

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PPGTA – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
NÍVEL MESTRADO ACADÊMICO

FRANCIELI CASSIA GOMES BARROSO SIMÃO ALVES

AUTENTICAÇÃO DE ÓLEOS COMESTÍVEIS EMPREGANDO
ESPECTROSCOPIA UV-Vis E QUIMIOMETRIA

Dissertação

CAMPO MOURÃO
2015

FRANCIELI CASSIA GOMES BARROSO SIMÃO ALVES

**AUTENTICAÇÃO DE ÓLEOS COMESTÍVEIS EMPREGANDO
ESPECTROSCOPIA UV-Vis E QUIMIOMETRIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campo Mourão,
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação



<p>A474a Alves, Francieli Cassia Gomes Barroso Simão</p> <p>Autenticação de óleos comestíveis empregando espectroscopia UV-VIS e quimiometria / Francieli Cassia Gomes Barroso Simão Alves– 2015. 64 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientadora: Professora Dra. Patrícia Valderrama Coorientador: Professor Dr. Paulo Henrique Março Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2015. Inclui bibliografias.</p> <p>1. UV-Vis. 2. Modificação genética. 3. Classificação Supervisionada. 4. Alimentos – Dissertações. I. Valderrama, Patrícia, orient. II. Março, Paulo Henrique, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.</p> <p>CDD: 664</p>
--

Biblioteca Câmpus Medianeira
Fernanda Cristina Gazolla Bem dos Santos 9/1735



TERMO DE APROVAÇÃO



AUTENTICAÇÃO DE ÓLEOS COMESTÍVEIS EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA UV Vis E QUIMIOMETRIA

Por:

FRANCIELI CASSIA GOMES BARROSO SIMÃO ALVES

Essa dissertação foi apresentada às catorze horas, do dia dezessete de dezembro de dois mil e quinze, como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciências e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profª. Dra. Patrícia Valderrama (Orientadora - PPGTA)

Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafé (Membro Externo – UTFPR/AP)

Profª. Dra. Fernanda Vitória Leimann (Membro Interno – PPGTA)

Orientador

Professora Dra. Patrícia Valderrama

Coorientador

Professor Dr. Paulo Henrique Março

Dedico este trabalho à minha família. Meus pais, meus irmãos, e em especial ao meu companheiro e amigo Fagner, por todo o amor e incentivo dedicado à mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este mestrado, ter me abençoado todos os dias de minha vida.

A minha família que amo muito, que mesmo longe sempre esteve em contato, transmitindo palavras de incentivo e apoio em todos os momentos.

A minha orientadora, Prof. Dra. Patrícia Valderrama, pelo apoio, amizade, dedicação, paciência, pela confiança depositada em mim, pela excelente orientação e por ser exemplo de profissional. Sua colaboração permitiu não somente o crescimento acadêmico, mas também o crescimento pessoal que levarei pra vida.

As amigas Solange e Franciele com quem compartilhei momentos alegres e difíceis. Aos meus colegas de pós graduação, Marcela, Maresa, Juliana Marques e Anderson, pela amizade, ajuda e companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Tecnologia em Alimentos, pelos ensinamentos.

Aos membros da banca pela disposição e participação. E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO GERAL

Com a busca pela praticidade e rapidez na obtenção dos resultados, torna-se cada vez mais importante a implementação de métodos que possam ponderar se os resultados quantitativos são realmente necessários. Os métodos qualitativos são utilizados como uma triagem que antecede a quantificação e que permite uma redução tanto de tempo como de custos. Estes métodos têm cada vez mais ganhado importância e o uso instrumental proporcionou novas perspectivas e garantia de uma maior confiabilidade e aplicabilidade. O desenvolvimento de metodologias qualitativas aliando métodos instrumentais e quimiometria podem ser apropriados para autenticação de amostras. Desta forma, associado à espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) o método quimiométrico de reconhecimento de padrões supervisionado de mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA), mostrou ser uma ferramenta capaz de autenticar amostras de óleo de soja transgênica e não transgênica, bem como, a autenticação de azeite de oliva extra virgem de acordo com os percentuais de acidez. Além disso, o método proposto permite uma análise rápida e não destrutiva da amostra. Nos estudos, a autenticação de óleos de sojas transgênicos e não transgênicos pode ser atribuída ao deslocamento batocrômico, provavelmente devido às diferenças no grupo cromóforo presente nas amostras transgênicas e não transgênicas, enquanto que nos azeites extra virgem de diferentes percentuais de acidez a autenticação pode ser atribuída a ocorrência de efeitos hiperacrômico e hipocrômico. A espectroscopia na região do UV-Vis permitiu a autenticação geográfica de azeites de oliva da região do Mediterrâneo através do método quimiométrico de análise de componentes independentes (ICA). Por ser um método baseado na independência estatística, diferenças entre as amostras provenientes de diferentes países banhados pelo mar Mediterrâneo puderam ser discriminadas, bem como amostras provenientes de um mesmo país.

Palavras chave: UV-Vis, modificação genética, autenticação, classificação supervisionada.

GENERAL ABSTRACT

The search for practical and quickly results increase the importance of methodologies that can ponder if the quantitative results are really needed. The qualitative methods are used as a prior screening to quantification and allows a reduction of time and costs. These methods have increasingly its importance and the instrumental employ provided new perspectives and ensuring greater reliability and applicability. The development of qualitative methods combining instrumental and chemometric can be appropriate for authentication samples. Thus, coupled with spectroscopy in the ultraviolet and visible region (UV-Vis) the supervised pattern recognition method of partial least squares with discriminant analysis (PLS-DA), showed be a tool to authenticate transgenic and non-transgenic soybean oil samples, as well, extra virgin olive oil according to the acidity percentage. Furthermore, the proposed method promote a rapid and non-destructive analysis of the samples. Authentication studies of transgenic and non transgenic soybeans oils can be attributed to the bathochromic shift, due to differences in the chromophore group present in the transgenic and non transgenic samples, while in the extra virgin olive oils with different acidity percentages the authentication can be attributed to the occurrence of hyperchromic and hypochromic effects. UV-Vis spectroscopy allowed the geographic authentication of extra virgin olive oils from the Mediterranean region through the chemometric method of independent component analysis (ICA). Due the ICA be a method based on statistical independence, differences between samples from different countries around the Mediterranean Sea were authenticated, as well the samples from the same country.

Key words: UV-Vis, genetic modification, authentication, supervised classification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Espectros UV para todas as amostras de óleo de soja. (B) Espectros UV para o óleo de soja não transgênico (□) e transgênico (----).....	30
Figura 2. Q Residuals contra leverage para o modelo PLS-DA. (●) amostras transgênicas na calibração. (○) amostras transgênicas na validação. (■) amostras convencionais na calibração. (□) amostras convencionais na validação.....	31
Figura 3. Distribuição das amostras de calibração e validação nas classes transgênica (A) e convencionais (B). (●) amostras transgênicas na calibração. (○) amostras transgênicas na validação. (■) amostras convencionais na calibração. (□) amostras convencionais na.....	31
Figura 4. Scores da terceira variável latente do modelo PLS-DA. (●) amostras transgênicas na calibração. (○) amostras transgênicas na validação. (■) amostras convencionais na calibração. (□) amostras convencionais na validação.....	32
Figura 5. <i>Loadings</i> da terceira variável latente do modelo PLS-DA.....	33
Figura 6. Espectros UV-Vis de azeites de oliva extra virgem com percentuais de acidez 0,2% (—), 0,3% (—), 0,4% (—) e 0,5% (—).....	41
Figura 7. Resíduos espectrais contra <i>leverage</i> do modelo PLS-DA. (●) amostras de calibração com acidez 0,2%. (○) amostras de validação com acidez 0,2%. (▲) amostras de calibração com acidez 0,3%. (Δ) amostras de validação com acidez 0,3%. (■) amostras de calibração com acidez 0,4%. (□) amostras de validação com acidez 0,4%. (◆) amostras de calibração com acidez 0,5%. (◇) amostras de validação com acidez 0,5%.....	43
Figura 8. Distribuição das amostras de calibração e validação nas classes de azeite de oliva com acidez 0,2% (A), 0,3% (B), 0,4% (C) e 0,5% (D). (●) amostras de calibração com acidez 0,2%. (○) amostras de validação com acidez 0,2%. (▲) amostras de calibração com acidez 0,3%. (Δ) amostras de validação com acidez 0,3%. (■) amostras de calibração com acidez 0,4%. (□) amostras de validação com acidez 0,4%. (◆) amostras de calibração com acidez 0,5%. (◇) amostras de validação com acidez 0,5%.....	44
Figura 9. Scores do modelo PLS-DA para autenticação do teor de acidez. Scores do modelo PLS-DA para autenticação do teor de acidez. (●) amostras de calibração com acidez 0,2%. (○) amostras de validação com acidez 0,2%. (▲) amostras de calibração com acidez 0,3%. (Δ) amostras de validação com acidez 0,3%. (■) amostras de calibração com acidez 0,4%. (□) amostras de validação com acidez 0,4%. (◆) amostras de calibração com acidez 0,5%. (◇) amostras de validação com acidez 0,5%.....	45
Figura 10. <i>Loadings</i> da primeira variável latente do modelo PLS-DA na autenticação do teor de acidez.....	46
Figura 11. Espectros de azeite de oliva extra virgem da região do Mediterrâneo.....	53
Figura 12. Variância explicada pelos componentes principais da PCA.....	54
Figura 13. <i>Loadings</i> da PCA. (A) PC1 (63,63%); (B) PC2 (19,05%); (C) PC3 (12,77%); (D) PC4 (2,36%); (E) PC5 (0,69%); (F) PC6 (0,33%).....	55
Figura 14. (A) <i>Scores</i> ; (B) Sinais IC1. ○ Andaluza-Espanha; ● Catalunha-Espanha; ● Languedoc-França; ● Marseille-França; * Puglia-Itália; * Sicilia-Itália; * Toscana-Itália; Δ Creta-Grécia; Δ Creta-Grécia.....	56
Figura 15. (A) <i>Scores</i> . (B) Sinais IC2. ○ Andaluza-Espanha; ● Catalunha-Espanha; ● Languedoc-França; ● Marseille-França; * Puglia-Itália; * Sicilia-Itália; * Toscana-Itália; Δ Creta-Grécia; Δ Creta-Grécia.....	57

Figura 16. (A) *Scores*. (B) Sinais IC3. ● Andaluza-Espanha; ● Catalunha-Espanha; ● Languedoc-França; ● Marseille-França; * Puglia-Itália; * Sicilia-Itália; * Toscana-Itália; Δ Creta-Grécia; Δ Creta-Grécia 58

Figura 17 - (A) *Scores*. (B) Sinais IC4. ● Andaluza-Espanha; ● Catalunha-Espanha; ● Languedoc-França; ● Marseille-França; * Puglia-Itália; * Sicilia-Itália; * Toscana-Itália; Δ Creta-Grécia; Δ Creta-Grécia 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exatidão e coeficiente de correlação do modelo PLS-DA.	43
Tabela 2. Origem das amostras de azeite de oliva extra virgem e seus índices de acidez.....	52

Sumário

CAPÍTULO I	17
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.2 ESPECTROSCOPIA UV-Vis	19
1.3 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	20
1.3.1 MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS COM ANÁLISE DISCRIMINANTE.....	20
1.3.2 ANÁLISE DE COMPONENTES INDEPENDENTES ATRAVÉS DO ALGORITMO JADE.....	22
1.4 AUTENTICAÇÃO DE ÓLEOS COMESTÍVEIS.....	24
1.5 OBJETIVOS.....	25
1.5.1 OBJETIVO GERAL.....	25
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
CAPÍTULO II.....	26
Autenticação de óleos de soja transgênico e não transgênico por espectroscopia ultravioleta combinada com PLS-DA	
2.1 INTRODUÇÃO	27
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
2.4 CONCLUSÃO.....	33
2.5 REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO III.....	38
Autenticação de azeite de oliva extra virgem com diferentes níveis de acidez por espectroscopia UV-Vis e PLS-DA.....	
3.1 INTRODUÇÃO.....	39
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.4 CONCLUSÃO.....	46
3.5 REFERÊNCIAS.....	47
CAPÍTULO IV.....	49
Autenticação geográfica de azeite oliva extra virgem da região do Mediterrâneo por espectroscopia UV-Vis e ICA.....	
4.1 INTRODUÇÃO.....	50

4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.4	CONCLUSÃO.....	59
4.5	REFERÊNCIAS.....	60
	CAPÍTULO V.....	63
5	CONCLUSÃO GERAL.....	64

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por 5 capítulos. No Capítulo 1 é apresentado uma introdução geral sobre a utilização de métodos qualitativos, desenvolvimento de metodologias qualitativas aliando métodos instrumentais à quimiometria, considerações sobre o método instrumental baseado na espectroscopia na região do ultravioleta e visível e descrição dos métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões supervisionado baseado em mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA) e o método de resolução de sinais nomeado análise de componentes independentes (ICA), empregado para reconhecimento de padrões.

No Capítulo 2, é apresentada a primeira aplicação dessa dissertação denominada “Autenticação de óleos de soja transgênico e não transgênico por espectroscopia ultravioleta combinada com PLS-DA”. Os resultados dessa aplicação encontram-se publicados no periódico científico *Analytical Methods* (ALVES, F. C. G. B. S.; VALDERRAMA, P. Ultraviolet spectroscopy and supervised pattern recognition methods for authentication of transgenic and non-transgenic soybean oils. *Analytical Methods*, 2015, 7, 9702–9706).

O Capítulo 3, trata da segunda aplicação desenvolvida e consiste na “Autenticação de azeite de oliva extra virgem com diferentes níveis de acidez por espectroscopia UV-Vis e PLS-DA.” Os resultados referentes à essa aplicação serão divulgados em periódico científico e encontra-se em fase de redação.

A última aplicação realizada nessa dissertação consistiu na “Autenticação geográfica de azeite de oliva extra virgem da região do Mediterrâneo por espectroscopia UV-Vis e ICA” e encontra-se no Capítulo 4. Estes resultados também serão divulgados por meio de periódico científico.

No Capítulo 5 é apresentado uma conclusão geral acerca do trabalho desenvolvido.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A identificação dos componentes de uma amostra é um dos mais antigos problemas da Química. Devido à sua evidente relevância, continua despertando a atenção dos cientistas, em particular dos químicos analíticos (SALDANHA; DE ARAÚJO; NETO, 1999). Com a modernização, a química analítica busca o desenvolvimento de novas técnicas e métodos analíticos que possam identificar de forma segura e que quantifique a composição de amostras complexas, tais como aquelas relacionadas a questões ambientais ou de proteção de alimentos (TRULLOLS; RUISÁNCHEZ; RIUS, 2004). Além do mais, o setor alimentício vem crescendo e com isto os desafios diante das diversidades, exigem laboratórios especializados e com análises técnicas e ensaios competentes (AGUILERA, et al., 2006).

Devido à praticidade, torna-se cada vez mais importante ponderar se os resultados quantitativos são realmente necessários, principalmente quando se trata de laboratórios de rotina, onde comumente aplicam-se uma primeira etapa para determinar a presença ou ausência de um ou mais analitos numa amostra e, em casos confirmativos, realizam-se a segunda etapa, onde determinam o nível de concentração (TRULLOLS; RUISÁNCHEZ; RIUS, 2004) por um processo de análise convencional mais preciso, exato e demorado (VALCÁRCEL et al., 2007). Desta forma os métodos qualitativos são utilizados como uma triagem que antecede a quantificação e que permite uma redução tanto de tempo quanto de custo (TRULLOLS; RUISÁNCHEZ; RIUS, 2004).

A análise qualitativa como dita anteriormente possui característica de natureza binária, ou seja, presença/ausência, sim/não e positivo/negativo, sendo distinguida em dois tipos de análise. Primeiramente, utiliza-se para identificar enquanto no outro caso, é empregada para classificação de amostras (RÍOS; TÉLLEZ, 2005). Em análises qualitativas, as incertezas não podem ser expressas em números como ocorrem em análises quantitativas. No caso dos métodos qualitativos, as incertezas têm uma natureza em torno da probabilidade, onde decisões erradas podem ser tomadas de acordo com as probabilidades. Desta forma, os métodos qualitativos, seguem o conceito de incerteza, que trata-se de uma perda de confiabilidade, onde são definidos pelos limites superiores e inferiores de uma dada concentração, entre os quais o método produz resultados falsos (TRULLOLS; RUISÁNCHEZ; RIUS, 2004; RÍOS; TÉLLEZ, 2005). Portanto, a confiabilidade é uma propriedade dependente das propriedades básicas, tais como

sensibilidade, seletividade e robustez do método, de forma que, em condições inapropriadas a resposta torna-se inadequada. Condições essas, diferentes dos métodos quantitativos, onde a combinação de exatidão e precisão são as propriedades básicas (CÁRDENAS; VALCÁRCEL, 2005).

O fato da análise qualitativa poder ser aplicado com uso instrumental abriu novas perspectivas e garantia de uma maior confiabilidade e aplicabilidade mais ampla. O uso de instrumentos tem a capacidade de traduzir uma propriedade físico-química da substância em um sinal instrumental (VALCÁRCEL, et al., 2007). Em sistemas de rastreamento, os equipamentos variam desde instrumentos simples, como fotômetros, fluorímetros e potenciômetros para ferramentas mais complexas e de alto poder para identificação seletiva e quantificação sensíveis, como cromatógrafos, espectrofotômetros que operam na região do infravermelho, espectrômetros de massas, entre outros (VALCÁRCEL; CÁRDENAS; GALLEGO, 1999).

Mesmo sendo considerada uma resposta de natureza binária, a análise qualitativa juntamente com o desenvolvimento da quimiometria, pode ser apropriada para autenticação de amostras, pois a quimiometria, permite desenvolver modelos matemáticos de classificação supervisionada e de caráter exploratório (VALCÁRCEL, et al., 2007).

1.2 ESPECTROSCOPIA UV-Vis

Existem muitas vantagens de usar espectroscopia como uma técnica de detecção de amostras complexas no controle de qualidade. A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, cuja relação matemática é utilizada para as medições de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se:

$$A = -\log \frac{I_o}{I} = -\log(T) = \epsilon cl \quad (\text{Eq.1})$$

Onde A é a absorbância, I_o é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do

comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e l , a distância percorrida pelo feixe através da amostra (WORKMAN, 1998).

Na espectroscopia a relação entre a resposta dada pelo espectro e a amostra é produzida com base na concentração das substâncias da amostra espécime (WORKMAN, 1998), ou seja, a passagem de um feixe de radiação monocromática em um número sucessivo de moléculas absorventes idênticas resulta na absorção de frações iguais de energia radiante que as atravessa. Desta forma, afirma-se que a absorbância de uma solução é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente em um comprimento de percurso definido; e também diretamente proporcional ao comprimento do percurso quando se fixa a concentração (NUNES, 2008).

As técnicas instrumentais espectroscópicas fornecem uma impressão digital (*fingerprint*) acerca de uma determinada amostra de alimento e, a espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), apesar de pouco seletiva, pode trazer informações estruturais químicas (ZHANG et al., 2011).

Os espectros UV-Vis são normalmente obtidos com um espectrofotômetro e consistem de um gráfico de absorbância (eixo y) (ou transmitância) contra os comprimentos de onda (eixo x). As características principais de uma banda de absorção são a sua posição e intensidade. A posição onde encontra-se a absorção corresponde ao comprimento de onda da radiação, ao qual corresponde a energia necessária para promover a transição eletrônica. Enquanto, que a intensidade de absorção depende exclusivamente de dois fatores: da probabilidade de transição e da energia dos orbitais moleculares. A espectroscopia de absorção molecular nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis) utiliza radiação eletromagnética na faixa espectral compreendida entre 200 e 780 nm. Com a submissão dessa radiação, a molécula de um determinado composto pode sofrer transições eletrônicas em consequência da absorção de energia quantizada (NUNES, 2008). Segundo Bettiol (2014) a absorção está diretamente relacionada com a energia dos orbitais e os tipos de transições eletrônicas ($\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$).

Nas moléculas orgânicas as transições eletrônicas mais importantes são as transições $n \rightarrow \pi^*$ em que os elétrons de um par não-ligante recebe energia quantizada para ir a um estado de maior energia (π ligante). Para os compostos carbonílicos ocorrem as transições $\pi \rightarrow \pi^*$, pois existem elétrons π do oxigênio ou do enxofre ligados

ao carbono e também em compostos insaturados e anéis aromáticos. Alguns termos são utilizados para discussão dos espectros tais como (BETTIOL, 2014);

- Cromóforo: Trata-se de grupos funcionais insaturados covalentes que contém elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas, por exemplo, C=C, C=O ou NO₂;
- Auxócromo: Grupo saturado que, quando ligado a um cromóforo, altera o comprimento de onda com a intensidade da absorção, por exemplo, O-H, NH₂ e Cl;
- Deslocamento batocrômico: É o deslocamento de uma absorção para um comprimento de onda maior devido aos efeitos de substituição ou do solvente (desvio para o vermelho);
- Deslocamento hipsocrômico: Deslocamento de uma absorção para um comprimento de onda menor, devido à substituição ou ao solvente (desvio para o azul);
- Efeito hipercrômico: Aumento da intensidade de absorção;
- Efeito hipocrômico: Redução da intensidade de absorção.

Estes efeitos podem ser de grande importância para as avaliações das absorções espectrais obtidas no espectro UV-Vis.

1.3 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

1.3.1 MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS COM ANÁLISE DISCRIMINANTE

O método de mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA - do inglês, *Partial Least Squares with Discriminant Analysis*) (BARKER; RAYENS, 2003) é um método quimiométrico de reconhecimento de padrão supervisionado, que utiliza as informações prévias das amostras na decomposição dos dados em *scores* e *loadings* (BARKER; RAYENS, 2003). Desenvolvido a partir do método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS - do inglês, *Partial Least Squares*) (GELADI; KOWALSKI, 1986), porém empregado para classificação e discriminação, estes

métodos são baseados no método de análise de componentes principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*). PCA é aplicado como análise exploratória de dados (ALMEIDA et al., 2013). Tanto no PLS-DA como no PLS ocorre uma relação linear entre as variáveis dependentes (**Y**) e a variável independente (**X**). A matriz **X** (constituída por um conjunto de espectros, por exemplo) é decomposta no produto de duas matrizes, *scores* e *loadings*, assim como na PCA, porém em PLS e PLS-DA, ocorre uma pequena rotação no eixo das componentes principais, com o objetivo de obter uma maior correlação de **X** com **Y** e, por isso, os componentes principais passam a ser denominados de variáveis latentes (VLs) por terem perdido a ortogonalidade (GELADI; KOWALSKI, 1986; BASSBASI et al., 2014).

No PLS-DA, a matriz **Y** contém informações em relação às classes das amostras. O número de colunas é igual ao número de classes, sendo assim, cada classe possui uma coluna em **Y**. Para cada classe é assumido o valor de 0 ou 1, indicando se a amostra pertence ou não à classe (BARKER; RAYENS; 2003; MASOUM et al., 2006), na prática estes valores se aproximam destes. É calculado um valor limite (*threshold*) entre os valores previstos onde, valores acima deste valor limite indicam que a amostra pertence à classe modelada. Valores previstos abaixo deste limite indicam que a amostra não pertence à classe modelada.

O modelo consiste em etapas de calibração, onde as características dos dados são investigadas com a finalidade de encontrar um modelo para seu comportamento, e em etapas de validação, em que algumas amostras que não participaram da calibração são utilizadas para avaliar a qualidade do modelo construído (GELADI; KOWALSKI, 1986). A qualidade do modelo construído também pode ser avaliada através dos parâmetros de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade do modelo refere-se ao número de amostras previstas como sendo da classe, dividido pelo número de amostras que realmente pertencem de fato à classe. Enquanto que a especificidade do modelo corresponde ao número de amostras previstas como não sendo da classe, dividido pelo número real de amostras que não são da classe (ALMEIDA et al., 2013).

O número de variáveis latentes pode ser escolhido com base no valor da raiz quadrada da soma do quadrado dos erros de validação cruzada (RMSECV – do inglês, *Root Mean Square Error of Cross Validation*), enquanto que a exatidão do conjunto de previsão é avaliada pelo erro médio quadrático de previsão (RMSEP – do inglês, *Root Mean Squares Error of Prediction*) (PAGANOTTI, 2013), conforme Equações 2 e 3.

$$RMSECV = \frac{\sum_{i=1}^k RMSEPi}{k} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Yi - \hat{Y}i)^2}{n}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde, y_i refere-se ao valor 1 para a classe da amostra “i”, \hat{y}_i é o valor previsto pelo modelo para a amostra “i”, n_{cv} é o número de amostras previstas no processo de validação cruzada e n é o número de amostras previstas.

1.3.2 ANÁLISE DE COMPONENTES INDEPENDENTES ATRAVÉS DO ALGORITMO JADE

A análise de componentes independentes (ICA - do inglês, *Independent Component Analysis*) trata-se de um método de resolução de sinais baseado em separação de fontes cegas, (*BSS* – do inglês, *Blind Source Separation*). Em ICA cada linha da matriz de dados é uma soma ponderada dos sinais de fontes puras, sendo os pesos proporcionais à contribuição dos sinais puros correspondentes a essa mistura em particular. Em química esse algoritmo de separação é utilizado para analisar resultados de técnicas espectroscópicas, de modo a extrair sinais puros de dados que apresentam seus sinais misturados (WANG; DING; HOU, 2008), sem a necessidade de realização de separações físicas, sendo também possível quantificar as concentrações dos seus constituintes. Para isolar o espectro de cada constituinte, o ICA se baseia no pressuposto de que os sinais são estatisticamente independentes (COMON, 1994) e estão distribuídos de forma não-Gaussiana (WANG; DING; HOU, 2008).

No método ICA, a matriz \mathbf{X} não é vista como um conjunto de pontos num espaço multidimensional e sim como um conjunto de sinais (em linhas) com certo número de fontes comuns. Este modelo tende a extrair estas fontes puras, subjacente aos sinais observados, assim como a sua concentração em cada mistura (RUTLEDGE & BOUVERESSE, 2013; MISHRA, et al., 2016), e a transformação linear aumenta a independência estatística dos componentes misturados (RUTLEDGE & BOUVERESSE, 2013). Desta forma, os componentes independentes estimados (ICs)

são muitas vezes intimamente relacionados com os perfis espectrais químicos dos constituintes (WANG; DING; HOU, 2008).

O ICA foi proposto pela primeira vez como método de processamento estatístico em 1986 (HERAULT & JUTTEN, 1986), e sua aplicação em quimiometria apesar de ser recente, está em crescente expansão (RUTLEDGE & BOUVERESSE, 2013) e recebido grande atenção em química analítica para pré-processamento, exploração, classificação e regressão (DU, 2004). Matematicamente o ICA pode ser descrito segundo a Equação 4:

$$\mathbf{X} = \mathbf{AS} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde a matriz \mathbf{X} representa o conjunto de espectros, a matriz \mathbf{A} carrega informações acerca das amostras e é também chamada de *scores*, \mathbf{S} contém os sinais que cada constituinte apresentaria isoladamente, sendo a combinação linear dos sinais puros (também chamado de componentes independentes).

Deve-se observar que na Equação 4 apenas \mathbf{X} é conhecido, assim \mathbf{A} e \mathbf{S} precisam ser estimados. Para determinar o valor de \mathbf{S} é necessário encontrar uma matriz de transformação linear, denominada \mathbf{W} , que torna os dados independentes. A matriz \mathbf{W} é capaz de realizar o processo inverso de \mathbf{A} . Como $\mathbf{W} = \mathbf{A}^{-1}$ a Equação 5 pode ser usada para estimar \mathbf{S} e \mathbf{A} .

$$\hat{\mathbf{S}} = \mathbf{WX} \quad (\text{Eq. 5})$$

Para estimar \mathbf{W} , o algoritmo JADE (do inglês, *Joint Approximate Diagonalization of Eigenmatrices*) respeita a restrição de independência estatística, empregando diagonalização conjunta para otimizar a segunda ordem e a quarta ordem cumulantes dos dados e não necessita de quaisquer estimativas iniciais, por isso evita problemas de convergência (BOUVERESSE; BENABID; RUTLEDGE, 2007). Este algoritmo pode ser resumido como (WANG; DING; HOU, 2008):

a) Estimar uma matriz de transformação linear, $\hat{\mathbf{W}}$:

$$\mathbf{Z} = \hat{\mathbf{W}}\mathbf{X} \quad (\text{Eq. 6})$$

b) Estimar um conjunto de matriz, \hat{Q}_i^z , de matrizes cumulantes;

c) Localizar a matriz de rotação, \hat{R} .

d) Estimar A :

$$\hat{A} = \hat{R}\hat{W}^{-1} \quad (\text{Eq. 7})$$

ou estimar os componentes:

$$\hat{S} = \hat{A}^{-1}\mathbf{X} = \hat{R}^{-1}\mathbf{Z} \quad (\text{Eq. 8})$$

A principal vantagem do algoritmo JADE sobre os outros algoritmos tais como, FastICA (HYVARINEN & OJA, 1997) e Infomax (BELL & SEJNOWSKI, 1995), é que ele é baseado na diagonalização de matrizes, como é feito em outros métodos quimiométricos, como PCA, por exemplo, porém este último não fornece informações químicas a respeito da amostra, enquanto o ICA é capaz de separar os espectros puros dos constituintes e determinar as concentrações dos mesmos (BOUVERESSE ; RUTLEDGE, 2012).

1.4 AUTENTICAÇÃO DE ÓLEOS COMESTÍVEIS

A segurança dos alimentos vem crescendo em termos de importância no mundo, principalmente em relação as preocupações com a qualidade de vida e seus impactos no mercado internacional. A adoção de limites estreitos de rotulagem e certificação exige a aplicação de métodos apropriados, baseados em altos níveis de padrões metrológicos internacionais (ABRAHÃO, 2008).

O setor de óleos e gorduras tem sido alvo de adulteração, deliberadamente ou não intencionalmente por diluição de óleo de alto preço com óleos mais baratos, prática bastante encontrada em azeites de oliva. A prática de adulteração em óleos é complexa de detectar, pois na maioria das vezes o óleo utilizado na adulteração tem características similaridades, em termos de composição química e cor ao do óleo original (ROHMAN, et al., 2014). A mistura de óleos comestíveis é uma prática comum e adequada para

formar produtos, porém, se as informações contidas no rótulo se desviam das proporções da mistura e, se comercializado como genuíno, é considerado fraude (ULBERTH et al., 2000). Além disso, o limite estabelecido de 1,0 % para presença de transgênicos em alimentos, acima do qual a rotulagem passa a ser obrigatória, gerou a demanda por materiais de referência para controle e quantificação em matérias-primas e alimentos (ABRAHÃO, 2008). Desta forma, desenvolvimento de metodologias que possam contribuir com a avaliação da autenticidade dos óleos de soja transgênicos e não transgênicos e azeites de oliva extra virgens tornou-se muito importante para órgãos regulamentadores e controles de qualidade.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a autenticidade de óleos comestíveis através do emprego da espectroscopia UV-Vis e quimiometria.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a potencialidade do método quimiométrico de reconhecimento de padrões PLS-DA no estudo da autenticidade de óleos de soja transgênico e não transgênico, e azeites de oliva extra virgem;
- Avaliar a aplicabilidade da espectroscopia UV-Vis combinada com o PLS-DA, na autenticação de óleos de soja transgênico e não transgênico, e azeites de oliva extra virgem;
- Avaliar a autenticidade geográfica de azeites de oliva extra virgem do mediterrâneo através do uso de espectroscopia UV-Vis e combinada com método quimiométrico ICA.

CAPÍTULO II

Autenticação de óleos de soja transgênico e não transgênico por espectroscopia ultravioleta combinada com PLS-DA

Autenticação de óleos de soja transgênico e não transgênico por espectroscopia ultravioleta combinada com PLS-DA

2.1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*, (L.)Merril) tornou-se um dos produtos agrícolas mais empregado no mundo como ingrediente no setor alimentício tanto humano como animal, além disso o Brasil é um exportador de grãos e de seus derivados, como farelo e óleos (ABRAHÃO, 2008).

O cultivo de soja transgênica no país teve permissão pelo governo em 2003. Ao avaliar e comparar as propriedades dos grãos transgênicos e não transgênicos, a soja transgênica ganhou espaço e se tornou de grande importância para crescente produção agrícola (ABRAHÃO, 2008), principalmente após a aprovação da Lei de Biossegurança, em março de 2005, quando foi autorizado a produção e comercialização de produtos geneticamente modificados (MENEGATTI & BARROS, 2007). No Brasil, o Decreto nº 4.680, de 24 de Abril de 2003, exige que na comercialização de alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou seja produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, com mais de 1% do produto, deve ser informado expressamente em seu rótulo sobre sua natureza transgênica (BRASIL, 2003).

Com a implementação da lei, surgiu à necessidade crescente da realização de análises que visam a classificação e controle da presença de elementos transgênicos nos alimentos, onde os resultados obtidos possam ser comparados em diversos laboratórios, assim como também a calibração e validação de métodos e equipamentos que possam atender aos regulamentos vigentes (ABRAHÃO, 2008). A falta de métodos disponíveis para distinguir entre, alimentos transgênicos e seu convencional é um fator problemático. Dentre os métodos analíticos, vários têm sido desenvolvidos utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR - do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) (EHLERS et al., 1997). Este é um dos métodos mais recomendados e utilizados mundialmente para detecção e quantificação de transgênicos em matéria prima e alimentos (ABRAHÃO, 2008). Atualmente, as maiorias dos métodos baseiam-se em

duas estratégias para detecção de transgênicos, tais como, detecção de DNA ou de detecção de uma nova proteína que é diferente e especificamente expresso em plantas transgênicas, porém este não é adequado para alimentos processados (ARUGULA; ZHANG; SIMONIAN, 2014).

Os autores ALISHAHI et al., (2010) concluíram em sua revisão sobre a identificação de alimentos transgênicos usando espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR – do inglês, *Near Infra Red*) que a espectroscopia futuramente poderia ser um excelente substituto dos procedimentos antecedentes, tais como PCR e ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbant assay*) que também é baseado na detecção de proteínas e/ou peptídeos, através de anticorpos, monoclonais ou policlonais, que se ligam a estes, o que possibilita a detecção e quantificação (AHMED, 2002). Entretanto, este método é insuficiente para identificar a mutação genética se o gene não for expresso, não produzindo, assim a proteína (MIRAGLIA, et al., 2004). Uma estratégia ideal de detecção e quantificação de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) em alimentos deve combinar diferentes métodos que disponham de técnicas simples, rápida e econômica (CONCEIÇÃO; MOREIRA; BINSFELD, 2006).

O uso da espectroscopia combinada com os métodos quimiométricos, pode ser de suma importância no desenvolvimento de métodos analíticos, que dispensam tratamentos químicos de amostras, facilitando o rastreio de genes transgênicos. Luna et al., (2013) propuseram uma caracterização de óleos transgênicos e não transgênicos empregando a espectroscopia NIR, PCA, PLS-DA e máquinas de vetores de suporte com análise discriminante (SVM-DA - do inglês, *Support Vectors Machine-Discriminant Analysis*). Os mesmos autores propuseram também que a discriminação de amostras de óleo transgênicos e não transgênicos poderia ser realizada utilizando a espectroscopia na região do infravermelho médio, SVM-DA, PLS-DA e modelos independentes de similaridade utilizando componentes principais (SIMCA – do inglês, *Soft Independent Modeling of Class Analogies*).

Considerando as vantagens de aliar a espectroscopia com a quimiometria e a ausência de estudos para autenticação de óleos provenientes de soja transgênica e convencional empregando a região do ultravioleta (UV), o presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento de um método para autenticação de óleos de soja

transgênicos e convencional através do uso da espectroscopia UV combinada com o método PLS-DA.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 105 amostras de óleo de soja, sendo 65 transgênicos e 40 convencional, todas adquiridas no comércio regional de Campo Mourão.

Os espectros dos óleos foram adquiridos em um espectrofotômetro UV-Vis da marca *Ocean Optics* (USB-650-UV-VIS) na região de 200-400nm. As leituras foram realizadas em temperatura de 25°C utilizando cubeta de quartzo de 1mm de caminho óptico.

Todos os pré-processamentos dos espectros e a construção do modelo PLS-DA, foram realizados no software MATLAB R2007B (*The MathWorks Inc., Natick, USA*). Os espectros na região UV-Vis das amostras de óleos de soja estudadas tiveram a linha base corrigida através do algoritmo *baseline* do PLS Toolbox e foram suavizados empregando o algoritmo *savgol* (SAVITSKY & GOLAY, 1964) com polinômio de primeira ordem aplicada a cada cinco pontos do espectro.

O modelo PLS-DA foi construído para diferenciar as amostras de óleo de soja transgênico e convencional. Foram utilizadas 75 amostras na etapa de calibração e 30 amostras para a validação do modelo, selecionadas pelo algoritmo Kennard-Stone (KENNARD & STONE, 1969). Os dados foram centrados na média e o número de variáveis latentes foi escolhido baseado no menor valor encontrado para o RMSECV através da validação cruzada em blocos contínuos de 8 amostras.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros UV das amostras de óleo de soja transgênico e convencional são mostrados na Figura 1. Visualmente pouca diferença pode ser observada na região entre 300 e 340 nm.

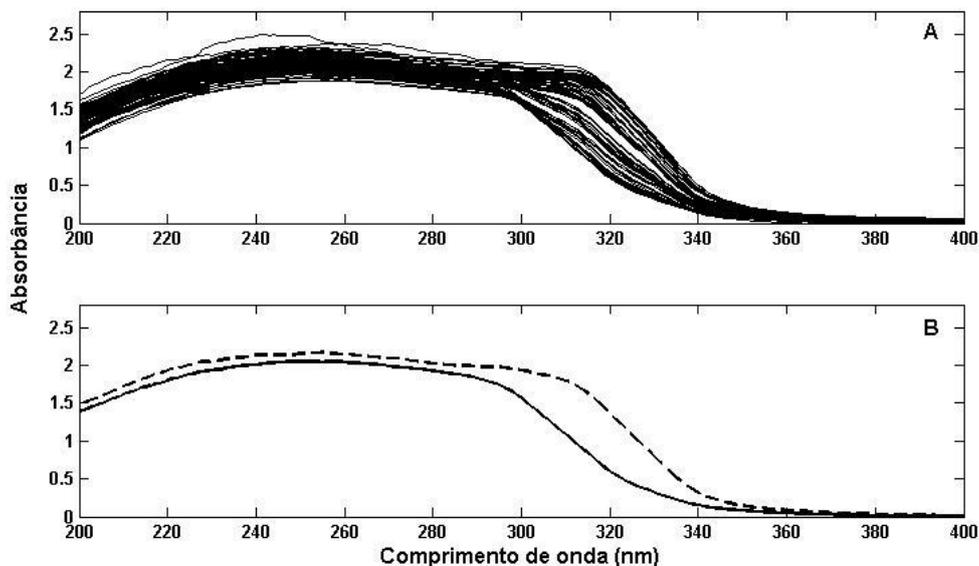


Figura 1. (A) Espectros UV para todas as amostras de óleo de soja. (B) Espectros UV para o óleo de soja não transgênico (—) e transgênico (----).

O modelo supervisionado PLS-DA foi construído com os dados centrados na média, utilizando 8 variáveis latentes de acordo com os valores do RMSECV. O próximo passo consistiu em uma análise para a identificação de amostras anômalas (*outliers*) que corresponde a amostras com um comportamento muito diferente das demais amostras presentes. Esse tipo de amostra pode estar presente em um conjunto de dados por diferentes razões, como por exemplo, erros laboratoriais, amostras de uma outra população ou erros instrumentais (VALDERRAMA et al., 2007). Nesse trabalho, as amostras anômalas dos conjuntos de calibração e validação foram analisadas de acordo com o *leverage* e *Q Residuals*. O *leverage* representa o quanto uma amostra está distante do centro das demais, enquanto *Q Residuals* representa os resíduos espectrais não modelados. De acordo com a Figura 2, não foram identificadas amostras anômalas nos conjuntos de calibração e validação já que nenhuma amostra apresentou altos valores de *leverage* e *Q Residuals*, simultaneamente.

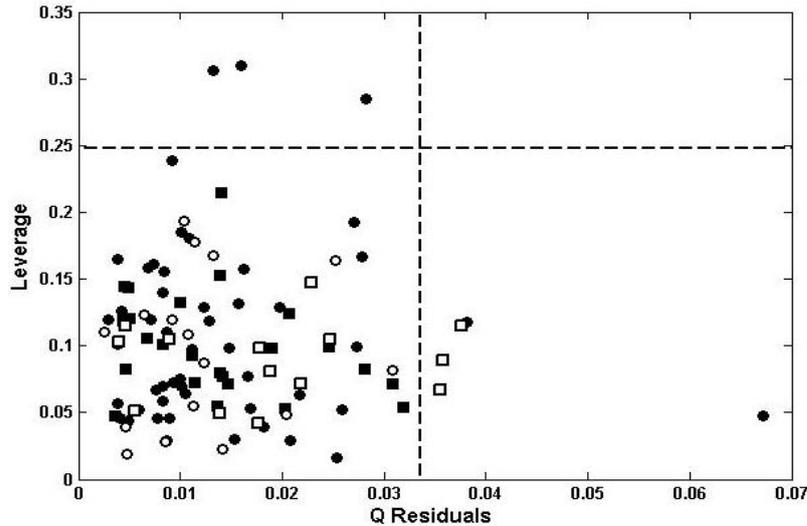


Figura 2. Q Residuals contra leverage para o modelo PLS-DA. (●) amostras transgênicas na calibração. (○) amostras transgênicas na validação. (■) amostras convencionais na calibração. (□) amostras convencionais na validação.

A Figura 3 apresenta a distribuição, realizada pelo modelo, das amostras de calibração e validação nas classes transgênica e convencional. Para ambos os tipos de amostras uma separação nítida pode ser observada e, para o modelo construído, verificou-se uma concordância entre os valores do erro médio quadrático de calibração (RMSEC – *do inglês, Root Mean Squares Error of Calibration*) 0,223 e RMSEP de 0,278, confirmando que a escolha do número de variáveis latentes foi adequada e que o modelo não apresenta sobre ajuste ou falta de ajuste.

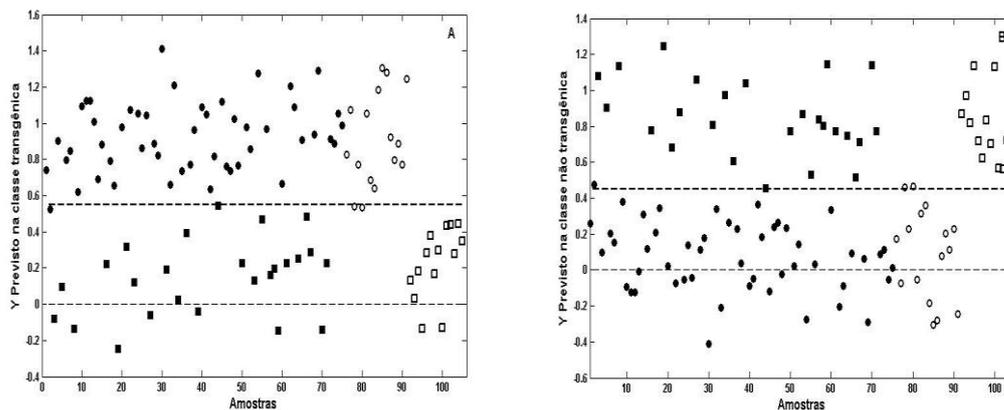


Figura 3. Distribuição das amostras de calibração e validação nas classes transgênica (A) e convencionais (B). (●) amostras transgênicas na calibração. (○) amostras transgênicas na validação. (■) amostras convencionais na calibração. (□) amostras convencionais na

Através dos resultados da Figura 3, é possível determinar a sensibilidade e a especificidade do modelo construído. A sensibilidade do modelo corresponde à sua

habilidade em prever corretamente todas as amostras de validação de uma classe em particular. Se todas as amostras de validação de uma determinada classe forem classificadas corretamente, então a sensibilidade do modelo para aquela classe é igual a 1. No modelo construído a sensibilidade para a classe convencional foi igual a 1 enquanto que para a classe transgênica foi igual a 0,875. Isso significa que o modelo não foi capaz de classificar corretamente todas as amostras da classe transgênica.

A especificidade corresponde à previsão incorreta de amostras de validação de outras classes em uma determinada classe. Dessa forma, se o modelo não apresentar erros de previsão a especificidade do modelo será igual a 1. Na classe convencional a especificidade foi igual a 0,875, pois duas amostras de validação da classe transgênica foram prevista na classe convencional. Por outro lado, a especificidade para a classe transgênica foi igual a 1 devido a nenhuma amostra de validação da classe convencional ter sido prevista como sendo pertencente à classe transgênica. Resultados similares foram reportados por Luna et al. (2015) para modelos PLS-DA e SVM-DA na discriminação de óleo de soja transgênico e não transgênico através da espectroscopia NIR.

Os *scores* do modelo PLS-DA são apresentados na Figura 4, onde uma separação entre as amostras de óleo de soja transgênica e convencional pode ser observada. Os resultados indicam que as amostras convencionais são discriminadas pela parte positiva de LV3, enquanto que as amostras transgênicas são discriminadas pela parte negativa de LV3.

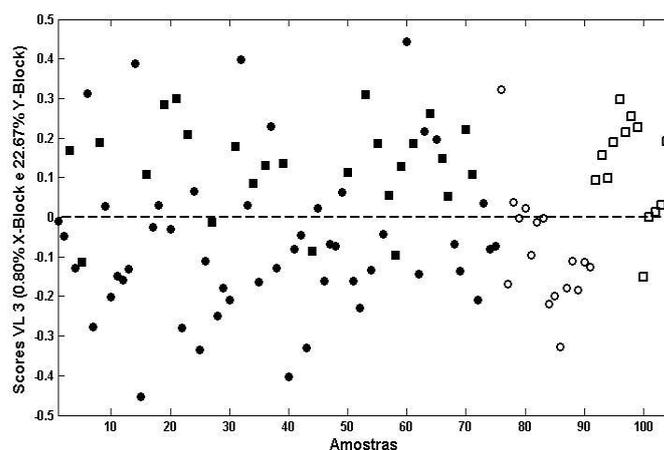


Figura 4. Scores da terceira variável latente do modelo PLS-DA. (●) amostras transgênicas na calibração. (○) amostras transgênicas na validação. (■) amostras convencionais na calibração. (□) amostras convencionais na validação.

Os *loadings*, apresentados na Figura 5, mostram que a região entre 300-340nm contribui para uma diferenciação para as classes transgênica e convencional. Ainda analisando a Figura 5 é possível afirmar que o pico em torno de 300-310nm contribui para identificação da classe transgênica porque apresentam *loadings* negativos na VL3. Na classificação das amostras na classe convencional, o pico em torno de 330nm é o mais importante apresentando *loadings* positivo na VL3.

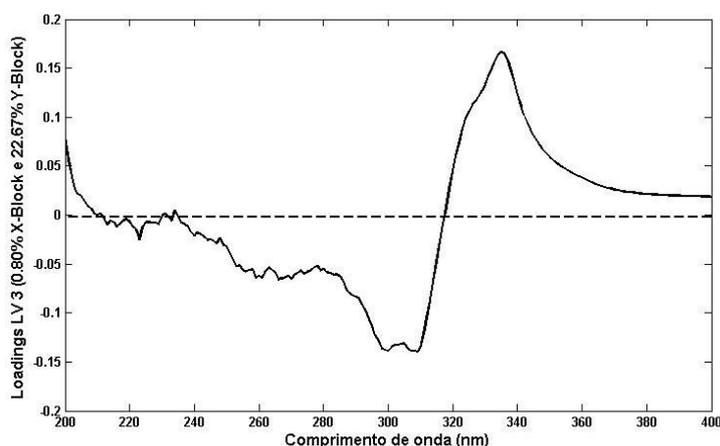


Figura 5. *Loadings* da terceira variável latente do modelo PLS-DA.

Comparando os espectros para o óleo de soja transgênica e convencional da Figura 1B, com os *loadings* da Figura 5, é possível atribuir a diferenciação entre as classes devido a ocorrência de um deslocamento batocrômico, provavelmente devido a diferenças nos grupos cromóforos presentes nas amostras transgênicas e não transgênicas.

2.4 CONCLUSÃO

A espectroscopia UV associada com o método quimiométrico PLS-DA mostrou ser uma ferramenta capaz de autenticar amostras de óleo de soja transgênica e convencional. Além disso, o método proposto permite uma análise rápida e não destrutiva do óleo de soja, sem qualquer preparação da amostra. Mesmo com a falta de seletividade da espectroscopia UV, quando esta é acoplada com o método quimiométrico supervisionado PLS-DA, a técnica é capaz de promover a autenticação de óleos de soja transgênica e não transgênicas. A capacidade de espectroscopia UV

para a autenticação pode ser atribuída ao deslocamento batocrômico, provavelmente devido às diferenças no grupo de cromóforo presente nas amostras transgênicas e não transgênica.

2.5 REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, O. S. **Rastreabilidade de soja Roundup Ready® em produtos agrícolas e derivados : produção de materiais de referência e uso de marcadores AFLP Rastreabilidade de soja Roundup Ready® em produtos agrícola.** (Tese Doutorado) Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2008.

AGUILERA E, LUCENA R, CARDENAS S, VALCARCEL M, TRULLOLS E, RUISANCHEZ I. Robustness in qualitative analysis: a practical approach. *Trends Analytical Chemistry*, v. 26 n. 6 p.621-7, 2006.

AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. v. 20, n. 5, p. 215–223, 2002.

ALISHAHI, A.; FARAHMAND, H.; PRIETO, N.; COZZOLINO, D. Identification of transgenic foods using NIR spectroscopy: A review. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, n. 1, p. 1–7, 2010.

ALMEIDA, M. R.; FIDELIS, C. H. V.; BARATA, L. E. S.; POPPI, R. J. Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. **Talanta**, v. 117, p. 305–311, 2013.

ARUGULA, M. A.; ZHANG, Y.; SIMONIAN, A. L. Biosensors as 21st century technology for detecting genetically modified organisms in food and feed. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 119–129, 2014.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial Least Squares for Discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, 166, 2003.

BASSBASI, M.; LUCA, M. DE; LOELE, G.; OUSSAMA, A.; RAGNO, G. Prediction of the geographical origin of butters by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) applied to infrared spectroscopy (FTIR) data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33 , n. 2, p. 210-215, 2014.

BELL, A.J., SEJNOWSKI, T.J. An information-maximisation approach to blind separation and blind deconvolution. **Neural Computation**, v.7, p.1129–1159, 1995.

BETTIOL, A. D. **Avaliação das propriedades fotoquímicas de moléculas impregnadas em resinas poliéster.** (Dissertação) – Criciúma, SC, 2014.

BOUVERESSE, D. J.-R.; BENABID, H.; RUTLEDGE, D.N. Independent component analysis as a pretreatment method for parallel factor analysis to eliminate artefacts from multiway data. **Analytica Chimica Acta**, 589, p.216–224, 2007.

BOUVERESSE, D.J.-R. ; RUTLEDGE, D.N. Introduction à l'analyse en composantes indépendantes et comparaison avec l'analyse en composantes principales. **Société des Experts Chimistes de France**, 976, 35-41, 2012.

BRASIL. Decreto n° 4.680, de 24 de Abril de 2003. **Regulamenta o direito a informação, assegurado pela Lei n° 8.078, de 11 de setembro de 1990**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de Abril de 2003.

CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Analytical features in qualitative analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 477–487, 2005.

COMON, P. Independent component analysis, A new concept. **Signal Processing**, v.36 p. 287-314, 1994

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, Â. N.; BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 315–324, 2006.

DU, Q. Independent component analysis to hyperspectral image classification. **Imaging Spectrometry X**, vol. 5546, pp. 366–373, 2004.

EHLERS, V. B.; STRAUCH, E.; GOLTZ, M.; KUBSCH, D.; WAGNER, H.; MIADHOF, H.; BENDIEK, J.; APPEL, B.; BUHK, H.-J. Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. **Bundesgesundhbl.** v.4, p.118-121, 1997.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R.; Partial least square regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

HERAULT, J.; JUTTEN, C. Space or time adaptive signal processing by neural network models: neural networks for computing. **In: Conference of the American Institute of Physics**, v.1 p. 206-211, 1986.

HYVÄRINEN, A., OJA, E. A fast fixed-point algorithm for Independent Component Analysis. **Neural Computation**, v.9, p.1483–1492, 1997.

KENNARD, R.W.; STONE, L.A. Computer aided desing of experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969.

LUNA, A. S.; SILVA, A. P. da; PINHO, J. S. A.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R. Rapid characterization of transgenic and non-transgenic soybean oils by chemometric methods using NIR spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 100, p. 115–119, 2013.

LUNA, A. S.; SILVA, A. P. da; PINHO, J. S. A.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R. A novel approach to discriminate transgenic from non-transgenic soybean oil using FT-MIR and chemometrics. **Food Research International**, v. 67, p. 206–211, 2015.

MASOUM, S.; BOUVERESSE, J.; VERCAUTEREN, M.; JALALI-HERAVI, M. RUTLEDGE, D. N. Discrimination of wines based on 2D NMR spectral using learning vector quantization neural networks and partial least squares discrimination analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, p. 144-149, 2006.

MENEGATTI, A. L. A.; BARROS, A. L. M. Análise comparativa dos custos de produção entre soja transgênica e convencional: um estudo de caso para o estado do Mato Grosso do Sul. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.45, n.1,jan./mar. 2007.

MIRAGLIA, M.; BERDALB, K. G.; C. BRERAA, C.; CORBISIERC, P.; HOLST-JENSENB, A.; KOKD, E. J.; MARVIND, H. J. P.; SCHIMMELC, H.; RENTSCHE, J.; VAN RIED, J. P. P. F.; ZAGONF, J. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1157-1180, 2004.

MISHRA, P., CORDELLA, C.B.Y., RUTLEDGE, D.N., BARREIRO, P., ROGER, J.M., DIEZMA, B. Application of independent component analysis with JADE algorithm and NIR hyperspectral imaging for revealing food adulteration. **Journal of Food Engineering**, 168, p.7-15, 2016.

NUNES, P. G. A. **Uma Técnica para Seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada as espectrometrias UV-VIS e NIR.** (Tese Doutorado) p. 121, 2008.

PAGANOTTI, R.S. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de própolis utilizando técnicas espectrométricas e análise multivariada.** (Tese Doutorado), 2013.

RÍOS, A.; TÉLLEZ, H. Reliability of binary analytical responses. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 509–515, 2005.

ROHMAN, A.; CHE MAN.; YUSOF, F. M. The use of FTIR spectroscopy and Chemometrics for rapid authentication of extra virgin olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91 p. 207–213, 2014.

RUTLEDGE, D. N.; BOUVERESSE, D. J-R. Independent Components Analysis with the JADE algorithm. **Trends in Analytical Chemistry**, 50, p.22–32, 2013.

SALDANHA, T. C. B.; DE ARAÚJO, M. C. U.; DE BARROS NETO, B. Análise multicomponente simultânea por espectrofotometria de absorção molecular. **Quimica Nova**, v. 22, n. 6, p. 847–853, 1999.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36 n.8, pp 1627–1639, 1964.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137–145, 2004.

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

VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M. Sample screening systems in analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 685–694, 1999.

VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; SIMONET, B. M.; CARRILLO-CARRIÓN, C. Principles of qualitative analysis in the chromatographic context. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 234-240, 2007.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B; POPPI, R. J. Variable selection, outlier detection, and figures of merit estimation in a partial least-squares regression multivariate calibration model. A case study for the determination of quality parameters in the alcohol industry by near-infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55 n. 21, p. 8331-8338, 2007.

WANG, G.; DING, Q.; HOU, Z. Independent component analysis and its applications in signal processing for analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, 27, No. 4, p.368-376, 2008.

WORKMAN, J. J. 1 - Optical Spectrometers. **Applied Spectroscopy**, p. 3–28, 1998.

ZHANG, J.; ZHANG, X.; DEDIU, L.; VICTOR, C. Review of the current application of fingerprinting allowing detection of food adulteration and fraud in China. **Food Control**, v. 22, p. 1126-1135, 2011.

CAPÍTULO III

Autenticação de azeite de oliva extra virgem com diferentes níveis de acidez por espectroscopia UV-Vis e PLS-DA

Autenticação de azeite de oliva extra virgem com diferentes níveis de acidez por espectroscopia UV-Vis e PLS-DA

3.1 INTRODUÇÃO

Para a legislação brasileira é considerado azeite de oliva extra virgem o produto obtido somente dos frutos da oliveira por processos de extração sem refino químico, diferentes dos outros azeites que entram em contato com solventes, processos de re-esterificação ou mistura de óleos. O azeite de oliva é classificado de acordo com a sua acidez. Assim para ser considerado extra virgem é necessário que sua acidez máxima não exceda 0,8 g/100 g de ácido oleico, enquanto que para azeite de oliva virgem a acidez máxima é de 2,0 g/100 g em ácido oleico (BRASIL, 2005). Estes níveis estão relacionados com integridade de matéria prima, cuidados com armazenamento e também com o seu processo de extração. Processamento, que deve envolver somente processos mecânicos com temperaturas controladas, sendo comercializado para consumo sem tratamento de refino (RUIZ-SAMBLÁS et al., 2011), o que garantem ao produto final a conservação de suas características sensoriais e química (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2008).

Os fatores como maturação, estocagem, ação enzimática, qualidade da azeitona e os sistemas de obtenção do azeite (extração mecânica e ou por solvente), grau de refinação ou se apresentam puros ou caso sejam misturas de óleos, tem grande impacto na qualidade, principalmente no índice de acidez, que é de suma importância para classificação e definição da qualidade dos azeites (PEIXOTO; SANTANA; ABRANTES, 1998; SILVA et al., 2012). De acordo com Silva et al., (2012), quanto menor a acidez do azeite de oliva, melhor a sua qualidade e mais saudável, além de ser responsável pelos efeitos benéficos à saúde humana.

O ácido oleico é o ácido graxo monoinsaturado predominante desse produto, apresenta propriedades que são consideradas importantes para a saúde humana e possui menor susceptibilidade a peroxidação lipídica em relação aos ácidos graxos polinsaturados, como o ácido linoleico encontrado em maior proporção em óleo de girassol, e entre outros (OWEN et al., 2000). Outros componentes menores que

possuem atividades biológicas também são encontrados nesse produto (BIANCO, et al., 2002), como antioxidantes e vitaminas (WILLETT, et al., 1995). Além destes, esteróis, álcoois alifáticos, clorofilas, carotenóides, hidrocarbonetos, etc., também fazem parte do conjunto de compostos minoritários, apresentando importância para a qualidade dos azeites e de suma relevância para estudos que avaliam a autenticidade e rastreabilidade de azeite (GARCÍA-GONZÁLEZ, et al., 2008).

Devido a sua peculiaridade, o azeite de oliva é o único produto que se encontra no setor de óleos e gorduras com o seu próprio acordo internacional de comércio. O Conselho Oleícola Internacional (COI) é uma organização intergovernamental que estabelece os mínimos de pureza e critérios de qualidade para cada categoria de azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva. Também são estabelecidas normas de higiene, embalagem e rotulagem, além da recomendação de aplicação de determinados métodos analíticos (AUED-PIMENTEL et al., 2008).

A adulteração de azeites e averiguação da veracidade das informações expressas no rótulo tornou-se um problema preocupante tanto para os produtores como os consumidores. Desta forma, é de grande importância o aprimoramento e desenvolvimento de técnicas para o controle da qualidade dos azeites de oliva, métodos que sejam capazes de detectar adulterações, bem como apontar se as informações realmente coincidem com as informações presentes nos rótulos. Nesse sentido, esta aplicação tem por objetivo demonstrar a aplicabilidade da espectroscopia UV-Vis combinada com o PLS-DA, na autenticação de azeites de oliva extra virgem com diferentes teores de acidez.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 32 amostras de azeites de oliva extra virgem, sendo 8 amostras para cada percentual de acidez, tais quais, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5% todas da mesma marca produzidos na região de Sevilla na Espanha.

Os espectros dos óleos foram adquiridos em um espectrofotômetro UV-Vis da marca *Ocean Optics* (USB-650-UV-VIS) na região de 200-800nm. As leituras foram realizadas em temperatura de 25°C utilizando cubeta de quartzo de 1mm de caminho óptico.

Os pré-processamentos dos espectros e a construção do modelo PLS-DA, foram realizados no software MATLAB R2007B (The MathWorks Inc., Natick, USA). Os espectros na região UV-Vis das amostras de óleos de soja estudadas tiveram a linha base corrigida através do algoritmo *baseline* do PLS Toolbox e foram suavizados empregando o algoritmo savgol (SAVITSKY & GOLAY, 1964).

Para a construção do modelo PLS-DA, foram utilizadas 20 amostras na etapa de calibração e 12 amostras de validação, selecionadas pelo algoritmo Kennard-Stone (KENNARD & STONE, 1969). Os dados foram centrados na média e o número de variáveis latentes foi escolhido baseado no menor valor encontrado para o RMSECV através da validação cruzada em blocos contínuos de 5 amostras.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 6, são apresentados os espectros UV-Vis dos azeites de oliva extra virgem com diferentes teores de acidez. Por ser uma técnica não seletiva se torna difícil fazer uma atribuição específica de bandas, uma vez que os grupos cromóforos dos diferentes constituintes do azeite podem absorver no mesmo comprimento de onda gerando bandas sobrepostas.

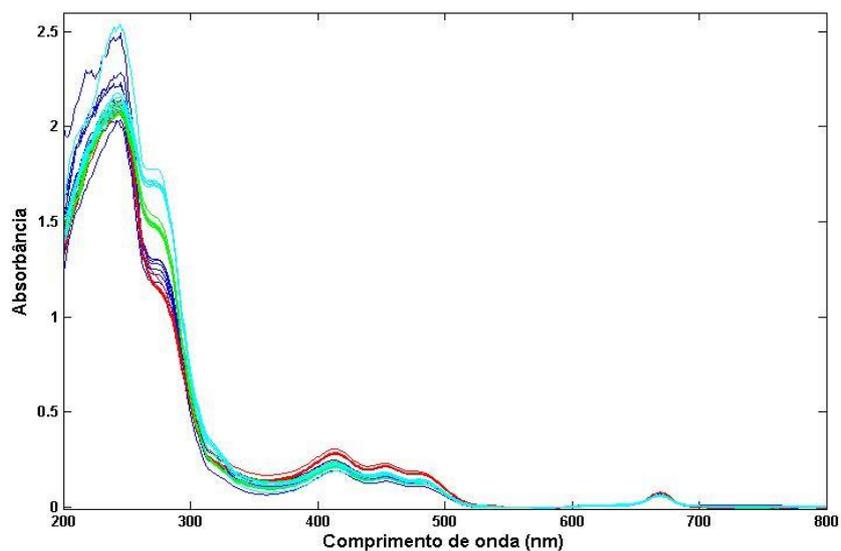


Figura 6. Espectros UV-Vis de azeites de oliva extra virgem com percentuais de acidez 0,2% (—), 0,3% (—), 0,4% (—) e 0,5% (—).

Os autores AYUSO et al. (2004), relatam que os espectros na região do UV-Vis de azeites de oliva apresentam uma banda com vários picos entre 380 e 500 nm correspondem a uma sobreposição das bandas de carotenoides, (PSOMIADOU; TSIMIODOU, 2002; GIUFFRIDA et al., 2007; DOMENICI et al., 2014) aos quais compreendem o β -caroteno e a luteína, que são os carotenoides mais encontrados nos azeite de oliva. Outro pigmento de impacto na absorção UV-Vis é a clorofila, cujas bandas típicas encontram-se próxima a 420 nm, caracterizada por uma banda intensa e sobreposta com uma banda dos carotenóides, e em cerca de 670 nm (PSOMIADOU; TSIMIDOU, 2002; GIUFFRIDA et al., 2007; DOMENICI et al., 2014). As absorções encontradas na região entre 390 e 670 nm podem facilmente ser relacionadas a estes dois pigmentos (AYUSO; HARO; ESCOLAR, 2004). Estes relatos reforçam os resultados encontrados neste estudo. Estas duas classes de pigmentos (carotenoides e clorofila) são importantes para estudos experimentais, e de importância para a avaliação da qualidade, frescor, e os efeitos do envelhecimento causados nos azeites (DOMENICI et al., 2014).

Segundo Peixoto et al. (1998), alguns fatores como maturação, tempo de estocagem do fruto, ação enzimática, qualidade do fruto e tipo de processamento aplicado na obtenção dos azeites possuem potencial para influenciar no índice de acidez. Fatores estes que também influenciam nos pigmentos mencionados acima. Dessa forma, a espectroscopia na região do UV-Vis, apesar de pouco seletiva, fornece informações estruturais químicas, atuando como uma impressão digital (*fingerprint*) da amostra em estudo. Além disso, o *fingerprint* obtido através da espectroscopia UV-Vis aliado ao método PLS-DA pode auxiliar na falta de seletividade da técnica e possibilitar a análise qualitativa de amostras complexas (VALDERRAMA et al., 2014).

Um modelo PLS-DA foi construído para autenticação de azeites de oliva de acordo com os percentuais de acidez, com os dados espectrais centrados na média, empregando 5 variáveis latentes, escolhidas de acordo com os valores do RMSECV. Nesse modelo, as amostras anômalas (*outliers*) foram avaliadas de acordo com o *leverage* e *Q Residuals* no nível de confiança de 99%. O *leverage* corresponde o quanto uma amostra está distante da média das demais, enquanto *Q Residuals* corresponde aos resíduos espectrais não modelados. De acordo com a Figura 7, foram identificados duas amostras anômalas pois apresentam simultaneamente alto valor de *leverage* e alto

resíduo espectral. Essas amostras são pertencentes ao conjunto de validação dos azeites com acidez 0,3% e 0,5% e foram removidas.

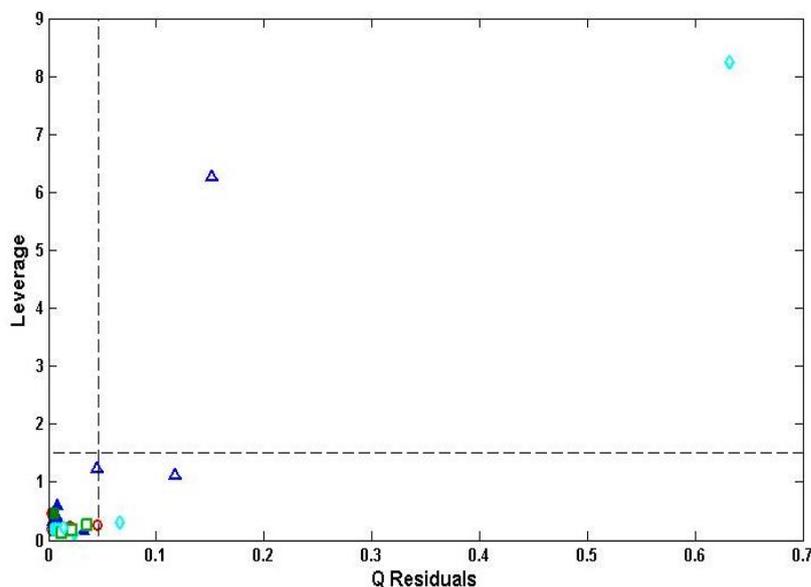


Figura 7. Resíduos espectrais contra *leverage* do modelo PLS-DA. (●) amostras de calibração com acidez 0,2%. (○) amostras de validação com acidez 0,2%. (▲) amostras de calibração com acidez 0,3%. (△) amostras de validação com acidez 0,3%. (■) amostras de calibração com acidez 0,4%. (□) amostras de validação com acidez 0,4%. (◆) amostras de calibração com acidez 0,5%. (◇) amostras de validação com acidez 0,5%.

A exatidão do modelo construído, apresentada na Tabela 1, foi avaliada de acordo com os valores de RMSECV e RMSEP, confirmando que a escolha do número de variáveis latentes foi adequada e que o modelo não apresenta sobre ajuste ou falta de ajuste. Na Tabela 1, também são apresentados os resultados para o coeficiente de correlação para o ajuste do modelo, este parâmetro pode ser considerado um outro indicador de exatidão para o modelo construído (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Tabela 1. Exatidão e coeficiente de correlação do modelo PLS-DA.

Parâmetro	Azeite de oliva extra virgem			
	Acidez 0,2%	Acidez 0,3%	Acidez 0,4%	Acidez 0,5%
RMSECV	0,199	0,276	0,275	0,181
RMSEP	0,043	0,128	0,233	0,117
R	0,999	0,988	0,932	0,974

Na Figura 8 são apresentadas a distribuição das amostras de calibração e validação para as amostras de azeite de oliva de acordo com seus valores de índice de acidez, separadas pelo valor limite (*threshold*), estabelecido pelo modelo PLS-DA. De acordo com a Figura, com a construção do modelo foi possível identificar as amostras de acordo com nível de acidez dos azeites. Como foi identificado a presença de *outlier*, nas Figuras 8 B e D, referentes aos teores de acidez 0,3% e 0,5%, o conjunto de validação foi composto somente por duas amostras.

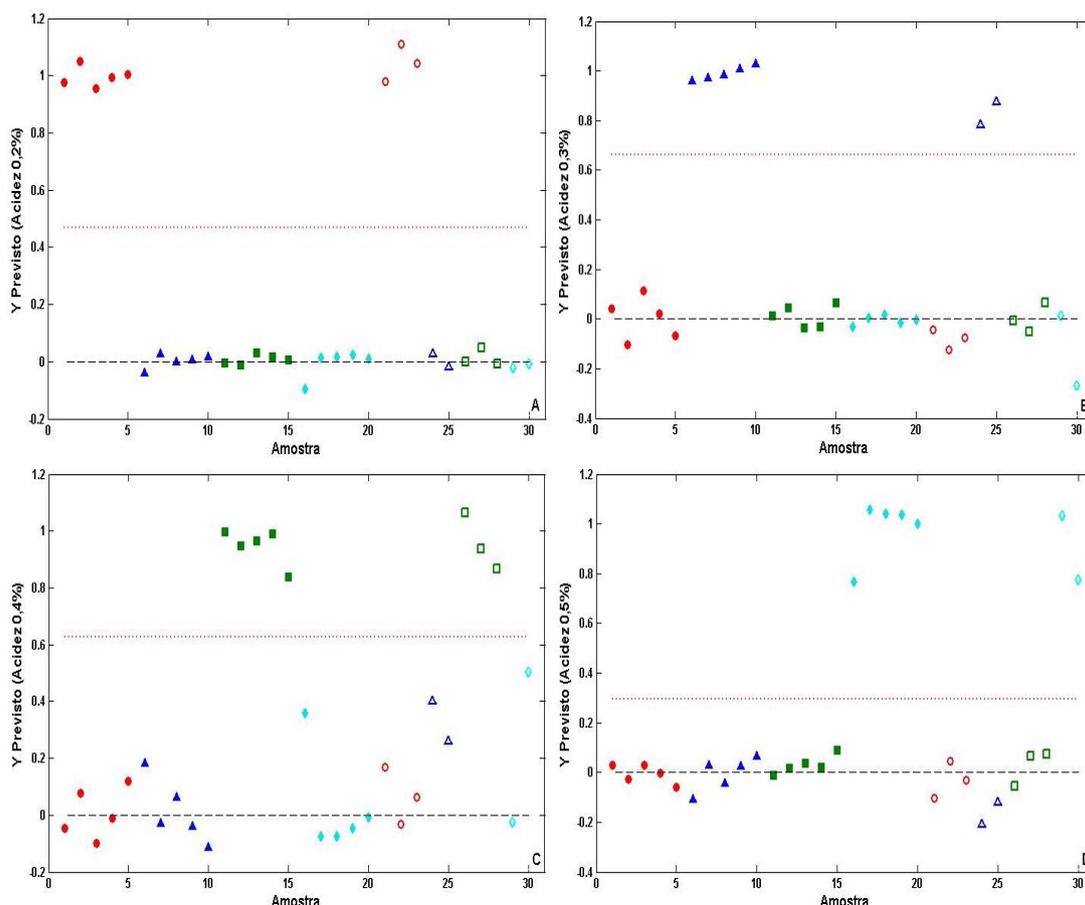


Figura 8. Distribuição das amostras de calibração e validação nas classes de azeite de oliva com acidez 0,2% (A), 0,3% (B), 0,4% (C) e 0,5% (D). (●) amostras de calibração com acidez 0,2%. (○) amostras de validação com acidez 0,2%. (▲) amostras de calibração com acidez 0,3%. (△) amostras de validação com acidez 0,3%. (■) amostras de calibração com acidez 0,4%. (□) amostras de validação com acidez 0,4%. (◆) amostras de calibração com acidez 0,5%. (◇) amostras de validação com acidez 0,5%.

A sensibilidade do modelo PLS-DA, refere-se ao número de amostras previsto como sendo da classe, dividido pelo número de amostras presentes realmente na classe, e a especificidade do modelo, refere-se ao número de amostras previstas como não sendo da classe, dividido pelo número real de amostras que não pertence à classe

(ALMEIDA et al., 2013). De acordo com as definições, o resultado para a sensibilidade e especificidade do modelo construído foi igual a 1, indicando que todas as amostras de validação do azeite de oliva com diferentes teores de acidez foram corretamente classificadas e que nenhuma amostra da validação foi prevista erroneamente. Os *scores* do modelo PLS-DA são apresentados na Figura 9, onde se observa uma separação entre as amostras de azeite de oliva com teor de acidez 0,2% e 0,3% na parte negativa da variável latente 1 enquanto as amostras com teor de acidez 0,4% e 0,5% são separadas pela parte positiva da primeira variável latente.

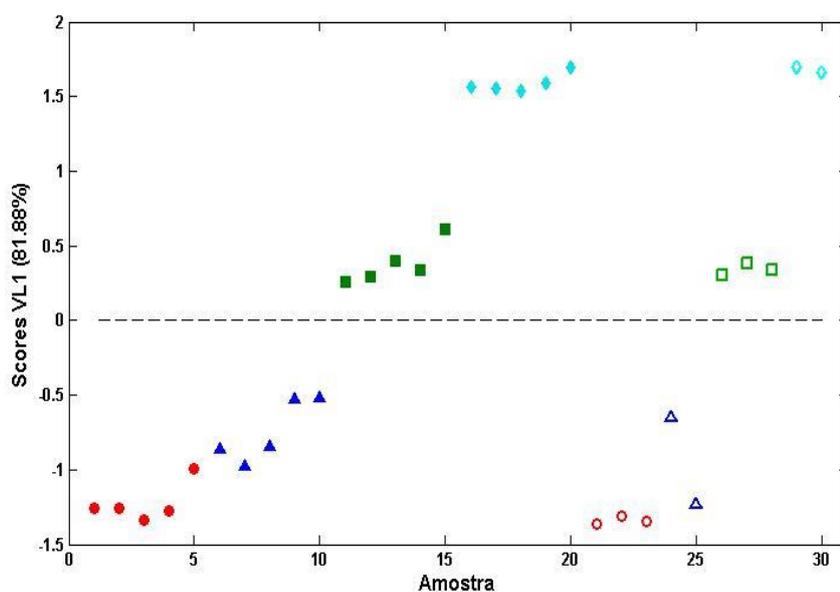


Figura 9. Scores do modelo PLS-DA para autenticação do teor de acidez. Scores do modelo PLS-DA para autenticação do teor de acidez. (●) amostras de calibração com acidez 0,2%. (○) amostras de validação com acidez 0,2%. (▲) amostras de calibração com acidez 0,3%. (△) amostras de validação com acidez 0,3%. (■) amostras de calibração com acidez 0,4%. (□) amostras de validação com acidez 0,4%. (◆) amostras de calibração com acidez 0,5%. (◇) amostras de validação com acidez 0,5%.

Os *loadings*, apresentados na Figura 10, mostram que o pico centrado em torno de 270-280 nm contribui para identificação dos azeites que apresentam teor de acidez 0,4% e 0,5% porque apresentam *loadings* positivos na VL1. Na classificação das amostras com teor de acidez 0,2% e 0,3%, as regiões espectrais características dos carotenoides e da clorofila se mostraram mais importantes apresentando *loadings* negativo na VL1.

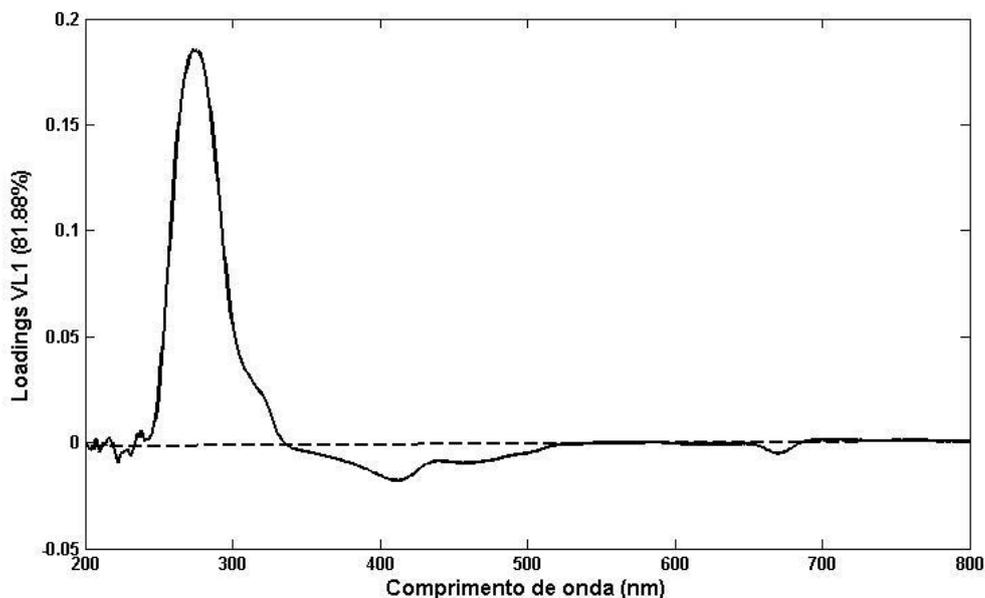


Figura 10. *Loadings* da primeira variável latente do modelo PLS-DA na autenticação do teor de acidez.

Comparando os espectros das amostras de azeite de oliva com diferentes teores de acidez da Figura 6 com os *loadings* da Figura 10 é possível atribuir a diferenciação entre as amostras de acordo com os percentuais de acidez devido a ocorrência de efeitos hiper-crômico e hipocrômico ao longo das regiões espectrais entre 250 – 510 nm e 670 nm. As diferenças observadas são diferenças sutis que se tornam mais evidentes com o emprego do método quimiométrico PLS-DA.

3.4 CONCLUSÃO

A espectroscopia UV-Vis aliada ao método quimiométrico PLS-DA mostrou ser uma ferramenta capaz de autenticar amostras de azeite de oliva extra virgem de acordo com os percentuais de acidez. A metodologia proposta permite uma análise rápida e não destrutiva do azeite, sem a necessidade de preparo da amostra.

Apesar de não ser uma técnica seletiva, a espectroscopia na região do UV-Vis quando acoplada com o método quimiométrico supervisionado PLS-DA, torna possível a autenticação de amostras de azeite de oliva que apresentam diferentes teores de acidez. A capacidade de espectroscopia UV-Vis para a autenticação pode ser atribuída a

ocorrência de efeitos hipercrômico e hipocrômico ao longo das regiões espectrais entre 250 – 510 nm e 670 nm, com destaque para as regiões características de absorção dos carotenoides e da clorofila para as amostras com menores teores de acidez.

3.5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. R.; FIDELIS, C. H. V.; BARATA, L. E. S.; POPPI, R. J. Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. **Talanta**, v. 117, p. 305–311, 2013.

AUED-PIMENTEL, S. TAKEMOTO, E.; KUMAGAI, E. E.; CANO, C. B. Determinação da diferença entre o valor real e o teórico de triaglicerídeos ECN 42 para detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 31–34, 2008.

AYUSO, J.; HARO, M. R.; ESCOLAR, D. Simulation of the Visible Spectra for Edible Virgin Olive Oils : Potential Uses. **Applied Spectroscopy**, v. 58, n. 4, 2004.

BIANCO, A.; COCCIOLI, F.; GUIISO, M.; MARRA, C. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. **Food Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 405 - 411, 2002.

BRASIL. Resolução nº 270, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 set. 2005, Seção I, n. 184, p.372-373.

DOMENICI, V.; ANCORA, D.; CIFELLI, M.; SERANI, A.; VERACINI, C. A.; ZANDOMENEGHI, M. Extraction of Pigment Information from Near-UV Vis Absorption Spectra of Extra Virgin Olive Oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 62 n. 38, pp 9317–9325, 2014.

GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L.; APARICIO-RUIZ, R.; APARICIO, R. Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 7, p. 602–607, 2008.

GIUFFRIDA, D.; SALVO, F.; SALVO, A.; PERA, L. L.; DUGO, G. Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. **Food Chemistry**, v. 101, p. 833–837, 2007.

KENNARD, R.W.; STONE, L.A. Computer aided desing of experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969.

OWEN, R.W.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULE, WE.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and

antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoroids, lignans and squalene. **Food Chemistry Toxicology**, v. 38, 2000.

PEIXOTO, E. R. M.; SANTANA, D. M.N.; ABRANTES, S. Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva - proposta para atualização da legislação brasileira. **Ciência Tecnologia em Alimentos**, vol.18, n.4, pp. 444-452, 1998.

PSOMIADOU, E.; TSIMIODOU, M. Stability of Virgin Olive Oil. 1. Autoxidation Studies. **Journal Agricultural Food Chemistry** v. 50, p. 716-721, 2002.

RUIZ-SAMBLÁS, C.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GONZÁLEZ-CASADO, A.; GARCÍA, F. P. R.; MATA-ESPINOSA, P. DE LA.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Multivariate analysis of HT/GC-(IT)MS chromatographic profiles of triacylglycerol for classification of olive oil varieties. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 6, p. 2093-2103, 2011.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, 1964, 36 (8), pp 1627-1639

SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F. DE.; PIO, R.; ALVES, T. C.; ZAMBON, C. R. Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 2, p.202-209, 2012.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J.; Estado da Arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, 2009.

VALDERRAMA, L.; GONÇALVES, R. P.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Espectroscopia Uv-Vis e Método Quimiométrico na Avaliação de Adulterações e Fraudes em Azeite de Oliva Extra Virgem. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos** v. 5, n. 2, p. 32-4, 2014.

WILLET, W. C.; SACKS, F.; TRICHOPOULOU, A.; DRESCHER, G.; FERRO-LUZZI, A.; HELSING, E.; TRICHOPOULOU, D. Mediterranean diet pyramid: a cultural mode for healthy eating. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 65, p. 1402s- 6s, 1995.

CAPÍTULO IV

**Autenticação geográfica de azeite oliva extra virgem da região do
Mediterrâneo por espectroscopia UV-Vis e ICA**

Autenticação geográfica de azeite oliva extra virgem da região do Mediterrâneo por espectroscopia UV-Vis e ICA

4.1 INTRODUÇÃO

Por conta da riqueza de sua composição, estudos relacionam os benefícios nutricionais da dieta do mediterrâneo com o azeite de oliva, que além de agregar benefícios à saúde (BENDINI et al., 2007; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2008; RAMALHEIRO, 2009), corroboram ao paladar (PEREZ-JIMENEZ, 2005). Para a industrialização e comercialização do azeite é primordial o controle de qualidade, com critérios específicos para avaliação e classificação, que, além disso, permita a sua rastreabilidade (UNIÃO EUROPÉIA 1991; 2007; 2008).

Na literatura, são encontradas várias formas de emprego de técnicas espectrais para avaliação da autenticidade de azeites, como por exemplo: espectroscopia Raman (BAETEN et al., 1996; YANG et al., 2001; YANG et al., 2005), na região do infravermelho médio (YANG et al., 2001; YANG et al., 2005; GURDENIZ et al., 2009; LERMA-GÁRCIA et al., 2010; ROHMAN et al., 2010), na região do infravermelho próximo (YANG et al., 2001; YANG et al., 2005) e na região do ultravioleta e visível (PIZARRO et al., 2013).

O emprego da espectroscopia para esse tipo de avaliação teve os seus primeiros estudos na década de 90 (LAI et al., 1995; BAETEN et al., 1996). A grande vantagem é a facilidade e rapidez da obtenção dos resultados, caso contrário dos métodos convencionais que dispõem de instrumentos complexos, demorados, cansativos e, normalmente, empregam preparo das amostras (LIZHI et al., 2010).

Em se tratando de autenticidade de óleos e gorduras comestíveis, existem três áreas diferenciadas que precisam ser avaliadas, tais como; adulteração econômica, que envolve a mistura de óleos mais baratos com produtos de maior valor; óleos minimamente processados (prensado a frio, não refinado); caracterização e denominação de origem geográfica (ULBERTH; BUCHGRABER, 2000).

Na literatura são poucos os trabalhos encontrados para a caracterização e denominação de origem geográfica quando comparado aos estudos de identificação de óleos adulterantes presentes em mistura de azeite de oliva extra virgem. Por se tratar de

um óleo com características sensoriais e nutricionais específicas, e que podem ser alteradas por variações, como, cultivar, clima e práticas de cultivo, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos que permitam a autenticação de amostras de acordo com a origem geográfica. Os termos “Denominação de Origem Protegida” (DOP) ou então “Indicação Geográfica Protegida” (IGP) são classificações oficiais de garantia da qualidade e autenticidade geográfica (UNIÃO EUROPÉIA, 1992).

A classificação de acordo com a área de produção de óleos de alto valor comercial tem como principal intuito avaliar os principais critérios como, conteúdo de constituintes menores (ácidos fenólicos, ceras, esteróis, hidrocarbonetos), bem como quantificar as diferenças na concentração dos principais componentes que são influenciados pelo clima, solo e variedade predominante cultivada em uma região geográfica específica (ULBERTH; BUCHGRABER, 2000).

A origem geográfica dos azeites está se tornando muito importante para a certificação geográfica e necessita de desenvolvimento de métodos confiáveis (COSIO et al., 2006). Neste sentido, o presente estudo, busca o desenvolvimento de uma metodologia que possa avaliar a autenticidade geográfica de azeites de oliva extra virgem da região do mediterrâneo através do uso de espectroscopia UV-Vis e combinada com método quimiométrico de análise de componentes independentes (ICA) que simplificada a interpretação dos resultados por decompor os dados espectrais originais em sinais puros dos constituintes presentes nas amostras.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 44 amostras de azeites de oliva extra virgem da região do mediterrâneo, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Origem das amostras de azeite de oliva extra virgem e seus índices de acidez.

País	Localidade / Acidez
Espanha	Andaluzia / 0,1 %
	Catalunha / 0,2%
Itália	Puglia / 0,22 %
	Sicilia / 0,35 %
	Toscana / 0,33%
França	Marseille / n.i.
	Languedoc Roussillon / 0,5%
Grécia	Creta / 0,5%
	Creta / 0,4%

n.i. = não informado

Os espectros dos óleos foram adquiridos em um espectrofotômetro UV-Vis da marca *Ocean Optics* (USB-650-UV-VIS) na região de 200-750 nm. As leituras foram realizadas em temperatura de 25°C utilizando cubeta de quartzo de 1mm de caminho óptico.

Os pré-processamentos dos espectros e a construção do modelo ICA, foram realizados no software MATLAB R2007B (The MathWorks Inc., Natick, USA). Os espectros na região UV-Vis dos azeites tiveram a linha base corrigida através do algoritmo *baseline* do PLS Toolbox e foram suavizados empregando o algoritmo savgol (SAVITSKY & GOLAY, 1964).

O algoritmo ICA utilizado para avaliação foi JADE (*do inglês - Joint Approximate Diagonalisation of Eigenmatrices*) (RUTLEDGE & JOUAN- RIMBAUD-BOUVERESSE, 2013).

O número de componentes independentes (ICs) empregado na decomposição realizada pelo ICA, foi definido mediante a percentagem de variância explicada na análise de componentes principais (PCA) (MARÇO et al., 2011) e através da visualização do gráfico dos *loadings* da PCA (VALDERRAMA et al., 2011).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 11 são apresentados os espectros obtidos para as diferentes amostras de azeite de oliva extra virgem provenientes da região do mediterrâneo. A espectroscopia UV-Vis é um técnica não seletiva, o que torna difícil fazer uma atribuição específica de bandas, pois podem ocorrer absorção da radiação por grupos cromóforos dos diferentes constituintes do azeite em um mesmo comprimento de onda, resultando em bandas sobrepostas. Dessa forma, o emprego de um método quimiométrico apropriado pode colaborar na extração de informações relevantes acerca dessas amostras.

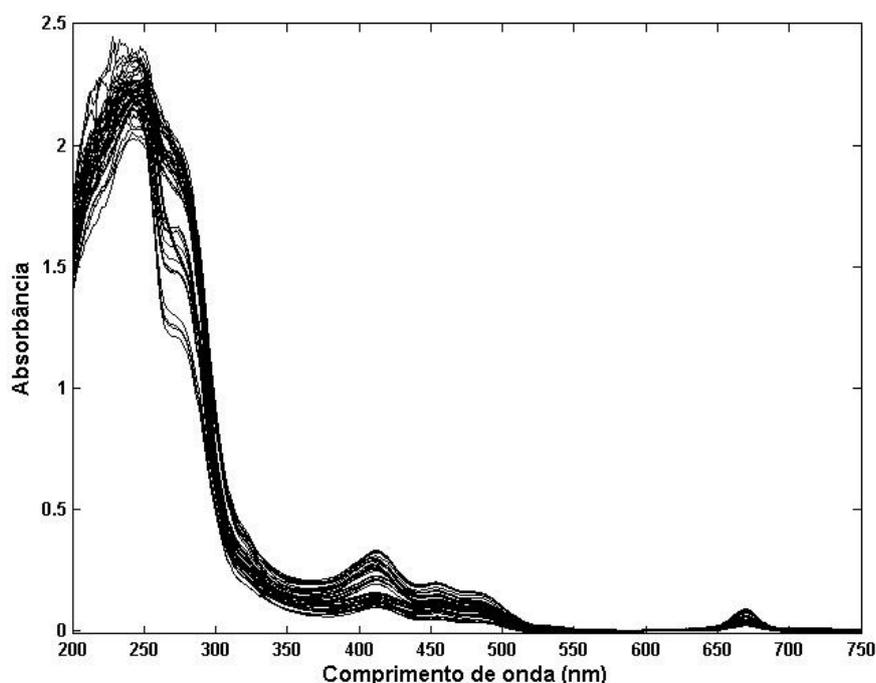


Figura 11. Espectros de azeite de oliva extra virgem da região do Mediterrâneo

A determinação do número de componentes independentes (ICs) corresponde ao número de espécies químicas diferentes presentes na amostra e corresponde ao posto (rank) da matriz de respostas instrumentais. Para tal determinação foram utilizadas informações sobre a percentagem de variância explicada pela PCA e a visualização do gráfico dos *loadings*, obtidos através da PCA (MARÇO et al., 2014). Dessa forma, através da Figura 12, o número adequado a ser escolhido deve ser menor ou igual a seis.

A partir de seis, o gráfico mostra que as percentagens de variância acumulada são muito inexpressivas e a sua consideração pode incorporar ruídos e/ou dados com baixa relevância para o modelo.

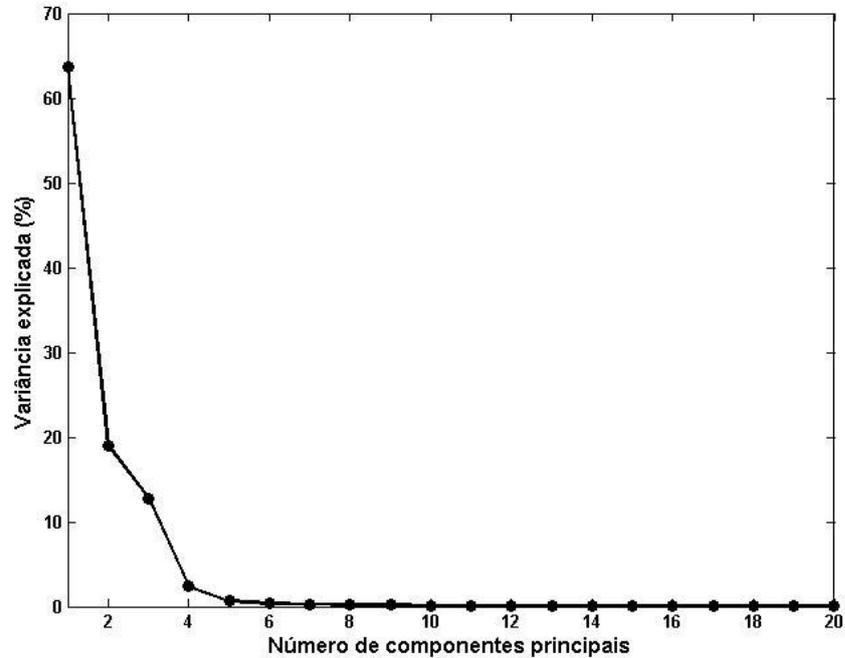


Figura 12. Variância explicada pelos componentes principais da PCA

Outra forma de avaliar o número de ICs é através da visualização do gráfico dos *loadings* (Figura 13), que pode ser suficientemente informativo. Os gráficos de *loadings* trazem a relação de uma PC (do inglês, *Principal Component*) em função das variáveis (comprimento de onda, por exemplo) e se não mostrarem apenas ruído, aquela PC pode ser considerada relevante para o posto da matriz em questão (VALDERRAMA, et al., 2011).

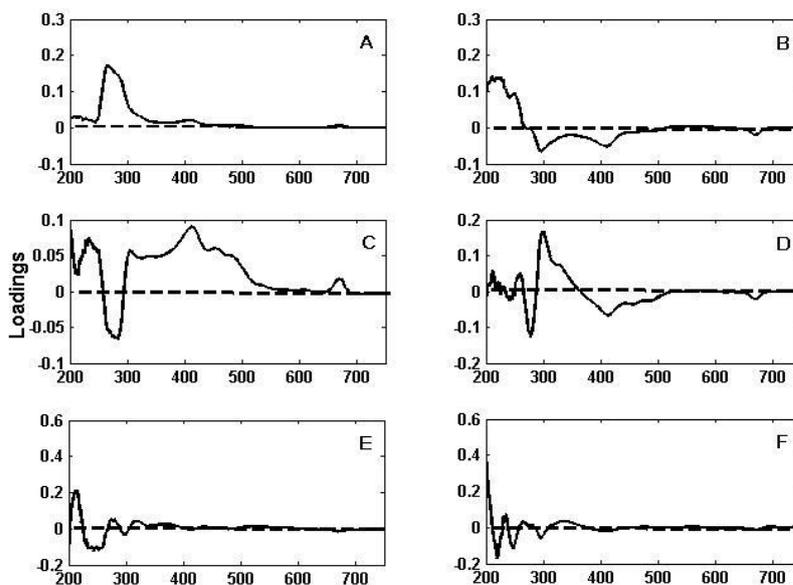


Figura 13. *Loadings* da PCA. (A) PC1 (63,63%); (B) PC2 (19,05%); (C) PC3 (12,77%); (D) PC4 (2,36%); (E) PC5 (0,69%); (F) PC6 (0,33%).

De acordo com a Figura 13, os gráficos E e F que correspondem as PC 5 e 6, apresentam dados ruidosos que não possuem informações de importância significativa para a discussão do trabalho. Desta forma, somente as PCs de 1 à 4, são consideradas componentes de relevância. Assim, esta informação corrobora para determinação do número adequado de ICs a ser utilizado pelo algoritmo JADE na aplicação do método ICA que deve ser igual a 4, ou seja, os azeites de oliva extra virgem estudados, apresentam em um sua natureza quatro constituintes que possuem sinais estatisticamente independentes, provavelmente, por conta que estes devem exceder em termos de proporções entre os demais compostos.

A aplicação do método ICA à matriz de espectros UV-Vis de amostras de azeites de oliva provenientes da região do Mediterrâneo permitiu a obtenção de informações acerca das similaridades entre as amostras no gráfico dos scores, bem como a separação dos sinais espectrais que se apresentavam o mais estatisticamente independentes no gráfico dos sinais. Dessa maneira, pode-se avaliar conjuntamente os resultados gráficos obtidos para realizar a autenticação geográfica dessas amostras atribuindo o constituinte químico responsável pela similaridade observada.

O ICA separou no primeiro IC (Figura 14) o sinal referente aos compostos de oxidação primária presentes em óleos comestíveis devido a fatores como a auto oxidação e presença de luz. Segundo a literatura (VIEIRA & D'ÁRCE, 1998) esse sinal pode ser atribuído a dienos que apresentam absorbância máxima entre 220 – 230 nm. Assim, pode-se inferir que todas as amostras utilizadas no estudo não apresentavam grau inicial de oxidação, conforme mostra o gráfico dos *scores* onde as amostras encontram-se na parte positiva enquanto o respectivo sinal referente aos compostos de oxidação primária estão na parte negativa.

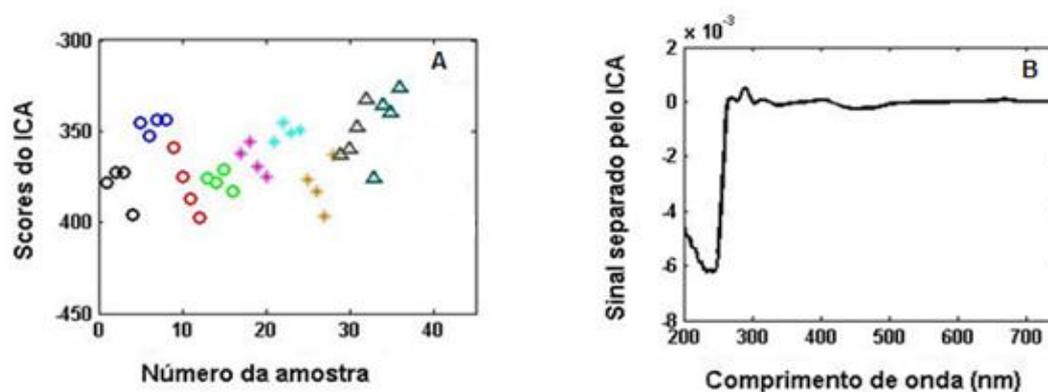


Figura 14. (A) *Scores*; (B) Sinais IC1. ○ Andalusia-Espanha; ○ Catalunha-Espanha; ○ Languedoc-França; ○ Marseille-França; * Puglia-Itália; * Sicilia-Itália; * Toscana-Itália; △ Creta-Grécia; △ Creta-Grécia.

Na Figura 15 são apresentados os *scores* do ICA e o sinal separado na segunda componente independente. Observando o gráfico de *scores*, as amostras apresentaram agrupamentos diferentes, isto mostra que algumas regiões apresentaram similaridades entre si, quando associadas ao sinal separado da IC2. Na IC2, o sinal independente está relacionado com os compostos polifenólicos que possuem absorção conhecida entre 270 -330 nm (FIGUIREDO; RODRIGUES; ZAMORA, 2015). Componentes fenólicos têm um grande impacto sobre os aspectos sensorial e a qualidade, e também possuem relação com os benefícios à saúde (GARCIA-GONZALES; APARICIO-RUIS; RÁMON-APARICIO, 2008).

No agrupamento, os azeites extra virgem de Andalusia (Espanha), Languedoc Roussillon e Marseille (França) apresentam similaridade entre si. Mesmo sendo de países diferentes, o azeite da Andalusia que pertence a Espanha, possui características muito similares aos azeites de Marseille e Languedoc Rousillon da França com relação aos compostos fenólicos. Ainda relacionado ao conteúdo de fenólicos, foram

observadas similaridades também entre as amostras de azeites da Toscana (Itália) e Creta (Grécia). As amostras de Puglia e Sicília (Itália) se mostram semelhantes enquanto que as amostras da Catalunha (Espanha) são distintas das demais.

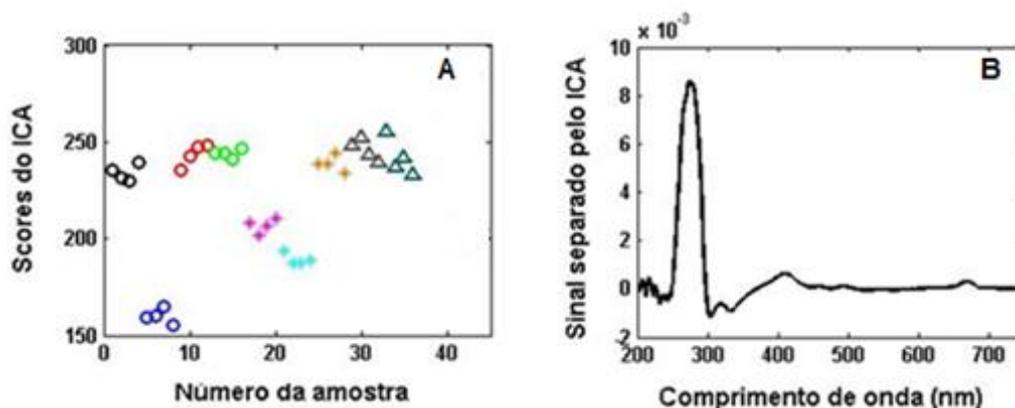


Figura 15 - (A) *Scores*. (B) Sinais IC2. \bullet Andaluzia-Espanha; \circ Catalunha-Espanha; \circ Languedoc-França; \circ Marseille-França; $*$ Puglia-Itália; $*$ Sicília-Itália; $*$ Toscana-Itália; Δ Creta-Grécia; Δ Creta-Grécia.

Na Figura 16, são apresentados os *scores* do ICA e o sinal separado na terceira componente independente. O sinal separado pelo IC3 está relacionado com o tocoferol que possui pico de absorção máxima a 325 nm (GONÇALVES et al., 2014). Os tocoferóis possuem propriedades antioxidantes sendo, muitas vezes, considerado como um critério de pureza (GARCIA-GONZALES; APARICIO-RUIS; RÁMON-APARICIO, 2008).

No gráfico dos *scores* ocorreu uma mudança na distribuição das amostras, onde os azeites de Andaluzia (Espanha) e Languedoc-Roussillon (França) apresentaram similaridades. Outro agrupamento foi observado entre os azeites de Marseille (França), Puglia e Sicília (Itália). As amostras da Toscana (Itália) são similares em relação ao tocoferol às amostras de Creta (Grécia). As amostras de azeite da Catalunha (Espanha) mostraram-se distintas das demais amostras consideradas no estudo.

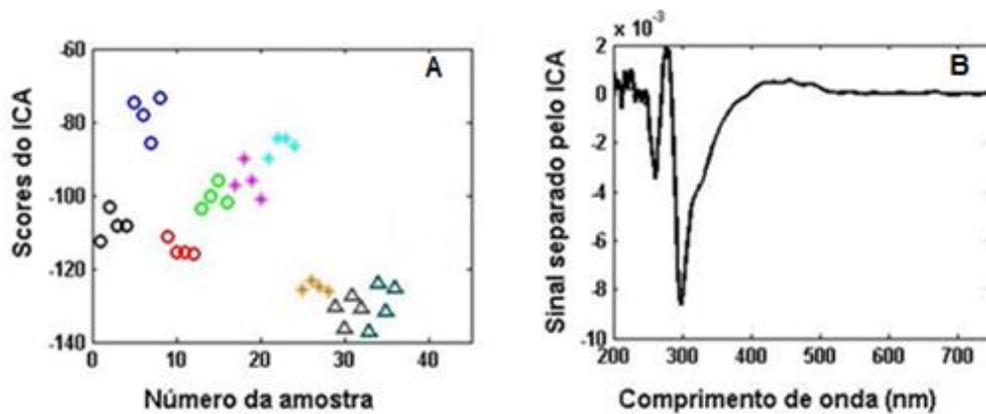


Figura 16- (A) *Scores*. (B) Sinais IC3. **o** Andaluzia-Espanha; **o** Catalunya-Espanha; **o** Languedoc-França; **o** Marseille-França; ***** Puglia-Itália; ***** Sicilia-Itália; ***** Toscana-Itália; **Δ** Creta-Grécia; **Δ** Creta-Grécia.

A IC4 separou os sinais correspondentes à absorção dos carotenóides (α -caroteno, com pico de máxima absorção a 447 nm, β -caroteno, com pico de máxima absorção a 451 nm, e γ -caroteno com pico máximo absorbância a 462 nm) (KOPLÍK, 2015) e a clorofila, que tem bandas de absorção próxima a 420 nm, caracterizada por uma banda intensa e sobreposta com uma das bandas dos carotenóides, e em cerca de 670 nm (PSOMIADOU; TSIMIDOU, 2002; GIUFFRIDA et al., 2007; DOMENICI et al., 2014). A clorofila e os carotenóides são responsáveis pela cor dos azeites de oliva extra virgem que varia de verde-amarelo ao ouro esverdeado. Enquanto os pigmentos de clorofila, como a feofitina, são responsáveis pela cor esverdeada, os pigmentos amarelos são formados pelos compostos como luteína e β -caroteno. A quantidade e as proporções destes pigmentos dependem da cultivar, a maturação e o sistema de processamento de azeite, além das condições de armazenamento (GARCIA-GONZALES; APARICIO-RUIS; RÁMON-APARICIO, 2008).

O gráfico de *scores* do IC4 mostram similaridades entre os azeites da Catalunya (Espanha), Languedoc-Roussillon e Marseille (França), provavelmente por se tratarem de regiões muito próximas. Similaridades com relação aos carotenóides e clorofilas também foram observadas entre as amostras de Puglia e Sicilia (Itália), e entre as amostras de Creta (Grécia). As amostras de azeites de Andaluzia (Espanha) e Toscana (Itália) não apresentaram semelhança com as outras amostras. Segundo García-Gonzales e colaboradores (2008), a relação β -caroteno e luteína permite distinguir azeites espanhóis do italiano e também os azeites gregos, que geralmente apresentam valores para essa razão inferiores a 1,3 mg/kg. Isto pode ser uma explicação para a distinção

observada nessas amostras de azeites. Todavia, a localização de Andaluzia, ao sul da Espanha, em uma região distante das demais e, por outro lado, a Toscana em uma região mais central da Itália, podem ser outro fator que colabora para a distinção dos azeites produzidos nessa região em relação ao conteúdo de carotenos e clorofilas.

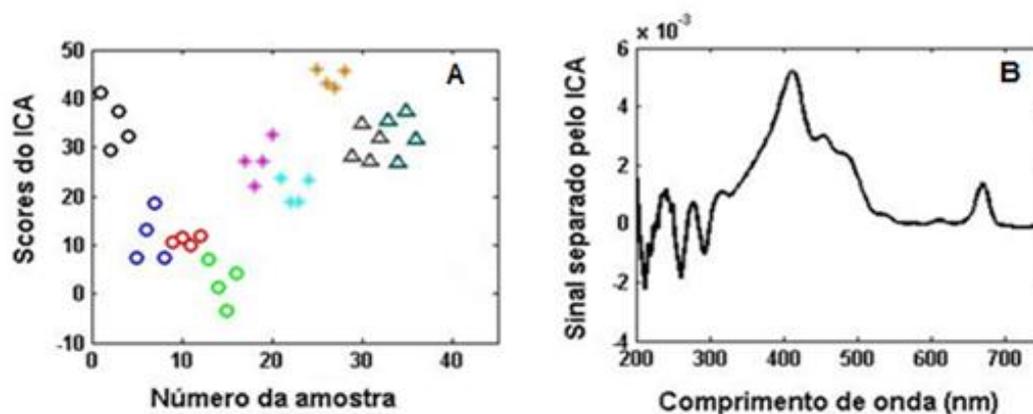


Figura 17 - (A) Scores. (B) Sinais IC4. ○ Andaluzia-Espanha; ● Catalunha-Espanha; ● Languedoc-França; ● Marseille-França; * Puglia-Itália; * Sicilia-Itália; * Toscana-Itália; △ Creta-Grécia; △ Creta-Grécia.

4.3 CONCLUSÃO

A espectroscopia UV-Vis aliada ao método quimiométrico de resolução ICA mostrou-se uma ferramenta na extração de informações relevantes que podem contribuir para a autenticação geográfica de azeites de oliva da região do Mediterrâneo. A metodologia proposta permite uma análise rápida e não destrutiva do azeite, sem a necessidade de preparo da amostra.

Apesar da espectroscopia na região do UV-Vis não ser uma técnica seletiva, quando aliado ao ICA que promove a separação dos sinais que são os mais estatisticamente independentes possíveis, permitem a distinção das amostras de azeite em relação ao conteúdo de seus constituintes químicos.

4.5 REFERÊNCIAS

BAETEN, V.; MEURENS, M. Detection of Virgin Olive Oil Adulteration by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2225-2230, 1996.

BENDINI, A.; CERRETANI, L.; VIRGILIO, F. di.; BELLONI, P.; BONOLI-CARBOGNIN, M.; LERCKER, G. Preliminary evaluation of the application of the ftr spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. **Journal of Food Quality**, v. 30, p. 424-437, 2007.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1991. Regulation (EEC) 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. **Official Journal of the European Communities** L248, 1-83.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1992. E.C. Off, J. Eur. Communities, February 5, 1992, Regulação 2081/1992..

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2007. Commission regulation (EC) 702/2007 of 21 June 2007 amending commission regulation (EEC) 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. **Official Journal of the European Union** L161, 11-27.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2008. Commission regulation (EC) 640/ 2008 of 4 July 2008 amending commission regulation (EEC) 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. **Official Journal of the European Union** L178, 11-16.

COSIO, M. S.; BALLABIO, D.; BENEDETTI, S.; GIGLIOTTI, C. Geographical origin and authentication of extra virgin olive oils by an electronic nose in combination with artificial neural networks. **Analytica Chimica Acta**, v. 567 p. 202-210, 2006.

DOMENICI, V.; ANCORA, D.; CIFELLI, M.; SERANI, A.; VERACINI, C. A.; ZANDOMENEGHI, M. Extraction of Pigment Information from Near-UV Vis Absorption Spectra of Extra Virgin Olive Oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 62 n. 38, pp 9317-9325, 2014.

FIGUIREDO, S.S.; RODRIGUES, J.; ZAMORA, R. R. M. **Presença de polifenóis nas folhas da espécie vegetal *Thalia geniculata***. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amapá , 2015

GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L.; APARICIO-RUIZ, R.; APARICIO, R. Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. **European Journal Lipid Science Technology**, v, 110, p. 602-607, 2008.

GIUFFRIDA, D.; SALVO, F.; SALVO, A.; PERA, L. L.; DUGO, G. Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. **Food Chemistry**, v. 101, p. 833-837, 2007. 66

- GURDENIZ, G.; OZEN, B. Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. **Food Chemistry**, v.116, p.519–525, 2009.
- GONÇALVES, R. P.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Thermal edible oil evaluation by UV–Vis spectroscopy and chemometrics. **Food Chemistry**, v.163 83–86, 2014.
- KOPLÍK R. Advanced strategies in food analysis [homepage on the Internet]. Czech Republic: Ultraviolet and visible spectrometry; [cited 2015 Nov 21] Available from: http://web.vscht.cz/~poustkaj/EN%20ASFA%20AU%20Koplík%20UV_VIS_spectrometry.pdf
- LAI, Y. W.; KEMSLEY, E. K.; WILSON, R. H. Quantitative analysis of potential adulterants of extra virgin olive oil using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 53, p. 95-98, 1995.
- LERMA-GARCÍA, L. M.; RAMIS-RAMOS, G.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M.; SIMÓ-ALFONSO, E. F. Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 118, p.78–83, 2010.
- LIZHI, H., TOYODA, K., IHARA, I. Discrimination of olive oil adulterated with vegetable oils using dielectric spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 167–171, 2010.
- MARÇO, P. H., POPPI, R. J., SCARMINIO, I. S., & TAULER, R.. Investigation of the Ph effect and UV radiation on kinetic degradation of anthocyanin mixtures extracted from Hibiscus acetosella. **Food Chemistry**, 125, 1020–1027, 2011.
- MARÇO, P.H., VALDERRAMA, P., ALEXANDRINO, G.L., POPPI, R.J., TAULER, R. Multivariate curve resolution with alternating least squares: Description, operation and applications. **Química Nova**, 37(9), p.1525-1532, 2014.
- PEREZ-JIMENEZ, F. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. **European Journal of Clinical Investigation** v.35, p. 421–424, 2005.
- PIZARRO, C.; RODRÍGUEZ-TECEDOR, S.; PÉREZ-DEL-NOTARIO, N.; ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. Classification of Spanish extra virgin olive oils by data fusion of visible spectroscopic fingerprints and chemical descriptors. **Food Chemistry**, n. 138, p. 915–922, 2013.
- PSOMIADOU, E.; TSIMIODOU, M. Stability of Virgin Olive Oil. 1. Autoxidation Studies. **Journal Agricultural Food Chemistry** v. 50, p. 716-721, 2002.
- RAMALHEIRO, J. P. Da. S. C. **Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades**. Dissertação (Mestrado Engenharia Alimentar - Qualidade e Segurança Alimentar), Lisboa, 2009. 67

ROHMAN, A.; CHE MAN. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. **Food Research International**, v. 43, p.886–892, 2010.

RUTLEDGE, D. N. E BOUVERESSE, D. J.-R. Independent component analysis with JADE algorithm. **Trends in Analytical Chemistry**, 50, 22-32, 2013.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36 n.8, pp 1627–1639, 1964.

VALDERRAMA, P.; MARÇO, P.H.; LOCQUET, N.; AMMARI, F.; RUTLEDGE, D.N. A procedure to facilitate the choice of the number of factors in multi-way data analysis applied to the natural samples: Application to monitoring the thermal degradation of oils using front-face fluorescence spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory System**, 166–172, 2011.

VIEIRA, T. M. F. S.; D'ARCE, M. A. B. R. Stability of oils heated by microwave: Uv spectrophotometric evaluation. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 18 n. 4 Campinas out./dez, 1998.

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

YANG, H., & IRUDAYARAJ, J. Comparison of near-infrared, Fourier transform infrared, and fourier transform-Raman methods for determining olive pomace oil adulteration in extra virgin olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 889–895, 2001.

YANG, H., IRUDAYARAJ, J., & PARADKAR, M. M. Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 93, p. 25–32, 2005.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÃO GERAL

A espectroscopia na região do ultravioleta e visível, mesmo se tratando de uma técnica não seletiva, quando associada com o método quimiométrico PLS-DA mostrou ser uma ferramenta capaz de autenticar amostras de óleo de soja transgênica e não transgênica, bem como, azeites de oliva extra virgem de diferentes níveis de acidez.

Essa técnica também apresentou resultados favoráveis na autenticação geográfica de azeites de oliva extra virgem da região do mediterrâneo, porém com a aplicação do método quimiométrico ICA, mostrando ser uma ferramenta na extração de informações relevantes que podem contribuir para a autenticação geográfica.

Nos óleos de soja a capacidade de espectroscopia UV para a autenticação pode ser atribuída ao deslocamento batocrômico, provavelmente devido às diferenças no grupo de cromóforo presente nas amostras transgênicas e não transgênicas.

Para os estudos de autenticação dos azeites de oliva extra virgem com diferentes níveis de acidez, esta capacidade da espectroscopia UV-Vis, foi associada aos pigmentos clorofila e carotenoides. Enquanto que para autenticação geográfica dos azeites de oliva extra virgem do mediterrâneo o ICA foi capaz de promover a separação dos sinais que são o mais estatisticamente independentes possíveis, permitindo assim a distinção das amostras de azeite em relação ao conteúdo de seus constituintes químicos, sendo eles, tocoferol, clorofila, carotenoides e também pode-se verificar a ausência de composto primários de auto oxidação em todas as amostras estudadas.

As metodologias propostas permitem uma análise rápida e não destrutiva das amostras, sem a necessidade de qualquer tipo de preparo de amostra. Mesmo com a falta de seletividade da espectroscopia UV-Vis, quando esta é acoplada com o um método quimiométrico adequado, a técnica torna-se capaz de promover a autenticação de óleos comestíveis.