderos, M.E., Sánchez, S., Jiménez, A., (2011). Quartz Crystal Microbalance (QCM) sensor arrays selection for olive oil sensory evaluation. *Food Chemistry*, 124, 857–862.

Fernández, A.G., Díez, M.J.F. & Adams, M.R., (1997). *Table olives. Production and Processing*. Chapman & Hall. London, UK.

Fernández, M.J., Castro, R., Garrido, A., González, F., González, F., Nosti, M, Heredia, A., Minguéz, M.I., Rejano, L., Dúran, M.C., Sánchez, F., Garcia, P. & Castro, A., (1985). *Biología de la aceituna de mesa*. Servicio de Publicaciones del CSIC. Madrid-Sevilla.

García-González, D.L., Aparicio, R., (2004). Classification of different quality virgin olive oils by metal-oxide sensors. *Euro Food Research and Technology*, 218, 484–487.

García, P., Durán, M.C. & Garrido, A., (1986). Envasado de aceitunas negras al natural fermentadas en medio aeróbico. *Grasas y Aceites*, 37, 95-96.

García, P., Brenes, M., Vattan, T. & Garrido, A., (1992). Kinetic study at different pH of the oxidation process to produce ripe olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 327-331.

García, P., Brenes, M. & Garrido, A., (1994). Effects of Ph and salts on the firmness of canned ripe olives. *Sciences des Aliments*, 14, 159-172.

García, P., Brenes, M., Romero, C. & Garrido, A., (2001). Color fixation in ripe olives. Effect of the type of iron salt and other processing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1364-1370.

Garrido, A., García, P., Brenes, M. & Romero, C., (1995). Iron content and colour of olives. *Nahrung/Food*, 39, 67-76.

Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K. M.; Gilani, A. H.; Saari, N., (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) - A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3291- 3340.

Gómez, A.H.S., Garcia, P.G. & Navarro, L.R., (2006). Trends in table olive production. Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, 57, 86-94.

González, F., Rejano, L. & González, F., (1982). La pasterización de aceitunas estilo sevillano, I. *Grasas y Aceites*, 33, 201-207.

Graham, J.M., (2001). Problems with stepwise procedures in discriminant analysis. Paper presented at the annual meeting of the Southwest Educational Research Association, New Orleans, LA.

Guzman, E., Baeten, V., Pierna, A.F., García-Mesa, J.A., (2013). Infrared machine vision system for the automatic detection of olive fruit quality. *Talanta*, 116, 894–898.

Ha, D., Hu, N., Wu, C., Kirsanov, D., Legin, A., Khaydukova, M., et al., (2012). Novel structured light-addressable potentiometric sensor array based on PVC membrane for determination of heavy metals, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 174, 59–64.

Ha, D. Sun, Q., Su, K., Wan, H., Li, H., Xu, N., Sun, F., Zhuang, L., Hu, N., Wang, P., (2015). Recent achievements in electronic tongue and bioelectronic tongue as taste sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 207(PB), 1136–1146.

Haddi, Z., Alami, H., El Bari, N., Tounsi, M., Barhoumi, H., Maaref, A., Jaffrezic-Renault, N., Bouchikhi, B., (2013) Electronic nose and tongue combination for improved classification of Moroccan virgin olive oil profiles. *Food Research International*, 54, 1488-1498.

Hayashi, N., Chen, R., Ikezaki, H., Ujihara, T., (2008). Evaluation of the umami taste intensity of green tea by a taste sensor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7384–7387.

Iiyama, S., Kuga, H., Ezaki, S., Hayashi, K., Toko, K., (2003). Peculiar change in membrane potential of taste sensor caused by umami substances, *Sensors and Actuators B. Chemical*, 91, 191–194.

INE, Estatísticas Agrícolas, (2013). Edição 2014. Instituto Nacional de Estatística, Portugal. ISBN 978-989-25-0265-6.

Kailis, S., Harris, D., (2007). Table olive processing: general aspects. In: Producing table olives. CSIRO publishing, Landlinks Press, Collingwood, Australia, pp. 131-189.

Kobayashi, Y., Hamada, H., Yamaguchi, Y., Ikezaki, H., Toko, K., (2009). Development of an artificial lipid-based membrane sensor with high selectivity and sensitivity to the bitterness of drugs and with high correlation with sensory score, IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering, 4, 710–719.

Kobayashi, Y., Habara, M., Ikezaki, H., Chen, R., Naito, Y., Toko, K., (2010). Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores. Sensors, 10, 411-3443.

Legin, A., Rudnitskaya, A., Vlasov, Y., Natale, C. Di., Mazzone, E., D'Amico, A., (2000). Application of electronic tongue for qualitative and quantitative analysis of complex liquid media, Sensors and Actuators B, 65, 232- 234.

Legin, A., Rudnitskaya, A., Lvova, L., Vlasov, Y., Natale, C. Di., D'Amico, A., (2002). Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception, Anal. Chim. Acta, 484, 33-44.

Maroco, J., (2003). Análise Estatística, com utilização do SPSS, Edições Sílabo, Lisboa, Portugal.

Manuel, Z., (2014). Análise de águas minerais com e sem sabor com uma língua eletrónica potenciométrica Análise de águas minerais com e sem sabor com uma língua eletrónica potenciométrica.

Matos, L. C., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Oliveira, M. B. P. P. (2007). Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. Food Chemistry, 102, 976-983.

McGarigal, K., Cushman, S., Stafford, S., (2000). Multivariate Statistics for Wildlife and Ecology Research, Springer-Verlag New York, Inc.

Meilgaard, M., Civille, G. V., Carr, B. T., (2007). Sensory Evaluation Techniques. 4ª Ed. Boca Raton: Crc Press, 448 p.

Moreno, L., Merlos, A., Abramova, N., Jimenez, C., Bratov, A., (2006). Multi-sensor array used as an electronic tongue for mineral water analysis, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116, 130–134.

Navarro, T.; Lorenzo, C.; Pérez, R. A., (2004). SPME analysis of volatile compounds from unfermented olives subjected to thermal treatment. *Anal. Bioanal. Chemical*, 379, 812–817.

Norma Portuguesa (NP) 3034, (2012). Azeitonas de mesa: definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem.

Oliveri, P., Baldo, M.A., Daniele, S., Forina, M., (2009). Development of a voltammetric electronic tongue for discrimination of edible oils. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 395, 1135–1143.

Panagou, E. & Tassou, C.C., (2006). Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. Conservolea green olives. *Food Microbiology*, 23, 738-746.

Panagou, E.Z., Sahgal, N., Magan, N., Nychas, G.-J.E., (2008). Table olives volatile fingerprints: Potential of an electronic nose for quality discrimination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134, 902–907.

Parinos, C. S.; Stalikas, C. D.; Giannopoulos, T. S.; Pilidis, G. A., (2007). Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *Journal of Hazardous Materials*, 145, 339-343.

Parra, V., Arrieta, A. A., Fernández-Escudero, J. A., RodríguezMéndez, M. L., De Saja, J. A., (2006). Electronic tongue based on chemically modified electrodes and voltammetry for the detection of adulterations in wines, *Sensors and Actuators B*, 118, 448-453.

Peres, A.M. Dias, L.G., Barcelos, T.P., Sá Morais, J., Machado, A.A.S.C., (2009). An electronic tongue for juice level evaluation in non-alcoholic beverages. *Procedia Chemistry*, 1, 1023-1026.

Peres, A.M., Veloso, A.C.A., Pereira, J. A., Dias, L. G., (2014). Electrochemical multi-sensors device coupled with heuristic or meta-heuristic selection algorithms for single-cultivar olive oil classification. *Procedia Engineering*, 87, 192–195.

Pestana, M. E. & Gageiro, J. N., (2005). Análise de dados para ciências sociais “A complementaridade do SPSS”, Edição Sílabo, Lisboa, Portugal, 4ª Edição

Polshin, E., Rudnitskaya, A., Kirsanov, D., Legin, A., Saison, D., Delvaux, F., et al., (2010). Electronic tongue as a screening tool for rapid analysis of beer, *Talanta*, 81, 88–94.

Rodrigues, N., Dias, L. G., Veloso, A.C.A., Pereira, J.A., Peres, A.M., (2016). Monitoring olive oils quality and oxidative resistance during storage using an electronic tongue, *LWT – Food Science and Technology*. No prelo (doi:10.1016/j.lwt.2016.07.002).

Rodríguez-Méndez, M.L., Apetrei, C., de Saja, J.A., (2010) Chapter 57 - Electronic Tongues Purposely Designed for the Organoleptic Characterization of Olive Oils Olives. In V. Preedy, & R. R. Watson (Eds.), *Olives and Olive Oil Health and Disease Prevention* (pp. 525-532). Oxford: Academic Press, Elsevier Inc.

Roing, B., Thomas, O., (2003a). Rapid estimation of global sugars by UV photodegradation and UV spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 477, 325–329.

Roing, B., Thomas, O., (2003b). UV monitoring of sugars during wine making. *Carbohydrate Research*, 38, 79–83.

Rudnitskaya, A., Nieuwoudt, H.H., Muller, N., Legin, A., du Toit, M., Bauer, F.F., (2010a). Instrumental measurement of bitter taste in red wine using an electronic tongue, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 3051–3060.

Rudnitskaya, A., Rocha, S., Legin, A., Pereira, V., Marques, J.C., (2010b). Evaluation of the feasibility of the electronic tongue as a rapid analytical tool for wine age prediction and quantification of the organic acids and phenolic compounds. The case-study of Madeira wine, *Analytica Chimica Acta*, 662, 82–89.

Rudnitskaya, A., Polshin, E., Kirsanov, D., Lammertyn, J., Nicolai, B., Saison, D., et al., (2009). Instrumental measurement of beer taste attributes using an electronic tongue, *Analytica Chimica Acta*, 646, 111–118.

Sánchez, G.A.H., Montaña, A.A. & Rejano, N.L., (1989). Optimización del processo de pasterización de aceitunas verdes. Asamblea de Miembros del Instituto de la Grasa, Noviembre.

Santos, C. S.; Cruz, R.; Cunha, S. C.; Casal, S., (2013). Effect of cooking on olive oil quality attributes. *Food Research International*, 54, 2016-2024.

Sequeira, C. B., (2012). Análises de açúcares e ácidos em sumos comerciais: aplicação da língua eletrónica. Dissertação para obtenção do grau de mestre, em qualidade e segurança alimentar, Instituto Politécnico de Bragança.

Scholz, F., (2010). *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*. Second, Revised and Extended Edition. Springer.

SIAZ – Sistema de Informação sobre o Azeite e a Azeitona de Mesa (2016). Industriais de azeitonas de mesa e azeitona rececionada: comparação das últimas campanhas. [http://www.gpp.pt/estatistica/SIAZ/AZEITONA\\_2015-16\\_2.pdf](http://www.gpp.pt/estatistica/SIAZ/AZEITONA_2015-16_2.pdf). Acedido em 29 de março de 2016.

Silva, S. F.; Anjos, C. A.; Cavalcanti, R. N.; Celegjini, R. M., (2015). Evaluation of extra virgin olive oil stability by artificial neural network. *Food Chemistry*, 179, 35-43.

Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Calhella, R.C., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. & Pereira, J.A., (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 8533-8538.

Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Bento, A. & Pereira, J.A., (2008). Antioxidant potential of traditional stoned table olives “Alcaparras”: influence of the solvent and temperature extraction conditions. *LWT – Food Science and Technology*, 41, 739-745.

Sousa M.E.B.C., Dias L.G., Veloso A.C.A., Estevinho L., Peres A.M., Machado A.A.S.C., (2014). Practical procedure for discriminating monofloral honeys with a broad pollen profile variability using an electronic tongue, *Talanta*, 128, 284–292.

Toko, K., (1998a). Electronic tongue, *Biosensors & Bioelectronics*, 13, 701 –709.

Toko, K., (1998b). Electronic sensing of tastes, *Electroanalysis*, 10, 657– 669.

Toko, K., (2000). Taste sensor, *Sensors and Actuators B*, 64, 205–215.

Toyota, K., Cui, H., Abe, K., Habara, M., Toko, K., Ikezaki, H., (2011a). Sweetness sensor with lipid/polymer membranes: sweet-responsive substances, *Sensors and Materials* 23, 465–474.

Toyota, K., Cui, H., Abe, K., Habara, M., Toko, K., Ikezaki, H., (2011b). Sweetness sensor with lipid/polymer membranes: response to various sugars, *Sensors and Materials*, 23, 475–482.

Venables, W. N., & Ripley, B. D., (2002). *Modern Applied Statistics with S (Statistics and Computing)*, 4th Edition, 523 Springer, New York.

Veloso, A.C.A., Dias L.G., Rodrigues, N., Pereira, J.A., Peres A.M., (2016). Sensory intensity assessment of olive oils using an electronic tongue, *Talanta*, 146: 585-593.

Vlasov, Y., Legin, A., Rudnitskaya, A., (2002). Electronic tongues and their analytical application, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 136–146.

Vlasov, Y., Legin, A., Rudnitskaya, A., DI Natale, C., D'Amico, A., (2005). Nonspecific sensor arrays (“electronic tongue”) for chemical analysis of liquids, (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 77, 1965-1983.

Wang, J., (2006). *Analytical electrochemistry*, 3<sup>rd</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.

Winqvist, F., Bjorklund, R., Krantz-Rülcker, C., Lundström, I., Östergren, K., T. Skoglund, T., (2005). An electronic tongue in the dairy industry, *Sensors and Actuators B*, 111 -112, 299-304.

Zhu, H., Wang, S. C., Shoemaker, C. F., (2016). Volatile constituents in sensory defective virgin olive oils. *Flavour Fragrance Journal*, 31, 22–30.

# ***ANEXOS***



**Anexo A: Folha de perfil de azeitona de mesa utilizada pelo painel de provadores (COI, 2011).**

## **FOLHA DE PERFIL DE AZEITONA DE MESA**

**INTENSIDADE 1—11**



### **PERCEPÇÃO DE SENSações NEGATIVAS**

Fermentação

Anormal (tipo) \_\_\_\_\_

Outros defeitos

(especifique) \_\_\_\_\_

### **PERCEPÇÃO DE SENSações GUSTATIVAS**

Salgado \_\_\_\_\_

Amargo \_\_\_\_\_

Ácido \_\_\_\_\_

### **PERCEPÇÃO DE SENSações CINESTÉSICAS**

Dureza \_\_\_\_\_

Fibrosidade \_\_\_\_\_

Crocância \_\_\_\_\_

**Código da Amostra:**

**Nome do provador:**

**Data:**

