

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

KELLY LAÍS MARIANI

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DA ADULTERAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA COM ÓLEOS DE
SOJA E CANOLA POR ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO MÉDIO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2017

KELLY LAÍS MARIANI

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DA ADULTERAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA COM ÓLEOS DE
SOJA E CANOLA POR ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO MÉDIO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de TCC II do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof^o Clayton Antunes Martin

TOLEDO
2017

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

KELLY LAÍS MARIANI

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA
ADULTERAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA COM ÓLEOS DE SOJA E CANOLA POR
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, Câmpus Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo. *

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin
(Orientador - UTFPR)

Prof^a Dra. Ana Maria Vélez Escallón
(UTFPR)

Prof^a Ma. Marina de Oliveira
(UTFPR)

Toledo
Maio de 2017

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos concedidas.

À minha família, em especial aos meus pais Sergio e Irene, pela inspiração, apoio, incentivo e por tudo que me ensinaram. Aos meus irmãos Diego e Cledir, e ao meu namorado, pelo carinho e apoio.

A todos os meus amigos, que me ajudaram e ficaram ao meu lado em todo o período do curso.

Ao professor Dr. Clayton Antunes Martin, pela orientação, dedicação, amizade e paciência.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela estrutura e ensino de excelente qualidade, e a todos os professores que se dedicaram a me ensinar.

A Fundação Araucária pela concessão da bolsa de iniciação científica para que a pesquisa fosse realizada.

E a todos que não citei, mas que contribuíram para realização de meu trabalho.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

AOEV: Azeite de Oliva Extra Virgem

ATR: Refletância Total Atenuada - *Total attenuated reflectance*

CV: Validação Cruzada - *Cross Validation*

FIR: Infravermelho distante - *Far Infrared*

FTIR: Infravermelho Transformada de Fourier - *Infrared Fourier Transform*

FTIR-ATR: Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada - *Infrared Spectroscopy with Fourier Transform and Attenuated Total Reflectance*

KMO: Adequação de Kaiser-Meyer-Olkin - *Adequacy of Kaiser-Meyer-Olkin*

MIR: Infravermelho médio - *Medium Infrared*

MSC: Correção Multiplicativa do sinal - *Multiplicative Signal Correction*

NIR: Infravermelho próximo - *Near Infrared*

PC: Componentes Principais - *Principal Components*

PCA: Análise por Componentes Principais

PCR - *Principal Component Regression*

PLS: Regressão por Mínimos Quadrados Parciais - *Partial Square Least*

RMSECV: Raiz Quadrada do Erro Médio de Validação Cruzada - *Root Mean Square Error of Cross Validation*

RMSEP: Raiz Quadrada do Erro Médio de Predição - *Root Mean Square Error of Prediction*

RMSEC: Raiz Quadrada do Erro Médio de Calibração - *Root Mean Square Error of Calibration*

UTFPR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná

VL: Variáveis latentes

RESUMO

MARIANI, Kelly. L. **Desenvolvimento de um método para determinação da adulteração do azeite de oliva com óleos de soja e canola por espectroscopia no infravermelho médio e calibração multivariada.** Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Toledo, 2017.

O azeite de oliva (AO) tem sido comercializado em vários países, incluindo o Brasil, misturado com outros óleos vegetais. O propósito deste trabalho foi determinar o teor de AO em misturas com óleo de soja e canola, utilizando a espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS). Foram preparadas 128 misturas de AO, óleo de soja e óleo de canola (0,00 a 100,00 g de AO 100 g⁻¹). Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro infravermelho, na faixa de 3500 a 650 cm⁻¹. As misturas foram divididas em conjuntos de calibração (n = 95) e validação (n = 33), pelo algoritmo de Kennard-Stone. O espectro foi dividido em segmentos que variaram de 1 a 100, sendo aplicada a calibração PLS para cada intervalo da segmentação. A região selecionada (1219-1030 cm⁻¹) apresentou o menor valor para a raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (RMSECV), que foi 3,35. Após a identificação e exclusão dos outliers, o valor de RMSECV foi de 1,44, com r = 0,998. A precisão foi estimada como repetibilidade, cujo valor foi 0,39 g 100 g⁻¹. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), inferior e superior, foram respectivamente, 1,6 e 3,1 g 100 g⁻¹ de mistura e 4,8 e 9,3 g 100 g⁻¹. O modelo obtido apresentou capacidade preditiva adequada podendo ser utilizado na quantificação de AO em óleos mistos com óleos de soja e canola e em AO adulterado com estes óleos.

Palavras-chave: adulteração, óleos mistos, quantificação, PLS

ABSTRACT

MARIANI, Kelly L. **Development of a method for determining adulteration of olive oil with soy and canola oils by medium non-infrared spectroscopy and multivariate calibration.** Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Toledo, 2017.

Olive oil (AO) has been marketed in several countries, including Brazil, mixed with other vegetable oils. The purpose of this work was to determine the AO content in mixtures with soybean and canola oil using infrared spectroscopy and partial least squares (PLS) multivariate calibration. 128 mixtures of AO, soybean oil and canola oil (0.00 to 100.00 g of AO 100 g⁻¹) were prepared. The spectra were obtained in an infrared spectrophotometer, in the range of 3500 to 650 cm⁻¹. The mixtures were divided into calibration sets (n = 95) and validation (n = 33) by the Kennard-Stone algorithm. The spectrum was divided into segments ranging from 1 to 100, and the PLS calibration was applied for each segmentation interval. The selected region (1219-1030 cm⁻¹) presented the lowest value for the square root of the mean cross-validation error (RMSECV), which was 3.35. After the identification and exclusion of the outliers, the RMSECV value was 1.44, with r = 0.998. The accuracy was estimated as repeatability, whose value was 0.39 g 100 g⁻¹. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), lower and higher, were respectively 1.6 and 3.1 g 100 g⁻¹ of mixture and 4.8 and 9.3 g 100 g⁻¹. The obtained model presented adequate predictive capacity and can be used in the quantification of AO in mixed oils with soybean and canola oils and in AO adulterated with these oils.

Key words: adulteration, mixed oils, quantification, PLS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO	14
1.1.1 Objetivo geral.....	14
1.1.2 Objetivos específicos	14
1.2 JUSTIFICATIVA.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 AZEITE DE OLIVA.....	16
2.2 PRINCÍPIOS DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.....	18
2.3 ESPECTROSCOPIA POR REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA.....	19
2.4 PRÉ-PROCESSAMENTO.....	20
2.4.1 Correção Multiplicativa de Sinal (MSC)	21
2.4.2 Centralização na média	21
2.5 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	22
2.6 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS.....	23
2.7 FIGURAS DE MÉRITO.....	25
2.7.1 Exatidão	25
2.7.2 Precisão.....	25
2.7.3 Linearidade	26
2.7.4 Sinal Analítico Líquido (NAS).....	26
2.7.5 Sensibilidade.....	27
2.7.6 Sensibilidade Analítica	27
2.7.7 Limite de detecção (LD) Limite de quantificação (LQ).....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 MATERIAIS	30
3.2 EQUIPAMENTOS.....	30
3.3 MÉTODOS	30
3.3.1 Preparação das amostras	30
3.3.2 Obtenção dos espectros no infravermelho	32
3.3.3 Determinação do teor azeite de oliva em misturas com óleo de soja.....	32
3.3.3.1 Obtenção do modelo de calibração pelo método dos mínimos quadrados parciais.....	32
3.4 FIGURAS DE MÉRITO.....	33
3.4.1 Exatidão e Precisão	33
3.4.2 Sensibilidade	33
3.4.3 Limites de Detecção e Quantificação	33

3.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS UTILIZADOS NAS MISTURAS	34
3.5.1 – Preparação de ésteres metílicos	34
3.5.2 – Análise cromatográfica	34
3.5.3 – Quantificação dos ácidos graxos.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

Segundo BELITZ (1997) o azeite de oliva é obtido a partir da polpa do fruto da oliveira *Olea europaea sativa*, sendo que o azeite de oliva extra virgem (AOEV) é um dos mais caros e tem sido adulterado com outros azeites ou óleos vegetais.

A produção de azeitonas e consequentemente AOEV ainda esta em fase de escala piloto no Brasil. As oliveiras exigem condições climáticas específicas. Estão sendo realizados estudos pela EMBRAPA para o desenvolvimento de novas cultivares, adaptadas para o país. Existem dois grandes projetos pioneiros que começaram a olivicultura no Brasil: O projeto da Epamig em Minas Gerais e o projeto da “Cerro dos Olivais” em Caçapava do Sul. Uma porcentagem considerável do azeite de oliva vendido no país é importado de países como a Argentina, Espanha e Portugal.

O AOEV pode ser preparado apenas por produtos apropriados, mas se a mistura consequente desvia as proporções do rótulo ou se a mistura é comercializada como pura isto significa que o azeite é adulterado (ULBERTH, BUCHGRABER, 2000).

Têm sido propostas várias técnicas para detectar adulteração e as que possuem métodos cromatográficos são as mais utilizadas. A técnica de espectroscopia no FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy) apresenta uma solução alternativa quando usada em combinação com ferramentas quimiométricas. Este método espectroscópico tem a vantagem de minimizar ou mesmo superar completamente a etapa de preparação da amostra (LI-CHAN, GRIFFITHS, CHALMERS, 2010).

A calibração multivariada por meio da regressão por PLS - mínimos quadrados parciais (*partial least square*) permite determinar a concentração de espécies a partir do seu espectro ou de parte dele. O método baseia-se no pré-processamento dos espectros seguido da decomposição do valor singular da matriz dos espectros, sendo obtidos os escores para cada espectro e para as respostas obtidas a partir de um método de referência. Aplica-se a regressão

linear múltipla a estes escores determinando os seus coeficientes (SOUZA et al, 2013).

Este estudo apresenta o desenvolvimento de um método para quantificar o teor de azeite de oliva em óleos mistos, contendo os óleos de soja e canola, aplicando a espectrofotometria no infravermelho médio e a calibração multivariada por meio da regressão por mínimos quadrados parciais.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um método para quantificar o teor de azeite de oliva em misturas com óleos de soja e canola.

1.1.2 Objetivos específicos

- Preparar misturas de azeite de oliva com óleos de soja e canola.
- Obter o espectro no infravermelho médio para as misturas de azeite de oliva e óleos de soja e canola.
- Processar os espectros aplicando a normalização e a centralização na média e corrigir os espectros por meio da correção por espalhamento multiplicativo.
- Aplicar calibração multivariada por meio do método dos mínimos quadrados parciais em diferentes regiões do espectro.
- Obter um modelo para a quantificação do teor de azeite de oliva em misturas com óleos de soja e canola.
- Estimar as figuras de mérito para o método desenvolvido (precisão, exatidão, sensibilidade e limites de detecção e quantificação).
- Realizar a quantificação de ácidos graxos em azeite de oliva, óleo de soja e canola.

1.2 JUSTIFICATIVA

Com a divulgação na mídia dos benefícios em se consumir determinados tipos de alimentos mais saudáveis, vem crescendo a demanda por esses produtos, e o azeite de oliva é um desses itens. A relação do consumo de azeite de oliva com a redução da incidência de doenças cardiovasculares vem despertando a atenção dos consumidores.

A extração do azeite de oliva extra virgem é feita por prensagem a frio, que resulta em um menor rendimento em relação a extração por prensagem com aquecimento e com o emprego de solventes. Esta condição, aumenta custo do azeite de oliva extra virgem em relação a outros óleos vegetais, e predispõe à ocorrência de fraudes e adulterações.

Nos últimos anos houve um aumento significativo do consumo de azeite de oliva no Brasil. Esta condição pode favorecer o aumento da adulteração do azeite de oliva extra virgem com o azeite de oliva refinado e do azeite de oliva com outros óleos vegetais, como os de soja e canola.

Assim, é preciso desenvolver métodos que sejam rápidos e eficientes para determinar a adulteração em azeite de oliva, bem como identificar os seus adulterantes. Visando contribuir nesse sentido, este projeto irá desenvolver um método para quantificar o teor de azeite de oliva em misturas com os óleos de soja e canola.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AZEITE DE OLIVA

O azeite de oliva é obtido através do esmagamento e prensagem de azeitonas. Desde os tempos antigos tem sido considerado um óleo nobre, ocupando lugar de destaque em relação aos outros óleos comestíveis. Ainda que receba diversas classificações dependendo da origem, da variedade do fruto e do grau de prensagem, o azeite de oliva apresenta maior valor no seu estado bruto, devido às suas características naturais de cor, sabor e aroma (LAGO et al., 1998).

O azeite de oliva, pela sua composição, tem uma contribuição fundamental na prevenção e tratamento de inúmeras doenças: arteriosclerose, trombose, diabetes mellitus, doença biliar, pele (efeito protetor e tonificante), cataratas e doenças oculares, mineralização óssea, hipertensão, câncer (mama, próstata, trato digestivo). Além disso, aumenta a expectativa de vida (fortalece o sistema imunológico), tem efeito positivo sobre a depressão e confere proteção contra a deterioração da função cognitiva (perda de memória) (ORG. OLIVA, 2015).

As adulterações no caso específico do azeite de oliva podem ocorrer dois tipos: misturas de azeite de oliva virgem e óleos de oliva refinados de qualidades duvidosas e adição de outros óleos vegetais como o de soja e canola.

O método de obtenção de azeite de oliva por prensagem apresenta uma composição de matéria insaponificável significativamente diferente daquela do óleo de oliva extraído por solvente, pela grande quantidade de ceras e dos álcoois triterpênicos, eritrodiol e uvaol, presentes neste último, o que permite diferenciá-los (AMELOTTI, 1984, MORCHIO, ANDREIS, 1983).

A adulteração pela adição de óleo de oliva reesterificado só poderá ser detectada através da análise de ácidos graxos na posição 2 dos triacilgliceróis (FIRESTONE et al., 1985).

A avaliação da pureza de 60 marcas de azeite de oliva comercializadas no Brasil foi realizada por SOARES, AMAYA (1981) através da composição em ácidos graxos. Constatou-se que as amostras enlatadas na origem eram puras, enquanto detectou-se adulteração pela adição de óleo de soja, coco ou babaçu

em algumas amostras embaladas no Brasil. A adulteração de algumas amostras de azeite de oliva, com óleo de soja, coco ou babaçu, também foi observada por SZPIZ et al. (1985).

O Azeite de Oliva é classificado com base nas suas características organolépticas (sabor e aroma), analíticas (acidez e outros dados químicos) e pelo processo extrativo e dividido, basicamente, em 3 tipos: azeite extra virgem, azeite virgem e azeite puro.

A grande diferenciação e os benefícios de saudabilidade associados ao consumo do azeite de oliva estão diretamente relacionados a sua composição que é rica em ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oléico, e baixo em saturados o que favorece o controle do colesterol, pois pode ajudar a reduzir o colesterol "ruim" (LDL) no sangue, mantendo o nível de colesterol "bom" (HDL). Desse modo permitindo um equilíbrio saudável entre os dois tipos de colesterol.

A presença de hidrocarbonetos (esqualeno) no azeite favorecem a excreção de toxinas, ajuda na saúde celular e tem efeitos anticarcinogênicos. Possui esteróis (β -sitosterol) favorecendo a redução do colesterol e ajuda na prevenção e combate ao câncer (próstata, colon, mama), compostos fenólicos que inibem oxidação, reagem com radicais livres, inibindo a agregação plaquetária e previnem a oxidação do LDL e Contém vitamina E, um poderoso antioxidante.(ORG. OLIVA, 2015)

Em uma pesquisa realizada pelo Inmetro foram analisadas 10 marcas de azeite de oliva. Quatro marcas apresentaram resultados indicativos que o produto não contém somente óleo de oliva, caracterizando adulteração. Os resultados foram encaminhados à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde, órgão responsável pela regulamentação e fiscalização de azeite de oliva para que sejam tomadas as medidas cabíveis em relação às marcas adulteradas (INMETRO, 2015).

ANTONIASS (1998) também relata diversos tipos de adulteração em seu estudo, e a inacessibilidade em detectá-las. Além da adulteração deste produto com outros óleos vegetais, ou com azeite de oliva de qualidade inferior. Os parâmetros avaliados foram comparados posteriormente com a legislação para se determinar o tipo de azeite condizente com a especificação presente no rótulo.

A detecção de adulteração é muitas vezes complicada, pois não há nenhum teste disponível que pode realizar a tarefa, especialmente quando os óleos têm características químicas semelhantes ao AOEV (GARCÍA-GONZÁLEZ, APARICIO, 2006).

Existe uma necessidade de desenvolver métodos de análise para detectar e quantificar o teor de azeite em uma mistura de óleos comestíveis. A detecção e quantificação de azeites não são tarefas simples porque o azeite é uma matriz complexa, na qual a proporção dos componentes podem variar de acordo com fatores muito diferentes, como a variedade da oliva, sistema de produção, entre outros. Atualmente, o valor, a funcionalidade e os benefícios oferecidos pela espectroscopia no infravermelho, principalmente a espectroscopia no infravermelho próximo, são incontestáveis (COATES, 1999).

2.2 PRINCÍPIOS DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A região espectral que corresponde ao infravermelho compreende a radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} . O espectro infravermelho é dividido em infravermelho próximo (NIR, Near Infrared), médio (MIR, Middle Infrared) e distante (FIR, Far Infrared) (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002). É possível realizar medidas de amostras em todos os estados e formas como: gases, líquidos, sólidos, sistemas binários e terciários com amostras semi-sólidas, pastas, géis e outras (COATES, 1999).

Na região do infravermelho médio se encontra a maioria das pesquisas desenvolvidas e o maior número de aplicações. A espectroscopia nesta região começou a ser utilizada no final da década de 1950, para a análise qualitativa de compostos orgânicos devido à grande quantidade de informação que pode ser utilizada para a caracterização funcional de compostos orgânicos. Na região de impressão digital ($1200\text{ a }700\text{ cm}^{-1}$) ocorrem pequenas alterações na estrutura e na constituição de uma molécula, resultando em mudanças significativas na distribuição dos picos de absorção do espectro, que são relacionados com a estrutura da molécula. A identificação de compostos pode

ser realizada pela comparação do seu espectro MIR com bancos de dados existentes (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

2.3 ESPECTROSCOPIA POR REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA

A espectroscopia de Refletância total atenuada (ATR, Attenuated Total Reflectance) baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um menos denso (amostra) ocorre uma reflexão. A fração do feixe incidente que é refletida aumenta com o ângulo de incidência. A profundidade de penetração, que varia de uma fração até vários comprimentos de onda, depende do comprimento de onda da radiação incidente, dos índices de refração dos dois materiais e do ângulo do feixe incidente em relação à interface. A radiação penetrante é chamada onda evanescente. Se o meio menos denso absorve essa onda evanescente, ocorre atenuação do feixe nos comprimentos de onda das bandas de absorção (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002; HARRICK, 1964).

O desenvolvimento da ATR revitalizou o uso do FTIR. Usando ATR, praticamente não há preparação de amostra, por consequência a utilização de solventes perigosos e reagentes pode ser evitada (RODRIGUEZ-SAONA, ALLENDORF, 2011). Este fato é muito atraente para cientistas que tomam cuidado com questões de saúde do ser humano e ambiental. Por esta razão a espectroscopia FTIR, vibracionais e outras técnicas espectroscópicas podem ser consideradas como "técnica analítica verde" para a análise de gorduras e óleos comestíveis (MOROS, 2009).

A detecção de componentes químicos característicos tem sido propostos como uma indicação adequada da presença de outros óleos em AOEV (GARCÍA- GONZÁLEZ, APARICIO, 2006; RUIZ *et al.*, 1998), mas a utilização de tais compostos para descobrir adulteração, quando óleos refinados estão envolvidos, é bastante difícil. Além disso, os métodos químicos tradicionalmente empregados para o controle da autenticidade do azeite virgem como cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência são caros,

consome tempo, exige operadores qualificados e têm alto impacto ambiental (APARICIO, APARICIO-RUÍZ, 2000; KAMM *et al.*, 2001).

Por essa razão tem sido empregadas técnicas espectroscópicas associadas a métodos quimiométricos que possibilitam a identificação da adulteração em um tempo menor, e com custo menor que os métodos tradicionalmente empregados. A aplicação de métodos quimiométricos requer o pré-processamento dos espectros que visa manter somente as informações espectrais relevantes para a construção dos modelos de calibração multivariada

2.4 PRÉ-PROCESSAMENTO

O pré-processamento dos dados é fundamental para o sucesso da análise multivariada. Os principais objetivos da aplicação são eliminar informações não relevantes do ponto de vista químico e tornar a matriz de dados melhor condicionada para a análise, possibilitando a subsequente análise exploratória do conjunto de dados com eficiência. Sinais analíticos são os dados originais obtidos de processos analíticos, representam a variação de uma propriedade físico-química, em função do tempo e/ou espaço. A maioria dos sinais apresentam contaminantes com ruído dificultando a interpretação e modelamento das propriedades associadas a estes sinais. O ruído afeta os limites de detecção, de decisão e de determinação, os quais são figuras de mérito extremamente importantes na avaliação do desempenho dos instrumentos e métodos analíticos (MILLER, MILLER, 1993).

A classificação dos ruídos é: ruído de baixa frequência, de frequência intermediária e de alta frequência. O ruído de baixa frequência caracteriza-se por deslocamentos na linha base, podendo ser minimizado instrumentalmente, acoplando-se a frequência da fonte de sinais com a frequência usada na detecção, através de um amplificador. Nos ruídos de frequência intermediária é encontrado o ruído de interferência pela energia elétrica, pode ser removido modulando a frequência da fonte de sinais e a frequência usada na detecção longe da faixa de frequência associada ao ruído de interferência. Os ruídos de

alta frequência são os mais difíceis de serem tratados, sendo que não há uma frequência característica marcante é originado no movimento térmico, sendo minimizado por softwares (ERICKSON, LYSAGHT, CALLIS, 1992; BIALKOWSKI, 1988).

2.4.1 Correção Multiplicativa de Sinal (MSC)

O método de Correção Multiplicativa de Sinal (MSC, Multiplicative Scattering Correction) é uma técnica para corrigir o efeito do espalhamento de luz em espectros de refletância difusa, com grande número de comprimentos de onda. No método MSC a interferência relativa ao espalhamento de luz é minimizada corrigindo-se os espectros de refletância difusa de modo que todos os espectros possuam o espalhamento ideal (médio), único espalhamento possível de ser calculado. A técnica é muito simples e pode ser facilmente entendida, o método reduz significativamente os efeitos relativos ao espalhamento de luz, onde ocorre uma melhora expressiva no desempenho dos modelos construídos para a relação existente, entre a intensidade de refletância e a concentração das espécies absorventes (ISAKSSON, KOWALSKI, 1993; GELADI, MACDOUGALL, MARTENS, 1985).

2.4.2 Centralização na média

A centralização consiste em calcular a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrair cada uma das intensidades do valor médio. Cada variável passará a ter média zero, ou seja, as coordenadas são movidas para o centro dos dados, permitindo que diferenças nas intensidades relativas das variáveis sejam mais fáceis de perceber. Esse pré-processamento permite que a presença de ruídos não afete negativamente na análise. O centroide da matriz de dados é levado à origem pela subtração de cada elemento de cada coluna pela média da respectiva coluna (Equação 1) (RIBEIRO, 2001).

$$x_{ij(cm)} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad (1)$$

onde: $x_{ij(cm)}$ = valor centrado na média para a variável j na amostra i ;

x_{ij} = valor da variável j na amostra i ;

\bar{x}_j = média dos valores das amostras na coluna j .

2.5 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A calibração pode ser definida como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e valores para uma propriedade de interesse correspondente (EURACHEM, 1998).

Um modelo de calibração, na verdade, é uma função matemática que relaciona dois grupos de variáveis, uma delas denominada dependente (Y) e a outra denominada independente (X) (Equação 2):

$$Y=f(X) = Xb \quad (2)$$

O conjunto de dados empregado para essa finalidade é chamado de conjunto de calibração, os parâmetros do modelo são denominados de coeficientes de regressão (b) determinados matematicamente a partir dos dados experimentais (HELLAND, 1998; MARTENS, NAES, 1996).

Após a calibração é realizada a validação, onde as variáveis independentes obtidas são utilizadas em conjunto com o coeficiente de regressão, para calcular os valores previstos para a variável dependente. No conjunto de validação utilizam-se amostras cujas variáveis dependentes sejam conhecidas para que seja possível estabelecer uma comparação entre os valores previstos pelo modelo e os valores conhecidos previamente através de uma metodologia padrão, o que permite a avaliação sobre o desempenho do modelo de calibração proposto (MARTENS, NAES, 1996).

Existem diversos métodos para construção de modelos de calibração, sendo que a função que ajusta as variáveis dependentes e independentes pode ser linear ou não, dependendo da complexidade do sistema. Mais de uma resposta instrumental é relacionada com a propriedade de interesse, possibilitando a análise mesmo na presença de interferentes, desde que esses interferentes estejam presentes nas amostras utilizadas para a construção do modelo de calibração (MARTENS, NAES, 1996).

2.6 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – do inglês, Partial Least Squares) é considerada o método de regressão mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada a partir de dados de primeira ordem. Este método, assim como o PCR, não requer um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras podendo realizar a previsão de amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes também estejam presentes por ocasião da construção do modelo (vantagem de primeira ordem) (BRERETON, 2000)

A PLS é um método de calibração multivariada que utiliza a técnica de análise de componentes principais para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados para posterior correlação entre os espectros (matriz X) e as propriedades de interesse (matriz Y). Quando existe apenas uma propriedade (y é um vetor), neste caso, o método é denominado PLS 1. As matrizes X e Y são decompostas por PCA – Análise por Componentes Principais (Principal Component Analysis) por meio das Equações 3 e 4:

$$X = TP^T + E \quad (3)$$

$$Y = UQ^T + F \quad (4)$$

sendo: P e Q os pesos de X e Y, respectivamente; T e U são os escores de X e Y, respectivamente e E e F representam as matrizes de resíduos de X e Y, respectivamente. (BRERETON, 2000).

O método iPLS seleciona faixas do espectro e não variáveis isoladas e se trata de um método mais simples. A seletividade do algoritmo PLS para as variáveis que apresentam ruído é realçada através da informação da Raiz Quadrada do Erro Médio de Validação Cruzada (RMSECV, Mean Square Error of Cross Validation) no qual o espectro é subdividido, avaliando a performance da previsão de cada intervalo. O melhor intervalo será aquele que apresentar valor de RMSECV menor em relação ao modelo global. Como a seleção de variáveis busca-se encontrar um conjunto de variáveis independentes e mais restrito que produza um menor erro de previsão, o algoritmo monitora, concomitantemente à seleção das variáveis, um parâmetro regulador, $E(b)$, que descreve o desvio das previsões em relação aos valores esperados, conforme a Equação 5 (OSBORNE, JORDAN, KÜNNEMEYER, 1997)

$$E(b) = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (5)$$

em que, y_i e \hat{y}_i consistem nos valores de referência e previstos, respectivamente, N é o número de amostras e b são os coeficientes de regressão calculados pelo PLS.

A eliminação de qualquer variável fica vinculada à minimização da função descrita pela equação. É necessário atingir um mínimo da função simultaneamente à eliminação do valor de um determinado coeficiente de regressão do modelo global referente à variável eliminada (OSBORNE, JORDAN, KÜNNEMEYER, 1997).

2.7 FIGURAS DE MÉRITO

2.1 Exatidão

Expressa o grau de concordância entre o valor estimado ou medido e o valor tido como verdadeiro ou de referência. Comumente em aplicações com Calibração Multivariada a exatidão é estimada através da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP – “Root Mean Squares Error of Prediction”), equação (6):

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (6)$$

onde n é o número de amostras de validação (BRAGA, 2004).

2.7.2 Precisão

Expressa o grau de concordância entre os resultados uma série de medidas feitas para uma mesma amostra homogênea em condições determinadas. Em geral é considerada em diversos níveis, tais como repetibilidade, precisão intermediária (interdias, interanalista, etc.), reprodutibilidade e precisão média (Equação 7).

$$\text{precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{y}_{ij} - \hat{y}_i)^2}{n(m-1)}} \quad (7)$$

onde, n representa o número de amostras e m o número de replicatas (ASTM, 2000).

2.7.3 Linearidade

Para os modelos de calibração multivariada, a linearidade é uma medida quantitativa cuja determinação não é uma tarefa simples. Qualitativamente, o gráfico de resíduos *versus* a concentração, deve ter comportamento aleatório, indicando se os dados seguem ou não o comportamento linear (BRAGA, 2004).

2.7.4 Sinal Analítico Líquido (NAS)

O conceito de sinal analítico líquido (NAS - Net Analyte Signal) exerce uma importante função na determinação de figuras de mérito para calibrações multivariadas. O NAS é definido, para uma propriedade de interesse k , como sendo a parte do sinal analítico que é ortogonal às contribuições de possíveis interferentes presentes na amostra. Sua propriedade de ortogonalidade pode ser observada pela representação geométrica da Figura 1:

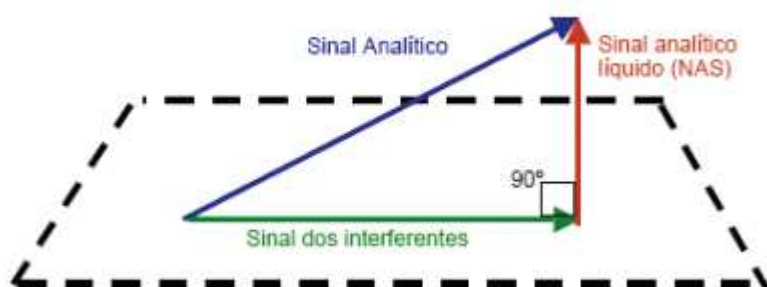


Figura 1. Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS.
 Fonte: (VALDERRAMA, 2005)

2.7.5 Sensibilidade

É definida como a fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse. Para modelos de calibração multivariada, como PLS, pode ser determinada como (Equação 8):

$$\hat{S\acute{E}N} = \frac{1}{\|\mathbf{b}_k\|} \quad (8)$$

que, \mathbf{b}_k é o vetor dos coeficientes de regressão estimados pelo PLS.
 (VALDERRAMA, 2005)

2.7.6 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica, γ , não é abordada em normas ou guias de validação. No entanto, esse parâmetro apresenta a sensibilidade o método em termos da unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência (δx).

$$\gamma = \frac{\hat{S\acute{E}N}}{|\delta x|} \quad (9)$$

em que, $\hat{S\acute{E}N}$ é obtido através das equações (8) ou (9) e δx é desvio padrão do sinal de referência estimado através do desvio padrão do valor de NAS para 15 espectros do sinal de referência.

O inverso desse parâmetro, ou seja, γ^{-1} , permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras, que pode ser distinguida pelo método.

2.7.7 Limite de detecção (LD) Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico, expressam as menores quantidades da espécie de interesse que podem ser detectadas e determinadas quantitativamente, respectivamente. Para um conjunto de dados que apresenta comportamento homoscedástico (variância constante ao longo da faixa de trabalho, erros com previsão não correlacionados e que seguem uma distribuição normal), os LD e LQ na calibração multivariada podem ser calculados por:

$$LD = 3\delta_x \|b_k\| = 3\delta_x \frac{1}{\hat{S}EN} \quad (10)$$

$$LQ = 10\delta_x \|b_k\| = 10\delta_x \frac{1}{\hat{S}EN} \quad (11)$$

em que, δ_x é o desvio padrão do sinal de referência, b_k é o vetor dos coeficientes de regressão do modelo PLS para a espécie k , $\hat{S}EN$ corresponde ao valor de sensibilidade obtido através das equações 8 ou 9. (BOQUÉ, 1996)

Em uma proposta mais atual LOD calcula-se de acordo com as equações 12, 13, 14 e 15 (OLIVIERI, 2014)

$$LOQ_{min} = 3.3 \sqrt{\frac{var(x)(1+h_{omin})}{\|\beta\|^2} + h_{omin} var(C_{cal})} \quad (12)$$

$$LOQ_{max} = 3.3 \sqrt{\frac{var(x)(1+h_{0max})}{\|\beta\|^2} + h_{0max}var(C_{cal})} \quad (13)$$

$$LOQ_{min} = 10 \sqrt{\frac{var(x)(1+h_{0min})}{\|\beta\|^2} + h_{0min}var(C_{cal})} \quad (14)$$

$$LOQ_{max} = 10 \sqrt{\frac{var(x)(1+h_{0max})}{\|\beta\|^2} + h_{0max}var(C_{cal})} \quad (15)$$

2.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Uma das técnicas de análise utilizadas para identificar um número muito grande de ácidos graxos nos alimentos é a cromatografia em fase gasosa. Essa técnica utiliza colunas capilares de sílica fundida que permite identificar se a qualidade da gordura de certo alimento é nutricionalmente boa ou ruim. Nesta técnica ocorre a separação de substâncias voláteis ou volatilizáveis, e baseia-se na retenção dos ésteres metílicos. Os métodos utilizados para a identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos, baseiam-se em parâmetros como tempo de retenção, co-eluição de amostras e padrões, comprimento equivalente da cadeia (ECL – equivalent chain length), análise com colunas de diferentes polaridades. Além disso, existem os métodos analíticos que utilizam cromatografia à gás acoplado à espectrometria de massas, infravermelho ou ressonância magnética nuclear que aliados ao uso de padrões são formas de identificação de picos de ácidos graxos. A quantificação de ácidos graxos utilizando padronização interna é um dos melhores métodos, embora seja trabalhosa, permite uma fácil interpretação dos resultados, que podem ser comparados com trabalhos de diferentes áreas (VISENTAINER, 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Utilizou-se AOEV, óleos de soja e canola, misturas de azeite de oliva, óleos de soja e canola (disponíveis comercialmente), frasco eppendorf, frasco âmbar com capacidade de 5 mL e álcool isopropílico PA.

3.2 EQUIPAMENTOS

Para pesagem das amostras utilizou-se balança analítica Shimadzu, modelo AY220 e para transferência dos óleos utilizou-se uma micropipeta (100 a 1000 μ L e 20 a 200 μ L) HTL, modelo HT65. A homogeneização das amostras realizou-se com agitador de tubos de ensaio Phoenix, modelo AP56. Para a obtenção dos espectros utilizou-se um espectrofotômetro infravermelho Perkin Elmer, modelo Spectrum 65, com módulo de refletância total atenuada

3.3 MÉTODOS

As análises foram realizadas no laboratório de Análise Instrumental da Universidade Federal do Paraná – Campus Toledo (UTFPR).

3.3.1 Preparação das amostras

O AOEV de procedência confiável, de acordo com INMETRO, 2015, a marca selecionada para experimento está dentre as quais não foram encontrados

sinal de adulteração, foi adquirido no mercado na cidade de Toledo, assim como o óleo de soja e os óleos compostos. Preparou-se misturas contendo AOEV, óleos de soja e canola, conforme a figura 2.

As misturas foram realizadas em triplicata, sendo submetidas à homogeneização em agitador de tubos de ensaio por 1 min. Foram preparadas 133 misturas com diferentes proporções de azeite de oliva, óleo de soja e canola

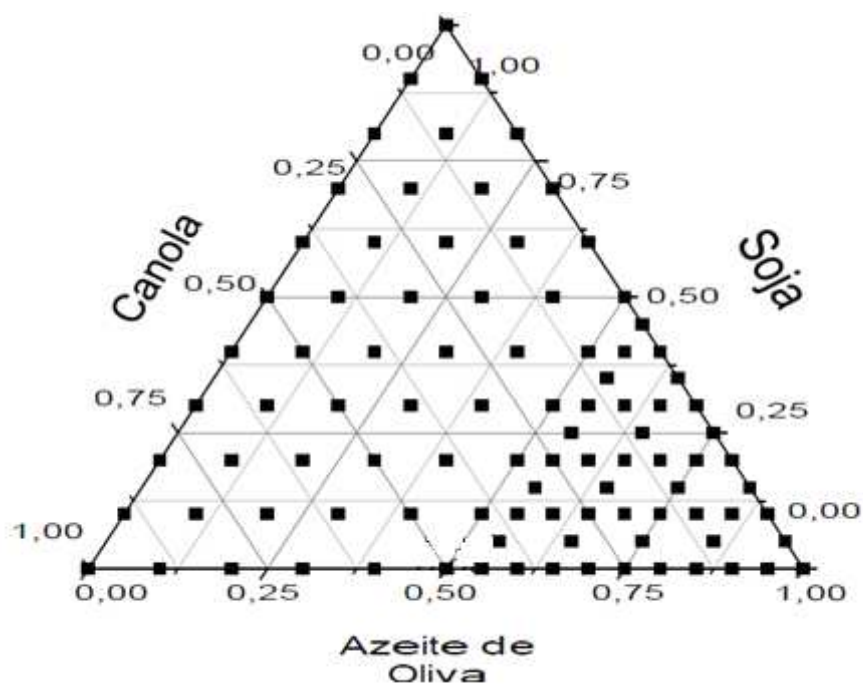


Figura 2: Composição das misturas de AOEV, óleo de soja e canola a serem reparadas

Com o propósito de identificar adulterações de azeite de oliva com óleos de soja e canola, obtive-se um número maior de misturas na região de 50 a 10 no 0% de azeite de oliva, que foram utilizadas na calibração multivariada. No total foram 133 misturas.

3.3.2 Obtenção dos espectros no infravermelho

Os espectros foram obtidos com um espectrofotômetro infravermelho, com transformada de Fourier e módulo de refletância total atenuada. A faixa de 3500 a 650 cm^{-1} foi utilizada com uma resolução de 4 cm^{-1} e 40 varreduras. O cristal utilizado nesta técnica contém diamante na sua parte superior e seleneto de zinco no elemento focalizador. Os espectros de cada amostra foram adquiridos em duplicata.

3.3.3 Determinação do teor azeite de oliva em misturas com óleo de soja

3.3.3.1 Obtenção do modelo de calibração pelo método dos mínimos quadrados parciais

O conjunto de espectros empregado para a calibração foi proveniente das misturas preparadas conforme descrito em 3.3.1. Para determinar qual intervalo espectral seria mais adequado para a calibração pelo método do PLS o software MATLAB versão 7.8.0, com o pacote iToolbox e a função iPLS utilizado. Dividiu-se o espectro em segmentos variando de 1 a 100, sendo aplicada a correção multiplicativa do sinal e a centralização dos dados na média, respectivamente, para cada intervalo da segmentação. Desenvolveu-se um modelo de calibração para cada intervalo das segmentações, com o número de variáveis latentes (VLs) sendo determinado através dos resultados da RMSECV. Para cada segmentação do espectro determinou-se o intervalo que resultou no menor valor de RMSECV. A partir destes intervalos selecionou-se o intervalo que apresentou o menor valor para a RMSECV.

A avaliação de amostras anômalas (*outliers*) se realizou por meio de leverage extremo e dos resíduos studentizados, sendo considerados outliers as amostras cujos valores de leverage (h) foram maiores que $3k/n$ (onde: k = número

de variáveis latentes e n = número de amostras de calibração) e além dos valores de $\pm 2,5$ para os resíduos studentizados. A seguir obteve-se um novo modelo, que novamente foi submetido ao teste para identificação de *outliers*. Como critério de parada foi utilizada, a condição em que todas as amostras apresentem valor menor que 0,5 para h , com os valores dos resíduos studentizados entre $\pm 2,5$ (ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS, 2000)

3.4 FIGURAS DE MÉRITO

3.4.1 Exatidão e Precisão

Determinou-se a exatidão a partir da equação (05) para o conjunto de misturas empregado na validação externa. A precisão determinou-se como repetibilidade e precisão média, a partir da equação (06). Para a repetibilidade foram realizadas 6 determinações de uma mesma amostra, e para a precisão média preparou-se 8 misturas de azeite de oliva, óleo de soja e canola, que estejam distribuídas em 95% da faixa utilizada para a análise.

3.4.2 Sensibilidade

Determinou-se a partir da norma do vetor dos coeficientes da regressão estimados pelo modelo PLS selecionado.

3.4.3 Limites de Detecção e Quantificação

Obteve-se 15 espectros de um branco, utilizou-se uma superfície metálica como referência. O sinal analítico líquido (NAS - net analyte signal) determinou-

se para cada espectro, conforme método proposto por Bro e Andersen (2003), sendo obtido o seu desvio padrão. Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir das equações (08) e (09), respectivamente.

3.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS UTILIZADOS NAS MISTURAS

3.5.1 – Preparação de ésteres metílicos

A preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada de acordo com o método proposto por Hartman e Lago (1973) e adaptado por Maia e Rodriguez-Amaya (1993). Foram pesados em tubo de ensaio com tampa rosqueável 30 ± 1 mg de ácidos graxos livres, em seguida adicionou-se 4 mL de solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio em metanol, seguido de agitação e aquecimento em banho de água em ebulição durante cerca de 5 min. Em seguida o sistema foi resfriado em água corrente e adicionou-se 5 mL do reagente esterificante, mistura constituída de cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico na proporção de 1:30:1,5 (m/v/v) e aquecido em banho de água em ebulição por 3 min. Após resfriar o tubo em água corrente, houve adição de 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio, e 2 mL de n-heptano, e 1 mL de padrão interno, seguido de agitação vigorosa por 30 s. Após a separação das fases, retirou-se a fase superior com pipeta de Pasteur e armazenou-se em tubos de eppendorf. Os tubos foram armazenados em congelador ($-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para posterior análise cromatográfica.

3.5.2 – Análise cromatográfica

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo a gás, modelo Clarus 680 GC (Perkin Elmer, Estados Unidos),

equipado com coluna capilar de sílica fundida CP Select CB FAME (100 m x 0,25 mm x 0,25 µm de cianopropilpolisiloxano) e detector de ionização em chama. A temperatura inicial da coluna foi de 165 °C por 10 min, sendo elevada a 235 °C à taxa de 4 °C min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 10 min. As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente, 240 e 250 °C. O volume injetado foi de 2,0 µL, com injeção automática. As velocidades de fluxo dos gases foram de 1,1 mL min⁻¹ para o gás de arraste (He); 40 e 400 mL min⁻¹ para os gases da chama, hidrogênio e ar sintético, respectivamente. As áreas dos picos foram determinadas através do software TotalChrom versão 6.3.2 (Perkin Elmer). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com o de misturas padrão de ésteres etílicos obtidas da Sigma (EUA) e pela co-eluição de amostras com padrões.

3.5.3 – Quantificação dos ácidos graxos

A quantificação dos ácidos graxos dos óleos foi efetuada em relação ao padrão interno, heptadecanoato de metila (17:0), da marca Sigma (EUA), conforme método proposto por Joseph e Ackman (1992). As concentrações de AG foram obtidas a partir da conversão de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) para AG, calculados pela Equação 16. Os resultados foram expressos em mg de ácido graxos g⁻¹ de óleo.

$$C = \frac{FCT \times FCEMAG \times 100 \times MPI \times Ax}{API \times Ma} \quad (16)$$

Onde:

C = Concentração de AG (mg g⁻¹)

FCT = Fator de correção teórico

FCEMAG = Fator de conversão de EMAG para AG

MPI = Massa do padrão interno (mg)

Ax = Área do éster metílico correspondente ao ácido graxo x

API = Área do padrão interno

Ma = Massa de amostra usada (mg)

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os espectros das misturas de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de canola na região do infravermelho médio estão apresentados na Figura 3. Em 3005 cm^{-1} ocorre a absorção correspondente ao estiramento $\text{CH}=\text{CH}$ de duplas ligações *cis*. A região de $2922\text{--}2853\text{ cm}^{-1}$ é caracterizada por bandas intensas, devido aos estiramentos C-H dos grupos metileno e metil terminais das cadeias de ácidos graxos dos triacilgliceróis (Dobson, 2001). Na região de 1744 cm^{-1} ocorre o estiramento C=O do grupo éster dos triacilgliceróis (PEÑA, 2005).

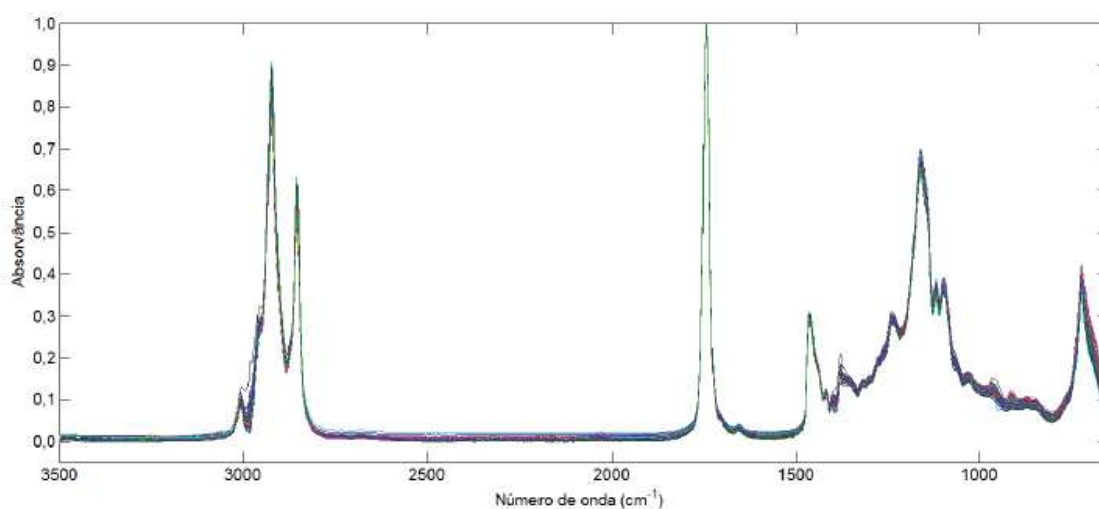


Figura 3: Espectros na região de região do infravermelho médio das misturas utilizadas na obtenção dos modelos PLS.

As bandas na região de $1400\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a deformações angulares de CH_2 e CH_3 , como a deformação angular simétrica em 1377 cm^{-1} (HCH) e a tesoura em 1462 cm^{-1} (de la Mata et al (2012)). Em 1119 e 1095 cm^{-1} estão relacionadas com o estiramento C-O. Em 965 cm^{-1} ocorre a deformação fora do plano (C-H) de hidrogênios olefínicos de duplas ligações *trans*, e em 926 cm^{-1} corresponde a deformação fora do plano de O-H de ácidos carboxílicos (Fritsche and Steinhart, 1997). A banda em 722 cm^{-1} ocorre devido a sobreposição do balanço da cadeia $(\text{CH}_2)_n$ com a deformação fora do plano (C-H) de hidrogênios olefínicos de duplas ligações *cis*.

Os resultados obtidos para a regressão PLS indicaram que a segmentação do espectro em 15 intervalos resultou no modelo com menor valor de RMSECV,

obtido para o intervalo 13 (1219-1030 cm^{-1}), cujo valor foi 3,35, com 6 variáveis latentes (Figura 4). O coeficiente de correlação (r) entre os valores conhecidos e preditos pelo modelo foi 0,988.

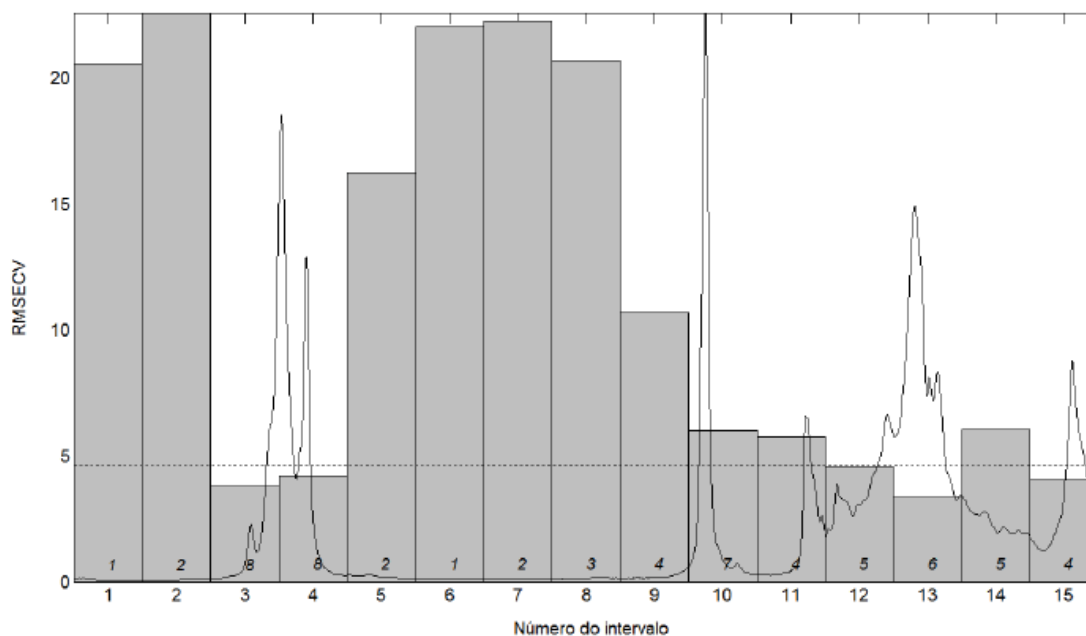


Figura 4: RMSECV dos modelos global com 15 variáveis latentes (linha pontilhada) e obtidos com a segmentação em 15 intervalos (o valor em cada barra corresponde ao número de variáveis latentes que resulta no menor valor de RMSECV).

O modelo selecionado foi avaliado com relação a presença de *outliers*, que foi realizada pela análise do gráfico dos resíduos de Student versus *leverage* (Figura 5). Foram identificados 10 *outliers* no conjunto de calibração, que após a exclusão resultou na melhoria do modelo (RMSECV = 1,44; $r = 0,998$).

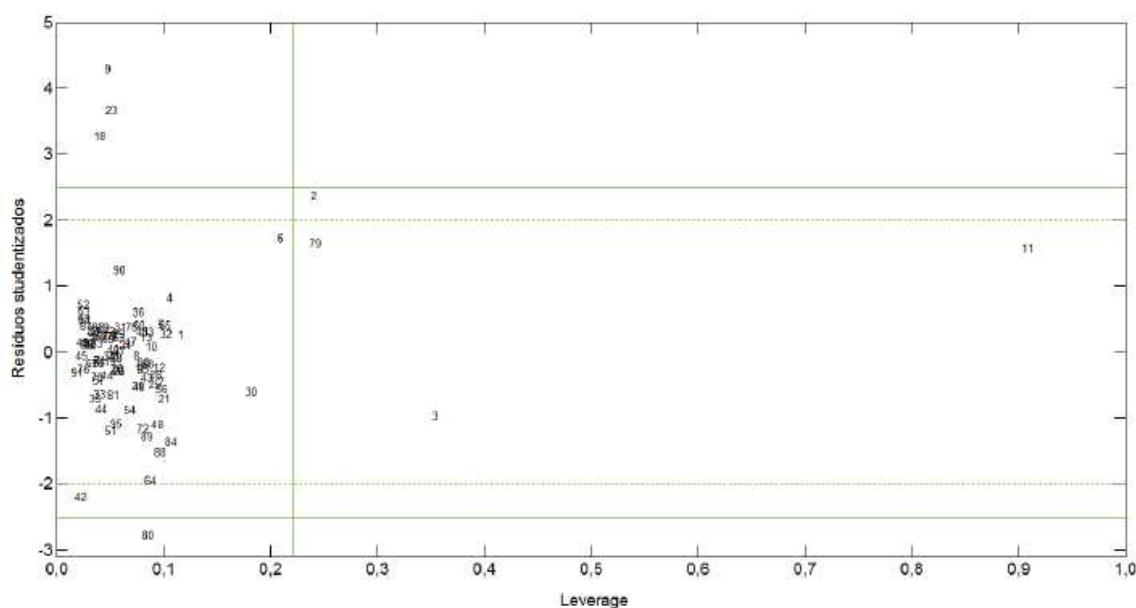


Figura 5: Resíduos studentizados versus leverage do modelo PLS, no intervalo espectral selecionado, para o conjunto de calibração.

Amostras cujos resíduos studentizados e a *leverage* são altos devem ser excluídas. Quando as amostras apresentam baixos valores de leverage, e altos valores para os resíduos studentizados há a suspeita de erros na concentração. Amostras com altos valores de *leverage* e baixos resíduos studentizados podem apresentar erros espectrais ou serem amostras com valores de concentração localizados nas extremidades dos conjuntos de calibração e validação. Dessa forma, estas amostras devem ser examinadas antes de serem removidas (Boysworth and Booksh, 2008).

No conjunto de validação foi encontrado 1 *outlier*. O valor da raiz quadrada do erro médio quadrático de predição (RMSEP) para este conjunto foi 1,89 e o valor de *r* foi 0,998.

Após a exclusão deste *outlier* o valor de RMSEP diminuiu para 1,23, e o valor de *r* passou para 0,999. A avaliação subsequente deste conjunto não mostrou a presença de *outliers*.

A linearidade da calibração foi avaliada pela análise gráfica de dispersão dos resíduos (Figura 6), onde é possível observar uma distribuição aleatória dos erros. Essa forma de distribuição dos erros é um indicativo do comportamento linear (Martens & Naes, 2002).

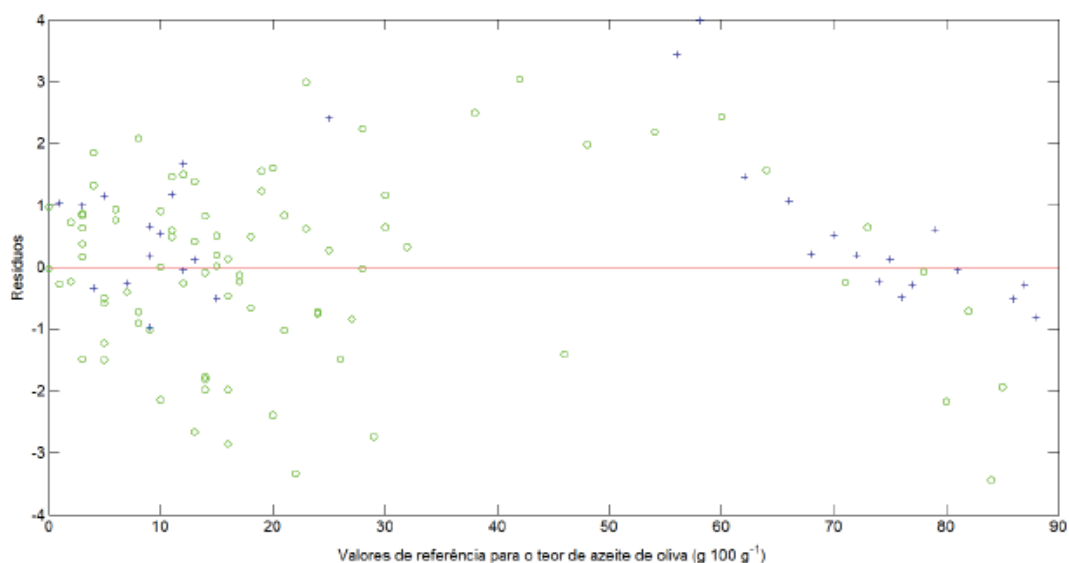


Figura 6: Resíduos versus valores de referência para o teor de azeite de oliva, (o) conjunto de calibração, (+) conjunto de validação.

O ajuste do modelo foi avaliado pelo gráfico dos valores preditos em função dos valores de referência, para o teor de azeite de oliva nas misturas com óleos de soja e canola (Figura 7).

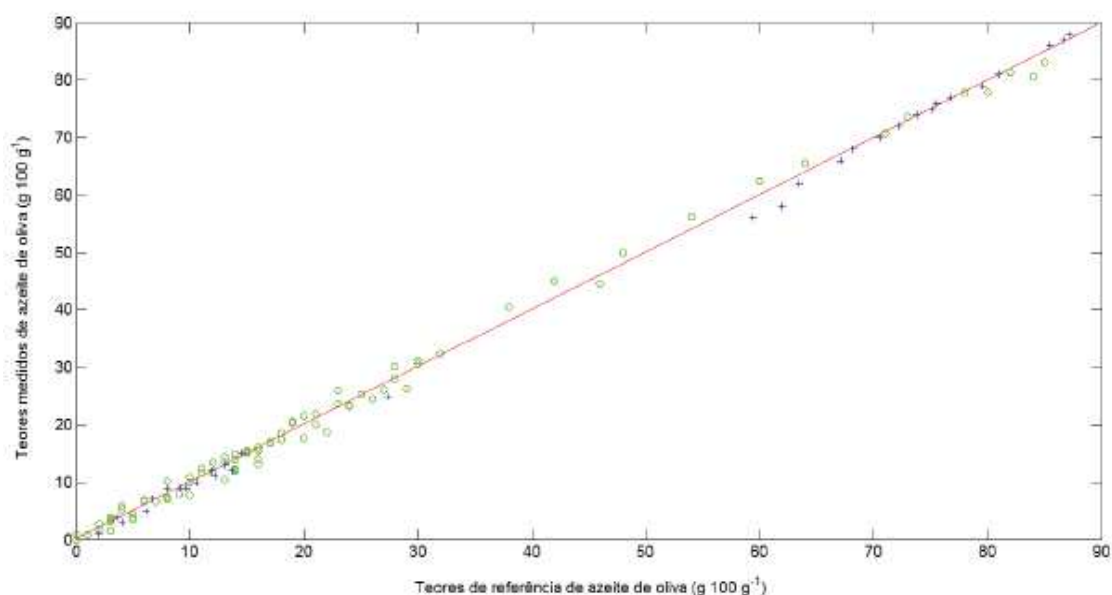


Figura 7: Valores de preditos pelo modelo PLS para o teor de azeite de oliva versus teores de referência, (o) conjunto de calibração, (+) conjunto de validação

Também foi avaliada a relação entre os teores de referência para o azeite de oliva e a norma do sinal analítico líquido (NAS) (Figura 8) para cada amostra,

que corresponde à representação do modelo de calibração multivariada na sua forma pseudo-univariada. Para esta curva, o coeficiente de correlação foi 0,999 e a equação obtida foi $y = 1412,3 \cdot ||nas|| - 4,6585$. Em ambos os gráficos foi observado um comportamento linear.

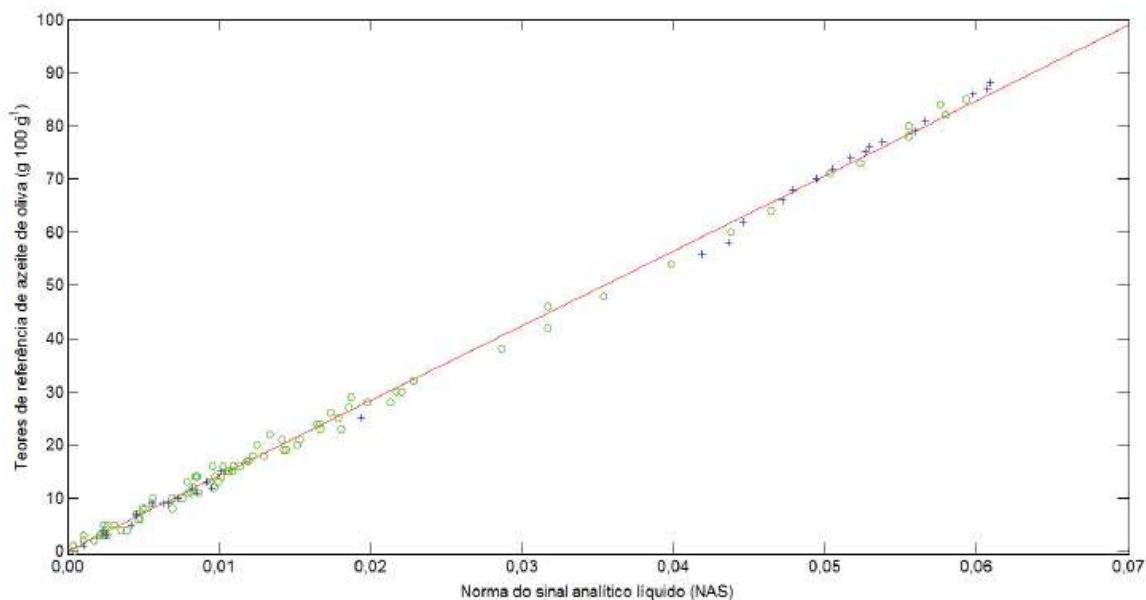


Figura 8: Valores de referência para o para o teor de azeite de oliva versus a norma do sinal analítico líquido (NAS), (+) conjunto de calibração, (o) conjunto de validação

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos para as figuras de mérito estimadas para o modelo de calibração PLS, utilizado na determinação do teor de azeite de oliva em misturas com óleos de soja e canola.

Tabela 1: Figuras de mérito estimadas para o modelo PLS

Parâmetro	Valor
Exatidão - RMSECV ^a	1,44
Exatidão - RMSEC ^a	1,49
Exatidão - RMSEP ^a	1,23
Precisão - repetibilidade ^a	0,39
Ajuste (preditos x referência) - r	0,9987
Ajuste (NAS) - r	0,9988
Sensibilidade	0,00071
Sensibilidade analítica ^b	2,8
Limite de detecção ^a	1,6 – 3,1
Limite de quantificação ^a	4,8 – 9,3

^a g 100 g⁻¹; ^b 100 g g⁻¹

A precisão foi estimada como repetibilidade, cujo valor foi $0,39 \text{ mg g}^{-1}$. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), inferior e superior, foram respectivamente, $1,6$ e $3,1 \text{ mg g}^{-1}$ de mistura e $4,8$ e $9,3 \text{ mg g}^{-1}$. Conforme Alegrini e Olivieri (2014) é adequado em calibração multivariada considerar o LOD e LOQ como faixas de concentração (limites inferior e superior), pois cada amostra no conjunto de calibração tem um valor específico para o LOD e LOQ. A sensibilidade analítica foi $2,80 \text{ (mg g}^{-1})$. O inverso da sensibilidade analítica ($0,36 \text{ mg g}^{-1}$) indica que o método proposto é capaz de distinguir entre amostras que apresentam diferença de $0,36 \text{ mg g}^{-1}$ de azeite de oliva (Munoz, 2002).

Na tabela 2 e nas figuras 9,10 e 11 podemos observar os ácidos graxos que compõem o azeite de oliva, o óleo de soja e óleo de canola. Os ácidos que se encontram em maior quantidade no azeite de oliva foram ácido oleico ($18:1n-9$; 703 mg g^{-1}), seguido pelo ácido palmítico ($16:0$; 121 mg g^{-1}) e pelo ácido linoleico ($18:2n-6$; 74 mg g^{-1}), respectivamente. Para óleo de soja o principal ácido linoleico (498 mg g^{-1}), seguido pelo ácido oleico (238 mg g^{-1}), pelo ácido palmítico (107 mg g^{-1}) e pelo ácido alfa linolenico (55 mg g^{-1}). E para óleo de canola principal ácido encontrado foi o ácido oleico (581 mg g^{-1}), seguido pelo ácido linoleico (190 mg g^{-1}) e pelo ácido alfa linoleico (85 mg g^{-1}).

Tabela 2: Concentração dos ácidos graxos dos óleos de soja, canola e azeite de oliva (mg g^{-1})

ACIDO GRAXO	OLIVA	SOJA	CANOLA
C16:0	$120,85 \pm 7,80$	$107,35 \pm 6,45$	$44,78 \pm 0,50$
C16:1n-7	$11,53 \pm 1,20$	$0,86 \pm 0,05$	$2,31 \pm 0,17$
C18:0	$30,06 \pm 1,16$	$38,92 \pm 2,47$	$19,66 \pm 0,25$
C18:1n-9	$702,69 \pm 41,49$	$237,92 \pm 15,00$	$580,80 \pm 3,11$
C18:1n-7	$25,94 \pm 1,67$	$14,6 \pm 0,94$	$32,39 \pm 0,36$
C18:2n-6	$73,78 \pm 5,82$	$498,36 \pm 31,26$	$189,50 \pm 4,95$
C20:0	$3,64 \pm 0,14$	$3,35 \pm 0,19$	$5,02 \pm 0,15$
C18:3n-3	$7,38 \pm 0,84$	$55,34 \pm 3,21$	$84,59 \pm 4,00$
C20:1n-9	$2,28 \pm 0,15$	$2,01 \pm 0,12$	$9,07 \pm 0,15$
C22:0	$1,00 \pm 0,06$	$4,37 \pm 0,29$	$2,50 \pm 0,07$
OUTROS	$0,46 \pm 0,04$	$9,94 \pm 0,27$	$10,18 \pm 0,50$

Fonte própria.

Ao estudar a composição de azeite de oliva de marcas comercializadas no Brasil, Antoniassi (1998), encontrou teores de ácido oleico que variaram de $57,6$ a

79,12 % do total de ácidos graxos. Para o ácido linoleico foram encontrados teores que variaram de 5,6 a 21,0 % e para o ácido palmítico os teores estiveram entre 9,3 e 15,0 % (Antoniassi et al, 1998). Os teores encontrados no azeite de oliva utilizado neste estudo, para os ácidos oleico (70,3 %), linoleico (7,4 %) e palmítico (12,1 %) ficaram dentro da faixa relatada por este autor.

Zambizai et al (2007) ao determinar a composição de diversos óleos vegetais encontrou para o óleo de soja teores variando de 56,0 a 52,9 % para o ácido linoleico, 7,2 a 7,6 % para o ácido alfa-linolênico, 21,4 a 23,4 % para o ácido oleico e 9,6 a 9,9 % para o ácido palmítico. Para o óleo de canola foram encontrados os teores de 62,4 % para o ácido oleico, 20,1 % para o ácido linoleico e 8,4 % para o ácido alfa-linolênico. Os teores encontrados por estes autores foram próximos dos teores obtidos neste estudos para estes ácidos graxos.

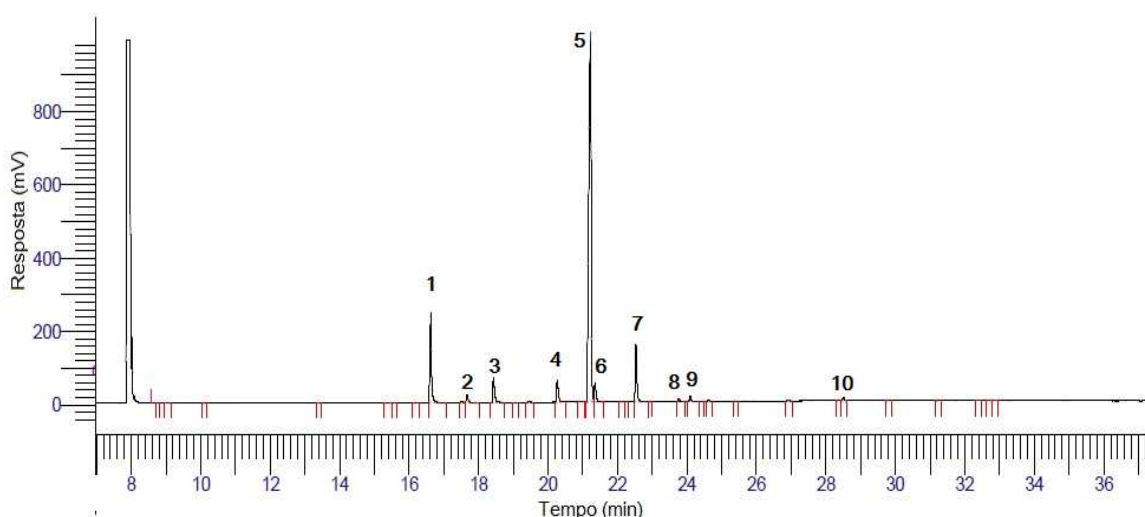


Figura 9: Cromatograma representativo dos ésteres metílicos de ácidos graxos do azeite de oliva. 1- 16:0; 2- 16:1n-9; 3- 23:0; 5- 18:1n-9; 6- 18:1n-7; 7- 18:2n-6; 8- 20:0; 9- 18:3n-3; 10 - não identificado

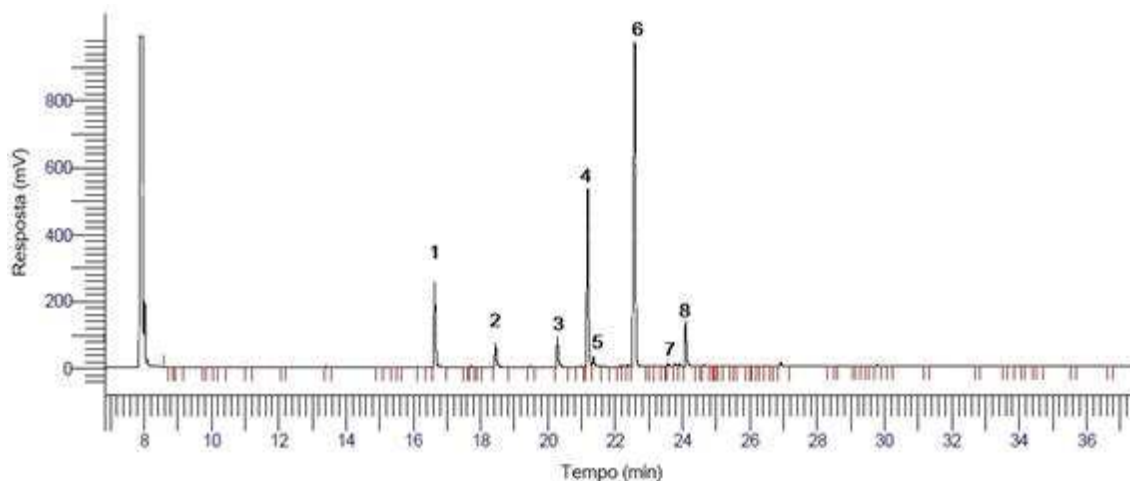


Figura 10: Cromatograma representativo dos ésteres metílicos de ácidos graxos do óleo de soja. 1- 16:0; 2- 17:0 (padrão interno); 3- C16:1n-7; 4- C18:1n-9; 5- C18:1n-7 ; 6- C18:2n-6; 7- C20:0; 8- C18:3n-3.

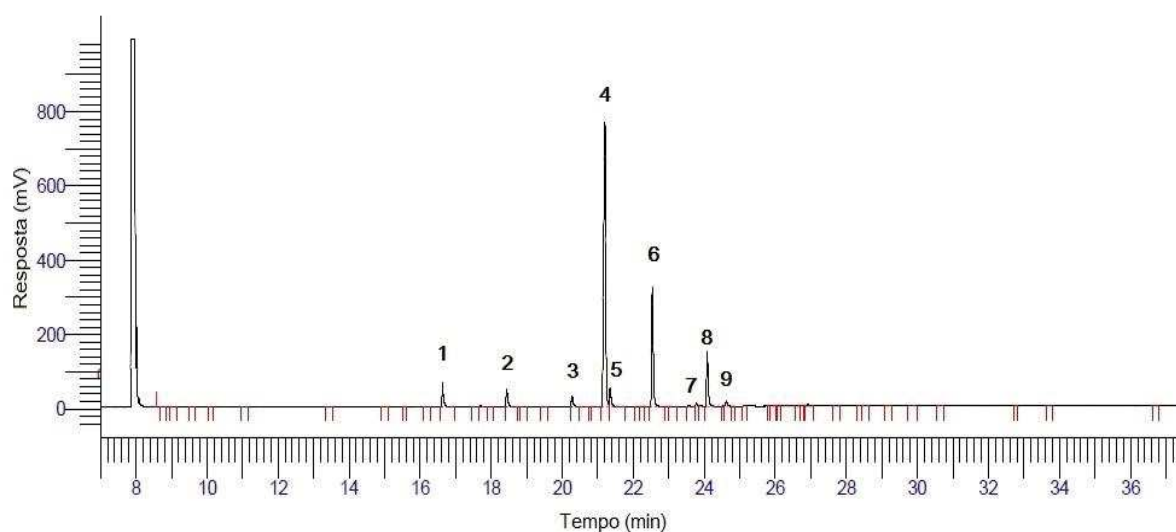


Figura 11: Cromatograma representativo dos ésteres metílicos de ácidos graxos do óleo de canola. 1- C16:0; 2- 17:0 (padrão interno); 3- C16:1n-7; 4- C18:1n-9; 5- C16:1n-7; 6- C18:2n-6 ; 7- C20:0 ; 8- C18:3n-3 ; 9- C20:1;

5. CONCLUSÃO

O método desenvolvido foi considerado exato, preciso, linear e com sensibilidade adequada para a quantificação de azeite de oliva na faixa de 9,3-90 g 100 g⁻¹ de mistura com óleos de soja e canola. Este método pode ser aplicado para a quantificação do teor de azeite de oliva em azeites adulterados com óleos de soja e canola, e em óleos mistos constituídos de azeite de oliva e óleos de soja e canola, cuja comercialização é permitida pela legislação brasileira.

A análise da composição de ácidos graxos dos óleos utilizados no preparo das misturas para a obtenção dos espectros no infravermelho e para a calibração multivariada por PLS não indicou a ocorrência de adulteração.

Com o emprego de métodos de análise classificatória, como análise por componentes principais é possível identificar azeites de oliva adulterados e com o método desenvolvido neste estudo, realizar a sua quantificação em um tempo relativamente curto.

6. REFERÊNCIAS

AMELOTTI, G. Attualità dei metodi di analisi per la ricerca dell'olio di sansa nell'olio di oliva. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v.61, n.3, p.145-150,1984.

ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS. Standards practices for infrared, multivariate, quantitative analysis, E1655. ASTM **International, West Conshohocken, Pennsylvania, USA**. 2000.

ANTONIASS, R. Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva. Braz. **J. Food Technol.**, Campinas, 1(1,2): 32-43, jan/dez.1998

APARICIO, R.; APARICIO-RUÍZ, R. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 93–104.2000.

ASTM - Annual Book of ASTM Standards. Standards practices for infrared, multivariate, quantitative analysis, E1655, vol 03.06. ASTM International, **West Conshohocken**, Pennsylvania, USA, 2000.

]

BELITZ, HANS-DIETER; GROSCH, W. Química de los alimentos. Trad. María Otilia López Buesa. 2 ed. Zaragoza: Espanha, p. 696-698. 1997. BIALKOWSKI, S. E. **Anal. Chem**, v. 60, p. 355. 1988.

BOQUÉ, R.; Rius, F. X. Multivariate detection limits estimators, **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 1996, 32, 11-23

BRAGA ,J. W. B. e POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por

espectroscopia no infravermelho próximo. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 6, 1004-1011, 2004

BRETERON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, **Analyst**. 2000, 125, 2125-2154.

BRO, R. and ANDERSEN, M. - Theory of net analyte signal vectors in inverse regression- **Journal of chemometrics** 2003; 17: 646–652- Published online in Wiley InterScience).DOI:10.1002/cem.832

COATES, J. A review of current new technology: Used in instrumentation for industrial vibrational spectroscopy, **Spectroscopy**., p. 21-34. 1999.

ERICKSON, C. L.; LYSAGHT, M. J.; CALLIS, J. B., **Anal. Chem**, v. 64, p. 1155.1992.

EURACHEM/Citac – Work group. **Quality for research and development and nonroutine analysis**. 1. ed. 1998.

FIRESTONE, O., SUMMERS, J.L., REINA, R.J., ADAMS, W.5. Detection of adulterated and misbranded olive oil products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.62, n.II, p.1558-1562, 1985.

FONSECA, H., GUTIERRE, L. E. Composição em ácidos graxos d e óleos vegetais e gorduras animais, 1974.

GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L.; APARICIO, R. Olive oil authenticity: The current analytical challenges. **Lipid Technology**, v. 18, p. 81–85. 2006.

GELADI, P.; MACDOUGALL, D.; MARTENS, H. **Appl Spectrosc.**, v. 39, p. 491. 1985.

HARRICK, N.J. Multiple Reflection Cells for Internal Reflection Spectrometry, **Anal. Chem.**, v. 36, p. 188-191, 1964.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. **Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids**. Laboratory Practice, London, v. 22, n. 3, p. 475-473, 1973

HELLAND, I. S. **On the structure of partial least square regression**, Communications in statistics – simulation and computation. 1998.

INMETRO. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/azeite-de-oliva-extravirgem.pdf>. Acesso em: 09/04/2017

KAMM, W.; DIONISI, F.; HISCENHUBER, C.; ENGEL, K. H. “Authenticity assessment of fats and oils. **Food Reviews International**, v. 17, p. 249–290. 2001.

ISAKSSON, T.; KOWALSKI, B. R. **Appl Spectrosc.** 1993.

LAGO, R.CA, PAULA, AC, FERREIRA, AAN., PEREIRA, D.A, JABLONKA, EH., MODESTA, RCD. Limite de detecção de misturas de óleo de oliva com óleos de soja, milho e girassol. **Boletim de Pesquisa, EMBRAPA - CTAA**, Rio de Janeiro, RJ (no prelo).1998.

LI-CHAN, E. C. Y.; GRIFFITHS, P. R.; CHALMERS, J. M. **Applications of librational spectroscopy in Food Science**. Chichester, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada. v. 1, p. 345. 2010.

MAIA, E.L., E RODRIGUEZ –AMAYA, D.B., Avaliação de um método econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 53(1/2):27-35,1993.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York: Wiley, 1996.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**. **Ellis Horwood, Chichester**, UK, 1993.

MORCMO, G., ANDREIS, R La determinazione della frazione sterolica mediante GC su colonna capillare applicata al controllo di genuinità dell'olio di oliva vergine e raffinato. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v.60, n.7, p.427-439,1983.

MOROS, J.; GARRIGUES, S.; DE LA Guardia M. Vibrational spectroscopy provides a green tool for multi-component analysis, **Trends Anal. Chemistys**, v.29, p. 578–590. 2009.

OLIVIERI, Alejandro C. Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration. **Chem. Rev.** p. 5372,2014, doi.org/10.1021/cr400455s

ORG OLIVA. Disponível em: <http://www.oliva.org.br/conhecendo-o-azeite.php> . Acesso em: 07 abr. 2015.

OSBORNE, S. D.; JORDAN, R. B.; KÜNNEMEYER, R. Method of wavelength selection for partial least square, **Analyst.**, v. 122, p. 1531-1537. 1997.

PIMENTEL, Sabria Aued., TAKEMOTO, Emy, KUMAGAI, Edna Emy, CANO Cristiane B., Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo ecn 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 1, 31-34, 2008

RIBEIRO, F. A. L. **Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromático**. Dissertação (Mestrado), IQ-UNICAMP, Campinas, 2001.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for rapid authentication and detection of adulteration of food, Annu. **Rev. Food Sci. Technol.** v. 2, p. 17.1–17.17. 2011

RUIZ, D. C.; CAJA, M. M.; HERRAIZ, M.; BLANCH, G. P. Rapid recognition of olive oil adulterated with hazelnut oil by direct analysis of the enantiomeric composition of filbertone. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p.5128–5131. 1998.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2002.

SOARES, L.V, AMAYA, D.R **Identificação e quantificação de adulterantes em óleo de oliva por cromatografia gasosa**. Boletim da SBCTA, v.15, n.1, p.1-17,1981.

SOUZA, M.; BREITKREITZ, M.; FILGUEIRAS, P.; ROHWEDDER J. e POPPI, R . **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 7, 1057-1065, 2013.

SZPIZ, RR, PEREIRA, D.A,JABLONKA, EH. **Avaliação de óleos comestíveis comercializados no Rio de Janeiro**. Boletim de Pesquisa nO 13, EMBRAPA - CTAA, Rio de Janeiro, RI, novembro, 1985.

ULBERTH, F., BUCHGRABER, M. Authenticity of fats and oils. **European Journal of Lipid Science Technology**, v.102, p. 687–694. 2000.

VALDERRAMA, Patrícia. V232a - **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcoleira por espectroscopia no infravermelho próximo** / Patrícia Valderrama.-Campinas, SP: [s.n], 2005.

VISENTAINER, Jesuí Vergilio **Acidos graxos e gorduras: identificação e quantificação**. 2 ed. – Maringá: **Eduem**,2012.

ZAMBIAZI, R. C., PRZYBYLSK, R., ZAMBIAZI, M. W., MENDONÇA, C. B., Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 111-120, jan./jun. 2007