



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
LABORATÓRIO DE QUIMIOMETRIA DO TRIÂNGULO - LQT

**CONTROLE DE QUALIDADE DE ÓLEOS DE LINHAÇA E
GINKGO BILOBA USANDO ESPECTROMETRIA NO
INFRAVERMELHO MÉDIO E FERRAMENTAS
QUIMIOMÉTRICAS**

TESE DE DOUTORADO
Msc. LETÍCIA MARIA DE SOUZA
ORIENTADOR: Prof. Dr. WALDOMIRO BORGES NETO

UBERLÂNDIA – MG, MARÇO DE 2018

LETÍCIA MARIA DE SOUZA

**CONTROLE DE QUALIDADE DE ÓLEOS DE LINHAÇA E GINKGO BILOBA
USANDO ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E FERRAMENTAS
QUIMIOMÉTRICAS**

Trabalho de Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção de título de Doutorado em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto

UBERLÂNDIA, 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729c
2018

Souza, Letícia Maria de, 1987-
Controle de qualidade de óleos de linhaça e ginkgo biloba usando
espectrometria no infravermelho médio e ferramentas quimiométricas /
Letícia Maria de Souza. - 2018.
95 f. : il.

Orientador: Waldomiro Borges Neto.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Química.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.64>
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Óleo de linhaça - Teses. 3. Ginkgoacea -
Teses. 4. Óleos vegetais - Teses. I. Borges Neto, Waldomiro. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro – CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 76/PPQUI.

DATA: 21/02/2018

DISCENTE: Letícia Maria de Souza

MATRÍCULA: 11413QMI005

TÍTULO DO TRABALHO: Controle de qualidade de óleos de linhaça e Gingko Biloba usando espectrometria no infravermelho médio e ferramentas quimiométricas.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Espectroanalítica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Controle de qualidade de óleos vegetais

Às quatorze horas do dia vinte e um de fevereiro do ano dois mil e dezoito, no(a) Auditório A do Bloco 50 no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Alex Domingues Batista, da(o) do Instituto de Química da UFU, Eduardo de Faria Franca, do Instituto de Química da UFU, Renato Lajarim Carneiro, da Universidade Federal de São Carlos, Marcello Garcia Trevisan, da Universidade Federal de Alfenas e Waldomiro Borges Neto, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPBIC. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Mantido como o original.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 00 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Alex Domingues Batista

Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca

Orientador(a): Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan

**Este trabalho é dedicado à minha família,
fonte de inspiração e força para prosseguir
e concretizar meus projetos.**

AGRADECIMENTOS

- Ao Eterno, Infinito Bendito seja, do qual emana toda Luz e Sabedoria.
- Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Química pela disponibilidade de recursos e espaço físico que me possibilitaram desenvolver este trabalho.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Química e Professores pela contribuição em minha formação acadêmica e ensinamentos relevantes.
- Ao Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto, pela orientação acadêmica, disposição, conselhos, paciência e amizade.
- A minha amada família, meu esposo Cristiano, minha mãe Linamar, meu pai Alcides e minha irmã Rita, pelo amor, compreensão e apoio constantes.
- Aos colegas do Laboratório de Quimiometria do Triângulo: Lucas Gontijo, Eloiza Guimarães, Ademar Domingos Viagem Máquina, José Eduardo Buiatte, Caio César Machado, Edvando Souza Teles, Gustavo Dias Cruz, Lúcia Cecília Nunes e Baltazar Vasco Sítioe pela troca de conhecimentos e pela amizade.
- A CAPES pela concessão da Bolsa de Doutorado, durante a realização deste trabalho.
- Aos funcionários, técnicos e colegas do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pela colaboração.
- Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente em todas as etapas de realização desse trabalho.

*“Tudo o que foi, é e será. O Universo inteiro foi construído
de acordo com o princípio da causa e efeito.
Não há começo nem fim. Há somente causa e efeito.”*
Yehuda Ashlag (Baal HaSulam)

RESUMO

O crescente interesse em terapias à base de óleos vegetais voltados à prevenção e/ou tratamento de diversas patologias tem se tornado notório, procedendo um significativo aumento, nos últimos anos, do quantitativo de estudos científicos voltados a comprovar estes benefícios.

A semente de linhaça é uma oleaginosa rica em α -Tocoferol e ácido α -linolênico, componentes com efeitos anticancerígenos estudados, além de sua aplicação na prevenção de cardiopatias e diabetes. O extrato e óleo extravirgem de Ginkgo biloba por sua vez, tem sido proposto na literatura como um candidato promissor no tratamento de doenças degenerativas do sistema nervoso, com potenciais efeitos benéficos na prevenção de câncer de garganta, de colo de útero, de ovário e controle hormonal feminino. Neste contexto, os óleos extravirgem de Ginkgo biloba e Linhaça se tornaram matérias primas de elevado valor agregado, tornando-os possíveis alvos de adulterações, o que resulta na necessidade de desenvolvimento de ferramentas para controle de qualidade dos mesmos.

Assim, este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes em detectar e classificar adulterações em amostras de óleo extravirgem de Linhaça e Ginkgo biloba e quantificar óleos vegetais de menor custo, como óleo de soja, óleo de girassol, óleo de milho e óleo mineral, usando a técnica de Espectrometria no Infravermelho Médio aliada aos métodos de Calibração Multivariada por Quadrados Mínimos Parciais (PLS) e Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA), aplicando os modelos construídos em amostras comerciais, a fim de propor tais métodos como etapas a serem implementadas em análises de rotina e controle de qualidade e pureza desses óleos extravirgem por órgãos de fiscalização. A validação multivariada foi avaliada de acordo com norma ASTM 1655-05, através do cálculo de NAS e Figuras de Mérito para os modelos PLS obtidos, enquanto que para os PLS-DA foram avaliados os parâmetros da Tabela de Confusão de Bayes. Os modelos construídos foram eficientes em detectar adulterações por óleos vegetais de menor valor nutricional.

Palavras-chaves: Óleo Extravirgem de Linhaça; Óleo Extravirgem de Ginkgo biloba; Óleos Nutracêuticos; Controle de Qualidade; PLS; PLS-DA.

ABSTRACT

The growing interest in plant-based therapies aimed at the prevention and/or treatment of various pathologies has become increasingly noticeable. In recent years, there has been a significant increase in the number of scientific studies aimed at proving these benefits.

Flaxseed is an oil rich in α -Tocopherol and α -linolenic acid, components with anticancer effects studied, in addition to its application in the prevention of heart disease and diabetes. Ginkgo biloba extract and oil, in turn, has been proposed in the literature as a promising candidate in the treatment of degenerative diseases of the nervous system, with potential beneficial effects in the prevention of throat, cervix, ovary and control cancer hormonal activity.

In this context, extra virgin oils from Ginkgo biloba and Linnaeus have become high added value raw materials, making it possible to adulterate targets, which results in the need to develop tools to control their quality.

Thus, the main objective of this work was the development of efficient analytical methodologies to detect and classify adulterations in Flaxseed and Ginkgo biloba extra virgin oil samples and to quantify lower cost vegetable oils such as soybean oil, sunflower oil, corn oil and Mineral oil using the Medium Infrared Spectrometry technique coupled with the Partial Minimum Square Multivariate Calibration (PLS) and Discriminating Partial Minimum Square Analysis (PLS-DA) methods, applying in commercial samples, in order to propose such methodologies as stages a to be implemented in routine analyzes and control of quality and purity of these extra virgin oils by inspection agencies. The multivariate validation was evaluated according to ASTM 1655-05, by calculating NAS and Merit Figures for the PLS models obtained, while for the PLS-DA the parameters of the Bayes Confusion Table were evaluated. The constructed models were efficient in detecting adulterations by vegetable oils of lower nutritional value.

Keywords: Extravirgem Flaxseed Oil; Extravirgem Ginkgo Biloba Oil; Nutraceutical Oils; Quality Control; PLS; PLS-DA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

ASTM - American Society for Testing and Materials;

ATR - Reflectância Total Atenuada;

CCM - Coeficiente de Correlação de Matthew's;

CV - Validação cruzada (*Cross Validation*);

EJCR - Elipse de Confiança (*elliptical joint confidence region*);

EM - Média do erro absoluto;

FN - Falso negativo;

FP - Falso Positivo;

FTMIR - Espectrometria no Infravermelho com transformada de Fourier;

HPLC - CLAE - Técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

LD - Limite de detecção;

LQ - Limite de quantificação;

NIR - Espectroscopia no Infravermelho Próximo;

OEG - Óleo Extravirgem de Ginkgo biloba;

OEL - Óleo Extravirgem de Linhaça;

OG - Óleo refinado de girassol;

OM - Óleo de milho;

OMP - Óleo mineral derivado de Petróleo;

OS - Óleo de Soja refinado;

PLS - Quadrados Mínimos Parciais (*Partial Least Squares*);

RMN - Ressonância Magnética de Alta Resolução;

RMSEC - Erro Quadrático Médio de Calibração (*Root Mean Square Error of Calibration*);

RMSECV - Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Validation*);

RMSEP - Erro Quadrático Médio de Previsão (*Root Mean Square Error of Prediction*);

SEL - Seletividade;

SEN - Sensibilidade;

UV-Vis - Espectroscopia na região do Ultravioleta e Visível;

VB - Validação Cruzada por *Venetian Blinds*;

VIP - Variável Importante na Projeção;

VL - Variável Latente;

VN - Verdadeiros Negativos;

VP - Verdadeiros Positivos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação dos níveis de constituintes nas variedades da Linhaça marrom e dourada	23
Tabela 2 – Levantamento bibliográfico de metodologias para análises de óleos vegetais	29
Tabela 3 – Principais grupos responsáveis pela absorção MIR das amostras de óleos vegetais	34
Tabela 4 – Equações de Figuras de Mérito aplicadas a validação multivariada dos modelos de quantificação PLS	51
Tabela 5 – Amostras e números de variáveis latentes utilizados na construção dos modelos PLS-DA, PLS e PLS2 para OEL.....	55
Tabela 6 – Amostras e números de variáveis latentes utilizados na construção dos modelos PLS-DA, PLS e PLS2 de OEG.....	56
Tabela 7 – Parâmetros de classificação obtidos para modelos PLS-DA de detecção de adulterações em OEL por OS, OG e OM	61
Tabela 8 – Valores de figuras de mérito para os modelos PLS e PLS2 construídos para quantificação de adulterações em OEL por OS e/ou OG e OM	69
Tabela 9 – Comparação entre a eficiência obtida nos modelos PLS de quantificação de adulterações e usando PLS2 para classificação simultânea de OS e/ou OG em amostras de OEL.....	70
Tabela 10 – Previsão de adulterações em amostras comerciais de OEG das marcas A, B e C..	71

Tabela 11 – Parâmetros de classificação obtidos para modelos PLS-DA de detecção de adulterações em OEG por OS, OG, OM e OMP	73
Tabela 12 - Valores de figuras de mérito para os modelos PLS e PLS2 construídos para quantificação de adulterações em OEG por OS e/ou OG, OM e OMP.....	79
Tabela 13 - Comparação entre a eficiência obtida nos modelos PLS de quantificação de adulterações e usando PLS2 para classificação simultânea de OS e/ou OG em amostras de OEG.....	80
Tabela 14 - Previsão de adulterações em amostras comerciais de OEG das marcas D e E.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama, Mapa Mental do trabalho	20
Figura 2 – Linhaça (<i>Linum usitatissimum L.</i>), (a) planta do linho, (b) sementes da variedade dourada e óleo extravirgem extraído destas, (c) sementes da variedade marrom e flores	22
Figura 3 – Ginkgo biloba (<i>Ginkgo biloba L.</i>), a) árvore, b) frutos e semente e c) óleo extraído das sementes (OEG)	25
Figura 4 – Princípios ativos presentes no OEG	27
Figura 5 – (a) Reflectância de radiação no interior do cristal de ZnSe; (b) Acessório de Reflectância Total Atenuada de ZnSe acoplado ao suporte FT-IR SpectrumTwo (Perkin Elmer).....	32
Figura 6 – Regiões de absorbância de grupos funcionais no MIR para amostras de OEL	33
Figura 7 – Representação da construção da matriz X para modelagem multivariada	36
Figura 8 – Representação esquemática da decomposição em variáveis latentes da matriz X para o modelo PLS	39
Figura 9 –Representação da matriz de dados X e o vetor de classes y usados no PLS-DA... .	42
Figura 10 – Perfis espectrais MIR dos óleos OEL, OS, OG, OM e OMP	59

Figura 11 – Classes do PLS-DA para (a) OEL puro (◊ amostras de calibração e ◊ amostras de teste), (b) OEL adulterado com OS (■ amostras de calibração e □ amostras de teste) (c) OM (■ amostras de calibração e ■ amostras de teste) e (d) OG (● amostras de calibração e ○ amostras de teste) 60

Figura 12 – Leverage x Qresidual (a) Óleo de Linhaça com óleo de soja (b) Óleo de Linhaça com óleo de girassol (c) Óleo de Linhaça com óleo de milho (d) Óleo de Linhaça com óleo mineral 64

Figura 13 – Ajuste (R) dos modelos PLS (a) Óleo de Linhaça com óleo de soja (b) Óleo de Linhaça com óleo de girassol (c) Óleo de Linhaça com óleo de milho 66

Figura 14 – Análise da aleatoriedade dos erros para amostras dos modelos PLS (a) Óleo de Linhaça com óleo de soja (b) Óleo de Linhaça com óleo de girassol (c) Óleo de Linhaça com óleo de milho 67

Figura 15 - Elipse de confiança para os modelos PLS (a) Óleo de Linhaça com óleo de soja (b) Óleo de Linhaça com óleo de girassol (c) Óleo de Linhaça com óleo de milho 68

Figura 16 – Classes do PLS-DA para (a) OEL puro (◊ amostras de calibração e ◊ amostras de teste), (b) OEL adulterado com OS (■ amostras de calibração e □ amostras de teste) (c) OM (■ amostras de calibração e ■ amostras de teste), (d) OG (● amostras de calibração e ○ amostras de teste) e (d) OMP (■ amostras de calibração e ○ amostras de teste) 72

Figura 17 – Leverage x Qresidual (a) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de soja (b) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de girassol (c) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de milho (d) Óleo de Ginkgo biloba com óleo mineral 75

Figura 18 – Ajuste (R) dos modelos PLS (a) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de soja (b) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de girassol (c) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de milho (d) Óleo de Ginkgo biloba com óleo mineral 76

Figura 19 – Análise da aleatoriedade dos erros para amostras dos modelos PLS (a) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de soja (b) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de girassol (c) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de milho e (d) Óleo de Ginkgo biloba com óleo mineral 77

Figura 20 – Elipse de confiança para os modelos PLS OEG (a) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de soja (b) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de girassol (c) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de milho (d) Óleo de Ginkgo biloba com óleo mineral..... 78

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 1 – Revisão de Literatura	21
1.1. Óleo de Linhaça.....	22
1.2. Óleo de Ginkgo Biloba.....	24
1.3. Controle de Qualidade de óleos vegetais	28
1.4. Princípios da Espectrometria no Infravermelho	31
1.5. Aplicações da Espectrometria no Infravermelho	35
1.6. Quimiometria e Calibração Multivariada.....	35
1.7. Quadrados Mínimos Parciais (PLS).....	38
1.8. Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA)	42
1.9. Validação Multivariada de metodologia de classificação.....	45
1.10. Figuras de Mérito.....	48
CAPÍTULO 2 – Método de Controle de Qualidade Óleos Extravirgem	53
2.1. Objetivo	54
2.2. Procedimento Experimental	54
2.3. Modelos PLS-DA de Detecção de Adulterações por Óleos Refinados em Óleo de Linhaça Extravirgem	59
2.4. Modelos PLS de Quantificação de Adulterações por Óleos Refinados em Óleo de Linhaça Extravirgem	63
2.5. Modelos PLS-DA de Detecção de Adulterações por Óleos Refinados em Óleo de Gingko Biloba Extravirgem	72
2.6. Modelos PLS de Quantificação de Adulterações por Óleos Refinados em Óleo de Gingko Biloba Extravirgem	74
CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A inclusão de certos alimentos à dieta humana com a finalidade de prevenção e redução do risco de doenças é uma prática datada de milhares de anos. Os avanços no cuidado à saúde testemunhados nas últimas décadas resultaram em um significativo aumento na expectativa de vida média da população mundial, em concordância com o crescente interesse por estudos e pesquisas da correlação entre certos alimentos e o cuidado e/ou tratamento de doenças (Monteiro e Marin, 2015). Neste contexto, os óleos extravirgem têm sido amplamente utilizados como nutracêuticos, que por definição trata-se um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, prevenção e/ou tratamento de doenças (Kaluza *et al.*, 2009).

A linhaça (*Linus usitatissimum L.*) da família Linaceae, uma oleaginosa cultivada ao longo de séculos, produz sementes de estruturas chatas, pontiagudas ovaladas, de cor marrom ou dourada, da qual pode se extraír óleo (Nogueira *et al.*, 2010). É uma das plantas utilizadas na alimentação humana mais antigas da história, cujos primeiros relatos são datados de 5000 a.c. na Mesopotâmia, onde era empregada para consumo e utilizada para tratar ferimentos (Shealy, 2003). Originária da Ásia e atualmente cultivada na Argentina, nos Estados Unidos, na Rússia e na Ucrânia, sendo o Canadá o principal produtor (Nogueira *et al.*, 2010). A produção mundial de Linhaça é de aproximadamente $2,4 \times 10^6$ toneladas anuais. No Brasil o grão é cultivado, em sua grande maioria, no estado do Rio Grande do Sul. A utilização do óleo extravirgem das sementes de Linhaça como um ingrediente alimentar funcional é crescente, uma vez que é rico em ácido α -linolênico, tocoferol e proteínas (Figueiredo *et al.*, 2017).

Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba L.*), da família Ginkgoaceae, também conhecida como “nogueira do Japão”, é uma árvore frutífera de origem asiática datada do período Mesozoico, pois já existia há mais de 150 milhões de anos. O óleo de ginkgo biloba possui

elevado valor nutracêutico e comercial devido as suas propriedades antioxidantes e possíveis efeitos protetores contra a aterosclerose. Há evidências na literatura que apoiam um papel preventivo de Ginkgo biloba contra doenças degenerativas do cérebro, como Alzheimer, diversos tipos de câncer e disfunções hormonais. Possui efeito de prevenção à cardiopatias, alívio do estresse e efeitos de aumento da memória e possíveis efeitos sobre distúrbios psiquiátricos (Mahadevan e Park, 2008).

A expansão do proeminente mercado do segmento de alimentos nutracêuticos e o aumento do valor agregado destes produtos são concomitantes com o surgimento de práticas de adulteração, com a finalidade de obtenção de lucros indevidos, pela adição de componentes de menor valor comercial e nutritivo. No entanto, o desenvolvimento do setor de alimentos nutracêuticos é dependente da capacidade das indústrias de integrarem a credibilidade e processos de controle de qualidade eficientes, aliados a uma comunicação correta e eficiente aos consumidores (Moraes e Colla, 2006).

O óleo Extravirgem de linhaça (OEL) e óleo extravirgem de ginkgo biloba (OEG) são alimentos nutracêuticos de notória importância comercial, não obstante, ao comparar diferentes óleos vegetais, extravirgem ou não, observa-se uma grande semelhança nas características físico-químicas e nas suas composições químicas, sendo compostos, em sua grande maioria, por uma mistura de diferentes proporções ácidos graxos, fato que pode mudar a especificidade de cada óleo. Portanto, a percepção de adulterações em OEL e OEG, causadas pela adição de óleos vegetais de menor valor nutricional e comercial é, em muitos casos, difícil de realizar (Gurdeniz e Ozen, 2009; Do *et al.*, 2015). Portanto, é necessária a criação de métodos eficientes e viáveis para controle de qualidade de OEL e OEG, no sentido de detectar adulterações pela adição de outros óleos (Quiñones-Islas *et al.*, 2013; Elzey *et al.*, 2016).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo a aplicação de métodos de

calibração multivariada para classificar e quantificar adulterações em Óleo Extravirgem de Linhaça e Óleo Extravirgem de Ginkgo biloba por Óleo de Soja (OS), Óleo de Girassol (OG), Óleo de Milho (OM) e Óleo mineral derivado de Petróleo (OMP) através do uso de Espectrometria no Infravermelho Médio com transformada de Fourier e ferramentas quimiométricas. A eficiência dos modelos obtidos foi avaliada pelos valores de erros, visando uma melhor relação entre as medidas espectroscópicas e a proporção de adulteração nas amostras.

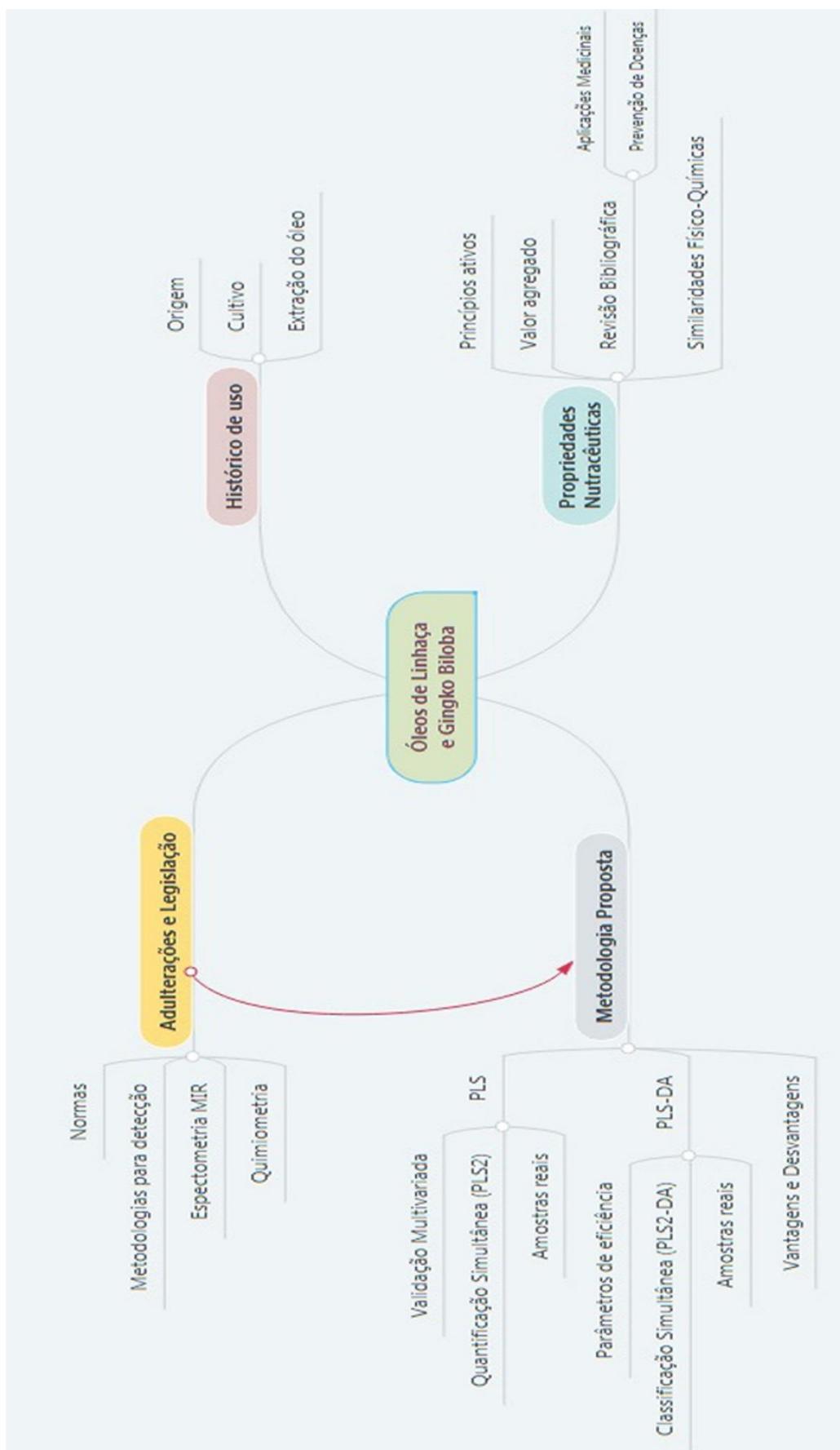
A presente Tese foi dividida em dois capítulos, além de Conclusões e Referências bibliográficas, conforme esquematizado no Mapa Mental (Figura 1). O primeiro capítulo, intitulado **Revisão de Bibliografia**, apresenta as principais características dos óleos extravirgem, foco deste estudo, abordando um breve panorama histórico de seus usos como nutracêuticos, sua importância no cenário brasileiro e mundial, suas aplicações no âmbito de prevenção e tratamento de doenças e normas que regem os parâmetros de qualidade, traz uma abordagem teórica concisa a respeito da técnica de absorção de radiação na região do infravermelho e um levantamento bibliográfico do uso da técnica, em especial no controle de qualidade de alimentos. Por fim, trata de forma concisa os métodos quimiométricos utilizados para a construção de modelos de Calibração Multivariada, por Quadrados Mínimos Parciais (PLS) e de Classificação usando Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA), assim como cálculo do NAS e as figuras de mérito para validação dos modelos.

A adulteração dos OEL e OEG é discutida no capítulo 2: **Método de Controle de Qualidade de Óleos Extravirgem**, através da construção de modelos PLS e PLS-DA para classificar e quantificar individual e simultaneamente adulterações por adição de óleos (OS, OG, OM e OMP). Neste capítulo são avaliados os valores de erros obtidos e realizada a validação multivariada dos modelos construídos, através do cálculo de NAS

e figuras de mérito. Os modelos construídos são então aplicados a amostras comerciais reais de OEL e OEG, são discutidos os resultados que revelam indícios de possíveis adulterações por óleos vegetais e/ou óleo mineral.

Esta tese encerra-se com as **Conclusões** do trabalho, demonstrando a eficiência e vantagens da aplicação das metodologias FTMIR-PLS e FTMIR-PLS-DA propostas, através da aplicação das mesmas a amostras reais de OEL e OEG. Por fim, segue uma lista de **Referências Bibliográficas** em que são apresentados os trabalhos que contribuíram para a elaboração desta Tese.

Figura 1 – Diagrama, Mapa Mental do trabalho.



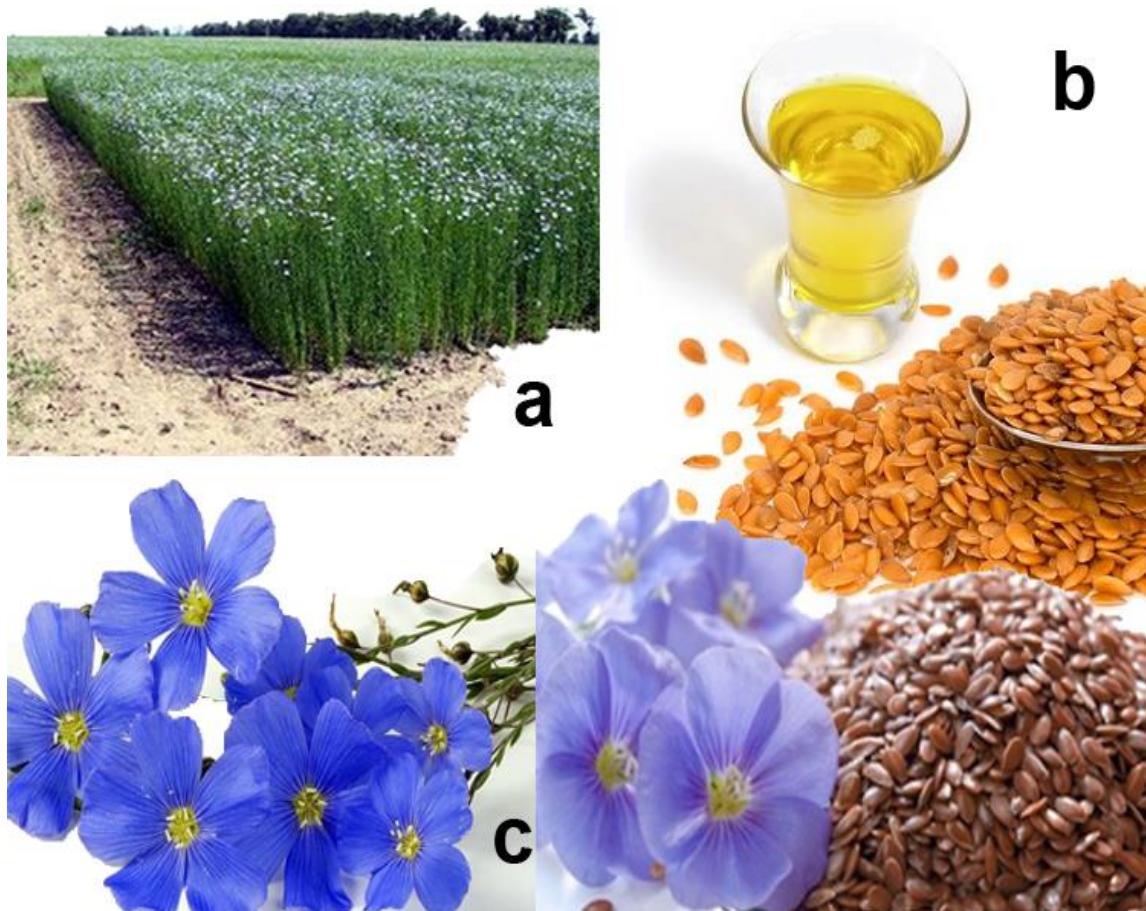
Fonte: O autor.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Óleo de Linhaça

Linho, de nome científico *Linum usitatissimum* L. da família das Linaceae, é uma herbácea que pode atingir até um metro de altura e produz flores de cor azulada (Figura 2(a)). A planta do linho é formada por uma estrutura fibrosa, a partir da qual são fabricadas fibras longas para a base de muitos tecidos. Trata-se de uma das plantas cultivadas mais antigas da história, cujos primeiros relatos de uso das sementes para fins nutracêuticos são datados de 5000 anos antes de Cristo, na Mesopotâmia, onde a planta era utilizada para tratar ferimentos.

Figura 2 – Linhaça (*Linum usitatissimum* L.), (a) planta do linho, (b) sementes da variedade dourada e óleo extravirgem extraído destas, (c) sementes da variedade marrom e flores.



Fonte: Internet, adaptado pelo autor.

As sementes da planta do linho dá-se o nome de linhaça, um grão oleaginoso, de cor dourada ou marrom, com sementes de aproximadamente 5,0 mm de comprimento e tornam-se pegajosas quando molhadas (Figura 2(b)). As sementes podem ser consumidas in natura ou moídas, também podem ser utilizadas como ingrediente na preparação de produtos de panificação, sobremesas e produtos cárneos (Nogueira *et al.*, 2010). No Brasil o principal destino da Linhaça é na indústria, utilizada como componente de secante de tintas, vernizes, corantes, na produção de sabões, borrachas sintéticas, proteção de madeiras, massa para vidro, cosméticos, entre outros. Também existem estudos para o uso da Linhaça na produção de biodiesel (Dixit *et al.*, 2012).

A coloração da semente é determinada pela quantidade de pigmentos no revestimento da semente, essa quantidade varia de acordo com fatores genéticos e com as condições climáticas na região de cultivo (Molena-Fernandes *et al.*, 2010). A Linhaça dourada é cultivada em regiões frias, como a Europa, no Brasil é cultivada de forma orgânica. Já a Linhaça marrom é a mais frequentemente cultivada, em regiões de clima úmido e quente. A semente de linhaça nas variedades dourada e marrom não diferem muito na sua composição química (Oomah e Mazza, 1993), conforme exposto na Tabela 1.

Tabela 1 - Comparaçāo dos constituintes nas variedades da Linhaça marrom e dourada.

Componentes (g/100g)	Linhaça marrom	Linhaça dourada
Proteína (g/100g)	19,1	21,6
Lipídios totais (g/100g)	33,7	34,8
Fibras (g/100g)	28,0	22,5
Valor energético total (Kcal/100g)	417	441
Ácido α-linolênico (Ômega3)	58,4	58,3
Ácido linoleico (Ômega6)	13,3	13,4
Vitamina E (αTocoferol)	7,5	7,4

Fonte: (Núcleo De Estudos E Pesquisas Em Alimentação, 2011)

O óleo extravirgem extraído da Linhaça (OEL) (Shealy, 2003) é rico em componentes que apresentam ações nutracêuticas e farmacológicas importantes (Anvisa, 1999), como Ômega 3 (Ácido α -linolênico), Ômega 6 (Ácido linoleico), vitamina E (α -Tocoferol), minerais como potássio, fósforo, magnésio, cálcio, enxofre, além de fibras solúveis e lignana, principalmente Secoisolariciresinol Diglicosídeo (SDG) (Hu *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2017; Johnsson, 2009), os quais vêm sendo avaliados em pesquisas clínicas e estudos relacionados a prevenção e tratamento de diversos tipos de cânceres, como câncer de mama (Dabrosin *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 2010), de ovários (Eilati *et al.*, 2013), próstata (Kaluza *et al.*, 2009) e outros (Dabrosin *et al.*, 2002). O OEL também é amplamente associado a diminuição do mau colesterol HDL (*high density lipoprotein*), prevenindo doenças cardiovasculares (Leyva *et al.*, 2011), a manutenção do peso corporal (Pilar *et al.*, 2014) e prevenção a obesidade (Johnsson, 2009), assim como prevenção e tratamento de diabetes (Jangale *et al.*, 2013).

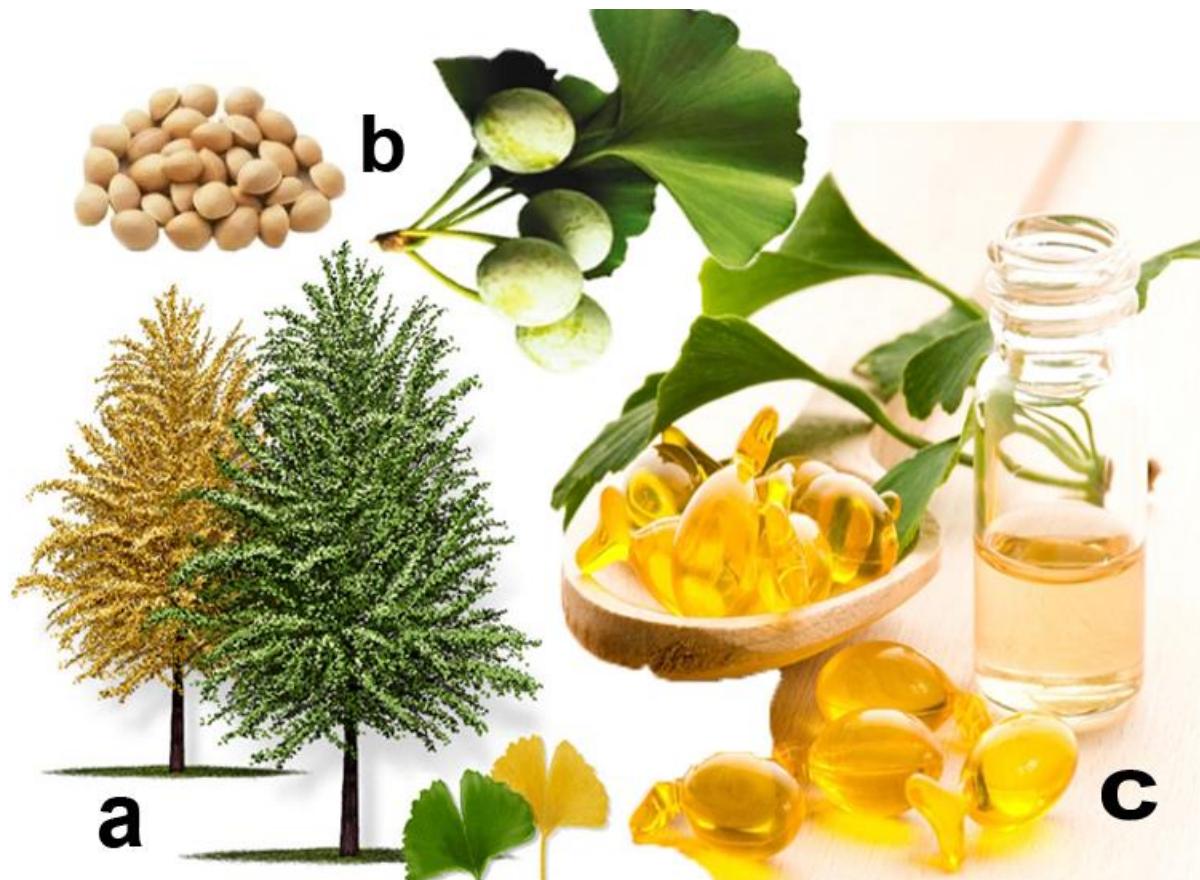
As propriedades nutracêuticas do OEL citadas na literatura são diversas, como no controle hormonal feminino, prevenção de diversos casos de neoplasia maligna e na prevenção do aparecimento de metástases, sendo constantemente recomendado na prevenção e/ou tratamento de diversos males e manutenção da saúde humana. Tal aplicabilidade resulta em seu elevado valor comercial agregado sendo comercializado no Brasil com valores da ordem de R\$150,00 a R\$350,00 o litro, dependendo da região e marca, no entanto tais efeitos são dependentes de um elevado grau de pureza deste óleo.

1.2. Óleo de Ginkgo Biloba

Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba L.*) é uma árvore Ginkgophyta (Figura 3a), nativa da região da China, Coreia e Japão, trata-se de uma das espécies vegetais mais antigas do mundo, com folhas de formato bilobado que caem durante o inverno, possui um ciclo de vida de mais de 1.000 anos e pode chegar a 30 metros de altura (Nakanishi, 2005). Possui em seu fruto seco

sementes (Figura 3b), das quais é possível extrair óleo (OEG), conforme apresentado na Figura 3c.

Figura 3 – Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba L.*), **a**) arvore, **b**) frutos e semente e **c**) óleo extraído das sementes (OEG).



Fonte: Internet, adaptado pelo autor.

Preparações medicamentosas derivadas desta planta estão entre os fitoterápicos mais antigos, com prescrição de chás das folhas da árvore para fins medicinais que datam de 1436 d.C., durante a dinastia Ming, sendo utilizadas para uma série de doenças (Mahadevan e Park, 2008).

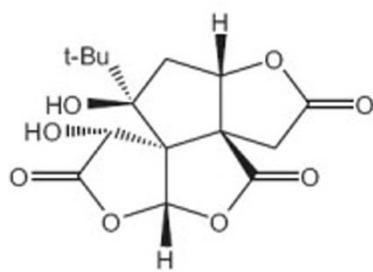
É crescente na literatura o montante de trabalhos que evidenciam os benefícios nutracêuticos da ginkgo biloba no tratamento e prevenção de problemas de concentração e

memória (Filho *et al.*, 2010), tonteiras (Mahadevan e Park, 2008), zumbidos (Oskouei *et al.*, 2013), cefaleias (Al-Yahya *et al.*, 2006), Alzheimer (Maurer *et al.*, 1998; Canevelli *et al.*, 2014; Sezgin e Dincer, 2014), angiopatias, cardiopatias e diabetes (Fitzl *et al.*, 1999; Ismail e El-Sonbaty, 2016), assim como distúrbios cognitivos e/ou demência (Yuan *et al.*, 2017).

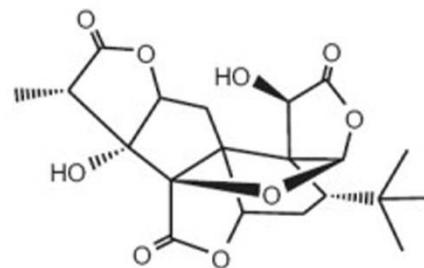
A ação dos diferentes princípios ativos presentes no OEG, como os glicosídeos de Ginkgoflavonas e terpenóides (Nakanishi, 2005), bilobalídeos e os Ginkgolídeos A, B, C, J e M (Figura 4), promovem a vasodilatação e redução da viscosidade do sangue, além de reduzir a densidade de radicais livres de oxigênio nos tecidos nervosos (Diamond e Bailey, 2013). Há evidências que o Ginkgolídeo B pode estar relacionado à prevenção da rejeição de transplantes de órgãos e age também contra choques asmáticos e intoxicações (Mahadevan e Park, 2008).

Outros constituintes químicos relevantes da Ginkgo biloba podem ser citados: ácido butanoico, ácido ginkgolico, ácidos graxos, alcanos, antocianina, asoginkgetina, benzenoides, bioflavonoides, caferol, carboidratos, carotenoides, catequina, ésteres de ácido cumárico, esteróis, fenilpropanoides, ginol, glicosídeos flavonoides (principalmente Ginkobilina, queracetina e isoamnetina), kaempferol, lactona bilobalida, lipídeos, minerais, queracetina, sitosterol e triterpenos (Mahadevan e Park, 2008; Diamond e Bailey, 2013).

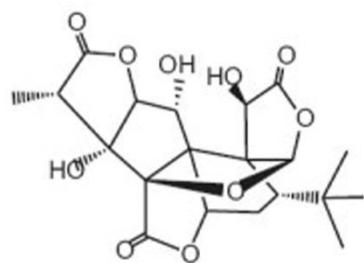
Figura 4 – Princípios ativos presentes no OEG.



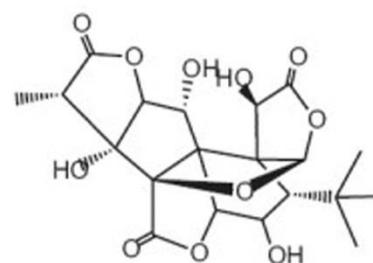
bilobalídeo



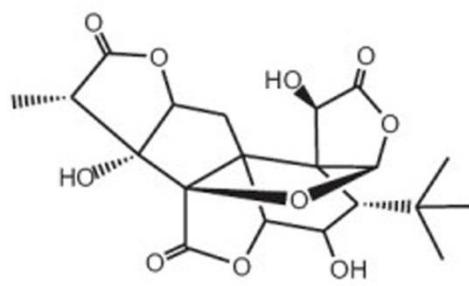
Ginkgolídeo A



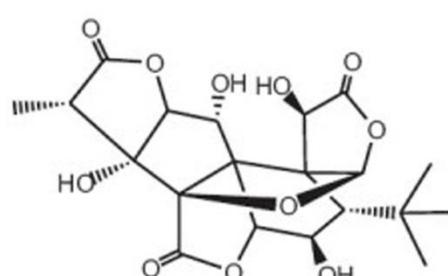
Ginkgolídeo B



Ginkgolídeo C



Ginkgolídeo J



Ginkgolídeo M

Fonte: (Miao *et al.*, 2012).

O extrato de folha de ginkgo biloba e o óleo extraído de suas sementes são regulados como alimentos, suplementos alimentares ou suplementos dietéticos em diversos países, sendo comercializados em múltiplas formas: como cápsulas, drágeas, sachês, suplemento em pó, etc. (Chandra *et al.*, 2011). Portanto, observa-se que o mercado de tais nutracêuticos é proeminente, e a padronização e controle de qualidade do OEG e extratos vegetais comercializados é de fundamental importância para assegurar seus efeitos benéficos ao consumidor (Chandra *et al.*, 2011; Booker *et al.*, 2016; Lopez-Gutierrez *et al.*, 2016).

1.3. Controle de Qualidade de óleos vegetais

Vários países contam com legislações específicas para comercialização e controle de qualidade de óleos nutracêuticos (Moraes e Colla, 2006). No Brasil, a fabricação, manipulação e comercialização de tais produtos deve seguir a legislação do Ministério da Saúde (M.S.) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que regulamenta os alimentos funcionais e/ou nutracêuticos, através das seguintes resoluções: ANVISA/MS 16/99; ANVISA/MS 17/99; ANVISA/MS 18/99; ANVISA/MS 19/99, que estabelece normas e procedimentos para registro de alimentos e/ou ingredientes funcionais (Anvisa, 1999). Para obter o registro de um alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de promoção da saúde, deve ser formulado um relatório técnico científico minucioso, elencando e comprovando os benefícios e a segurança do uso deste alimento (M.S. e Anvisa, 2002; Anvisa, 1999).

A detecção de adulteração em óleos vegetais atualmente é de competência de diversos órgãos reguladores, como os internacionais: Administração de Drogas e Alimentos, do inglês “Food and Drug Administration” (FDA), Organização das Nações Unidas para Agricultura “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (FAO), Organização Mundial da Saúde “World Health Organization” (WHO), além dos nacionais, Ministério da Saúde (M.S.)

e ANVISA (Gromadzka e Wardencki, 2011).

Os óleos adulterantes, comumente empregados na fraude de óleos extravirgem e/ou nutracêuticos possuem menor valor comercial e qualidade nutricional, resultando em concorrência desleal entre o valor final atingido do produto na cadeia produtiva dos óleos puros em relação à redução de custos conseguida através de processos de falsificação (Do *et al.*, 2015). Para o controle de qualidade de pureza de óleos vegetais, a ANVISA estabeleceu a RDC nº 270, que recomenda análises a serem realizadas por Cromatografia em Fase Gasosa com Detector de Ionização em Chama (CG-FID) e outros parâmetros físico-químicos para a quantificação dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais (Cserhati *et al.*, 2005; Gromadzka e Wardencki, 2011). A detecção de substâncias adulterantes pode ser um processo árduo, principalmente quando há muita semelhança entre estas e óleos extravirgem, exigindo o emprego de uma série de procedimentos para conseguir seletividade e sensibilidade adequadas para avaliar qualidade e pureza. No entanto, a literatura traz algumas metodologias alternativas à Cromatografia, conforme elencado na Tabela 2.

Tabela 2 – Levantamento bibliográfico de para análises de óleos vegetais.

Técnicas	Referências
UV-Vis	GONÇALVES; MARÇO; VALDERRAMA, 2014; LANKMAYR <i>et al.</i> , 2004
MIR	BALABIN; SMIRNOV, 2011; CASALE <i>et al.</i> , 2012; DE LA MATA <i>et al.</i> , 2012
NIR	DUPUY <i>et al.</i> , 2010; SINELLI <i>et al.</i> , 2010.
Raman	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2013
Eletroquímicos	APETREI, 2012
HPLC - CLAE	MORALES <i>et al.</i> , 2014
RMN	GUILLÉN <i>et al.</i> , 2001

Fonte: (Santana, 2015)

A técnica de Espectroscopia na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis) aliada a

ferramentas quimiométricas foi utilizada por Lankmayr et al. (2004) para classificação de óleos vegetais. A mesma técnica foi aplicada por Gonçalves et al. (2014) para estudar a estabilidade térmica de óleos comestíveis, determinando a temperatura de degradação de cada um destes.

A combinação de MIR e ferramentas quimiométricas foi utilizada por Balabin e Smirnov (2011) para o controle de qualidade de leite e seus derivados e por Casale et al. (2012) e De La Mata et al. (2012) para caracterização de azeite de oliva, enquanto Dupuy et al. (2010) e Sinelli et al. (2010) trazem uma comparação desta técnica ao uso de Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR). Apetrei et al. (2012) e Tormin et al. (2012) por sua vez, propõe a utilização de métodos eletroquímicos para avaliação do azeite de oliva.

Guillen et al. (2001) utiliza Ressonância magnética de alto campo (RMN), enquanto Morales et al. (2014) sugere a aplicação da Técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para avaliação de qualidade de óleos vegetais. Almeida et al. (2013) propõe o uso de Espectroscopia Raman e PLS-DA para classificação de óleo de rosa mosqueta .

Não obstante, é latente a necessidade métodos viáveis, precisas, robustas, de respostas rápidas, que apresentem baixos custos operacionais, com reduzida ou preferencialmente com ausência da geração de resíduos e possível portabilidade que permita análise “*in situ*” e observa-se na literatura diversos esforços despendidos no sentido do desenvolvimento das mesmas.

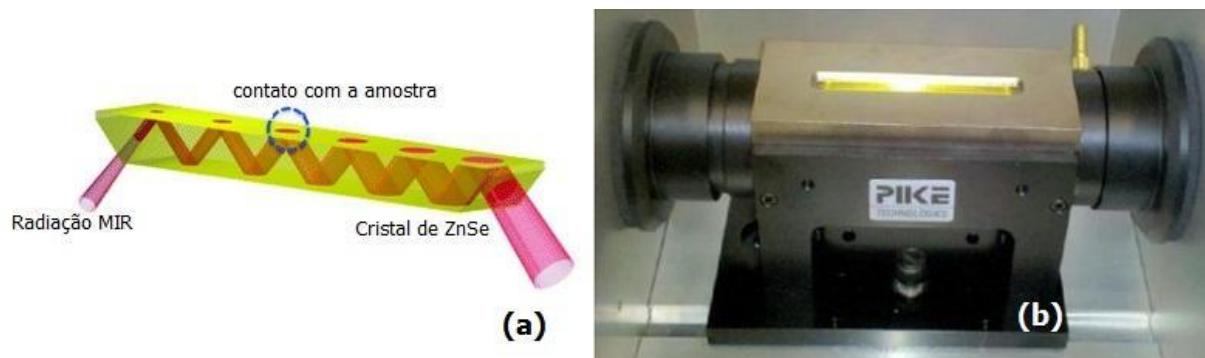
A Espectrometria no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido usada como técnica analítica para fornecer resultados rápidos e satisfatórios e requer apenas uma pequena quantidade de amostra e nenhuma preparação prévia, principalmente na amostragem por Reflectância Total Atenuada (Yang et al., 2005; Almeida et al., 2013). Vários estudos mostram a aplicabilidade dessa técnica na detecção de adulteração em alimentos (Nawrocka e Lamorsk, 2013; Quiñones-Islas et al., 2013).

1.4. Princípios da Espectrometria no Infravermelho

Na região do infravermelho médio (MIR) existe uma faixa espectral de 1200 a 700 cm⁻¹ conhecida como região de impressão digital ou “fingerprint”(Müller *et al.*, 2011; Rohman e Che Man, 2011; De Vasconcelos *et al.*, 2012), visto que pequenas diferenças na estrutura e na constituição de uma molécula resultam em mudanças significativas nas intensidades ou perfis das bandas de absorção, sendo assim bastante úteis como parâmetro de identificação ou distinção entre compostos (Santana, 2015).

A técnica de reflectância total atenuada, “*Attenuated Total Reflectance*” (ATR), apresentado na Figura 5a, consiste no princípio de que uma onda evanescente pode ser parcialmente absorvida, colocando-se uma amostra em contato com meio mais denso (prisma ou elemento de reflexão interna). Se o meio menos denso absorve essa onda evanescente, ocorre atenuação do feixe nos comprimentos de onda das bandas de absorção. Cristal de seleneto de zinco (ZnSe) é um dos materiais utilizados para reflectância total atenuada, pois é insolúvel em água, resistente a choques térmicos e pode ser aplicado a soluções ácidas, básicas e a solventes orgânicos (Figura 5b). Desta forma, os espectros de absorção são obtidos de forma rápida para amostras sólidas ou líquidas sem se fazer necessária qualquer preparação prévia das amostras, sendo aplicável tanto para análises qualitativas quanto quantitativas (Müller *et al.*, 2011).

Figura 5 - (a) Reflectância de radiação no interior do cristal de ZnSe; (b) Acessório de Reflectância Total Atenuada de ZnSe acoplado ao suporte FT-IR SpectrumTwo (Perkin Elmer).

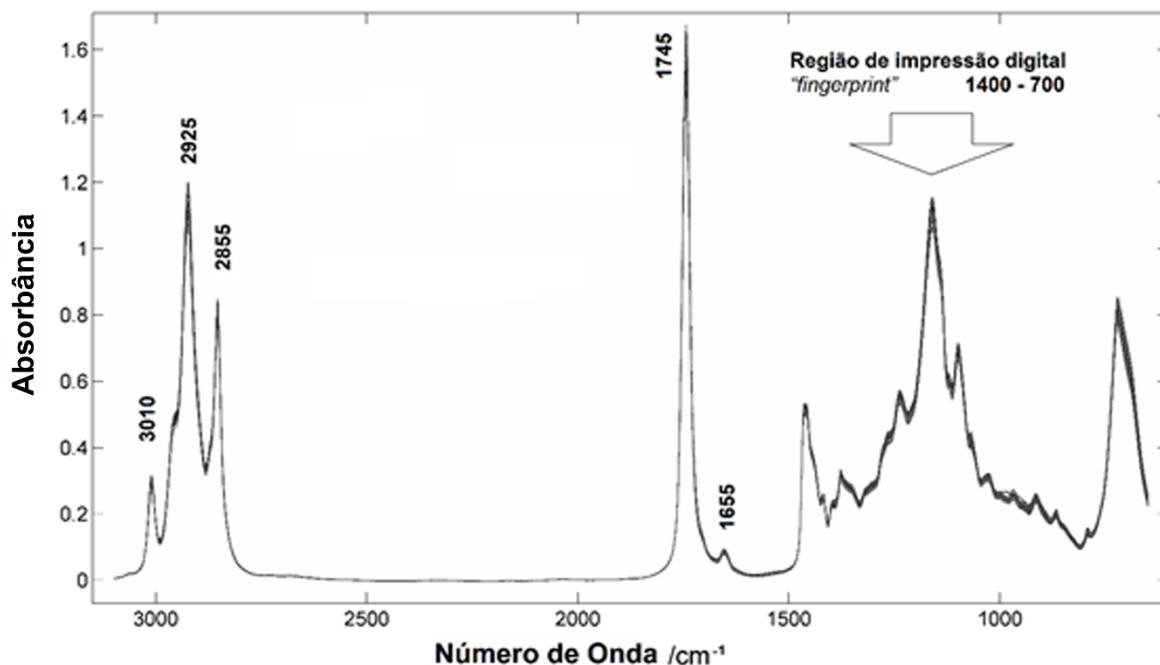


Fonte:(Souza, 2014)

A intensidade de uma banda de absorção no infravermelho é proporcional à concentração do componente responsável por esta banda, desta forma, a concentração de uma espécie presente em uma amostra pode ser determinada através de uma curva de calibração (intensidade da absorção versus concentração) construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do composto em questão. No entanto, quanto mais complexa é a amostra, ou seja, quanto maior o número de interferentes presentes na mistura, mais difícil se torna a quantificação da espécie de interesse, fazendo-se necessário o uso de cálculos estatísticos mais robustos, como calibração multivariada (Yang *et al.*, 2005; Quiñones-Islas *et al.*, 2013; Souza, 2014; Elzey *et al.*, 2016).

Os diversos óleos vegetais normalmente apresentam um espectro de absorção no MIR com bandas bastante semelhantes, alto nível de sobreposição, com pouquíssimas regiões de diferenciação, incluindo a região de impressão digital, conforme mostrado na Figura 6.

Figura 6- Regiões de absorbância de grupos funcionais no MIR para amostras de OEL.



Fonte: O autor.

As bandas observadas nos espectros MIR das amostras de OEL (Tabela 3) podem ser atribuídas às seguintes vibrações (Elzey *et al.*, 2016): a banda a 3010 cm^{-1} é devido ao estiramento $=\text{C}-\text{H}$ de duplas ligações cis, onde as faixas centradas a 2925 e 2855 cm^{-1} são devidas às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, dos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ terminais; a banda proeminente em 1745 cm^{-1} atribuída ao estiramento simétrico da vibração de $-\text{C}=\text{O}$ dos grupos carbonila dos triglicerídeos; a banda próxima a 1655 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento do grupo $-\text{C}=\text{C}-$ de cis-olefinas. Na região de impressão digital, as bandas na região $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas principalmente a deformação angular de grupos alifáticos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ tais como as de $-\text{CH}_2$ a 1375 cm^{-1} ; as bandas na região $1160-1100\text{ cm}^{-1}$ correspondem à vibração de estiramento de grupos éster de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. Finalmente, a vibração observada em 725 cm^{-1} é devido à sobreposição das vibrações de deformação angular cis do grupamento $-\text{C}=\text{C}-$.

Tabela 3 – Principais grupos responsáveis pela absorção MIR das amostras de óleos vegetais.

Número de onda (cm⁻¹)	Atribuição
3.010 – 3.000	Estiramento de C=CH (<i>cis</i>)
2.960 a 2.855	Estiramento simétrico e assimétrico C–H de –CH ₃
1.750 - 1.730	Estiramento de carbonila de éster, C=O
1.675 – 1.645	Estiramento C=C
1.470 - 1.430	Deformação angular de -(CH ₂) _n -
1.390 – 1.370	Deformação angular de CH ₃
1.200 - 730	Impressão Digital (Estiramento e deformação angular de CC, CO e deformação angular CH)
965	Estiramento de CH=CH (<i>trans</i>)
710-730	Deformação angular fora do plano –CH=CH

Fonte: adaptado de ROHMAN; CHE MAN (2011, p. 584).

Por se tratarem de dados multivariados, é imprescindível a utilização de Métodos Quimiométricos na obtenção de informações qualitativas e quantitativas a partir de espectros vibracionais no infravermelho (BORGES NETO, 2005).

1.5. Aplicações da Espectrometria no Infravermelho

A técnica de Espectrometria na Região do Infravermelho Médio (MIR) vem sendo amplamente utilizada como uma alternativa rápida e eficiente em análises de adulteração em produtos de diversos segmentos, como fármacos (MÜLLER et al., 2011; SILVA et al., 2012), alimentícios (KARTHEEK et al., 2011) aplicada a óleos vegetais comestíveis (ALVES JDE et al., 2010; PEREIRA et al., 2008; QUIÑONES-ISLAS et al., 2013; ROHMAN; CHE MAN, 2011), frutas e vegetais (NICOLAI et al., 2007), para controle de qualidade de leite e derivados (IÑÓN; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2004; SANTOS; PEREIRA-FILHO; RODRIGUEZ-SAONA, 2013; SOUZA et al., 2011), dentre outros. Na área de controle de qualidade de óleos (Armenta *et al.*, 2007; Do *et al.*, 2015), diversos estudos propõe associação de Espectrometria no IR aliada a ferramentas Quimiométricas para controle de qualidade e quantificação de adulterações (ANDRADE et al., 1997; BALABIN; SMIRNOV, 2011; DE VASCONCELOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2011; ZHANG, 2012).

1.6. Quimiometria e Calibração Multivariada

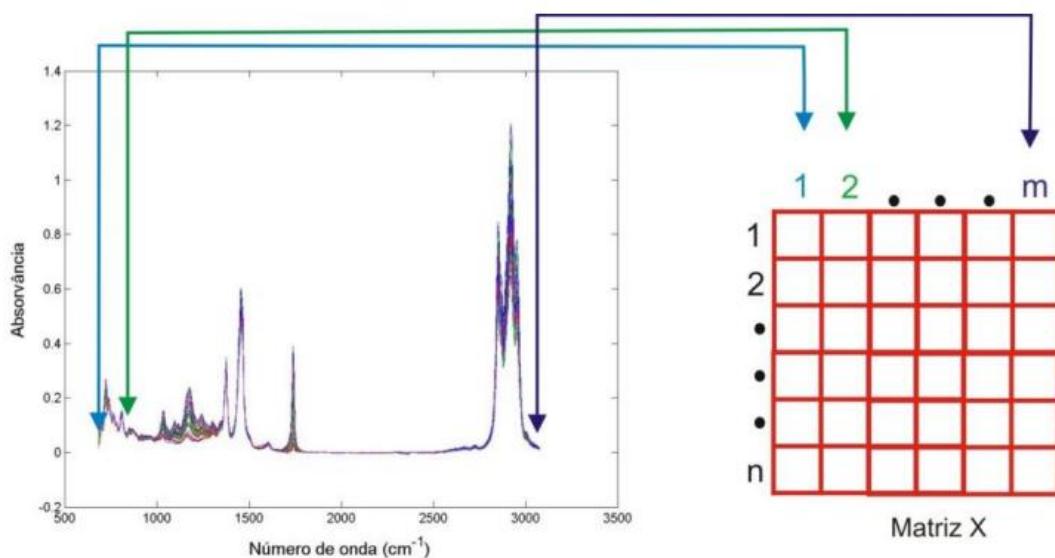
O emprego de métodos estatísticos e matemáticos no tratamento, classificação e análise de dados complexos, otimização de processos e resolução de problemas de origem química, ocasionou o surgimento de uma subárea da química analítica denominada Quimiometria (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). Dentro da quimiometria, duas vertentes de grande relevância se destacam: a classificação e a calibração multivariada (FORINA et al., 2007; MILDNER-SZKUDLARZ; JELEN, 2008).

A quimiometria, em sua vertente de Calibração Multivariada, objetiva o estudo e análise de medidas de origem química, baseando-se na observação indireta e/ou instrumental, relacionando diretamente tais medidas à composição química e características de uma

substância, e assim deduzindo o valor de uma propriedade de interesse, através de uma relação matemática (BRUNS; FAIGLE, 1985).

Para calibração multivariada de primeira ordem, os dados são apresentados em forma de uma matriz **X**, constituída de inúmeras medidas instrumentais de mesma natureza, como vários dados espectrais, valores de absorbância MIR, obtidos para diversos padrões de uma ou mais espécies de interesse, em que cada amostra representa um vetor (linhas da matriz), e cada região de número de onda é acomodada em uma coluna em **X**, enquanto a propriedade de interesse, determinada por uma metodologia padrão, é representada por um vetor **y** (Souza, 2014). Então é proposto um modelo matemático que melhor correlacione a matriz de resposta **Y**, ou vetor das concentrações **y** com a matriz **X** (FERREIRA et al., 1999; WOLD; SJOSTROM; ERIKSSON, 2001). A Figura 7 ilustra a disposição em que a matriz de dados **X** de dimensão $n \times m$ é projetada, ou seja, n espectros (amostra) e m variáveis (valor de absorbância em cada número de onda) pode ser construída a partir de um vetor de respostas instrumental, para calibração multivariada de primeira ordem.

Figura 7 - Representação da construção da matriz X para modelagem multivariada.



Fonte: (Souza, 2014; Santana, 2015)

Em geral, as matrizes de dados de natureza multivariada necessitam de tratamentos matemáticos que possibilitem reduzir fontes de variação não informativa para o modelo, estas manipulações são conhecidas como pré-tratamento dos dados. O objetivo é remover matematicamente fontes de variação indesejáveis que não serão removidas naturalmente durante a análise dos dados e que podem influenciar prejudicando os resultados finais, já que os sinais medidos consistem de sinal relevante e ruídos aleatórios (BORGES NETO, 2005).

Em medidas baseadas em espectros MIR, geralmente é possível observar ruído aleatório e variação da linha de base. O método mais simples para suavizar tais variações não informativas é a correção da linha de base, realizada neste trabalho pelo programa baseline do PLS_Toolbox versão 3.5 (Eigenvector Research) para Matlab 6.5 (MathWorks).

Os dados experimentais originais podem não ter uma distribuição adequada para a análise, como medidas em diferentes unidades e variáveis com diferentes variâncias, o que dificulta a extração de informações relevantes e interpretação destes, nestes casos, alguns pré-processamentos fazem-se necessários (FERREIRA et al., 1999).

Os métodos de pré-processamento mais utilizados consistem basicamente em centrar na média ou autoescalar os dados (Azzouz *et al.*, 2003). Para que os dados sejam centrados na média, calcula-se a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrai-se cada intensidade do respectivo valor médio. Dados autoescalados são primeiramente centrados na média, e então divididos pelo respectivo valor do desvio padrão, este procedimento é indicado quando se quer dar a mesma importância para todas as variáveis (Forina *et al.*, 2007). No caso de calibração multivariada aplicada a dados espectroscópicos, recomenda-se centrar os dados na média (Gontijo *et al.*, 2014). A centralização na média dos dados consiste em obter, para cada coluna da matriz **X** o valor médio e, em seguida, subtrai-se este valor de cada variável dessa mesma coluna. Desta forma, ocorre a mudança do sistema de coordenadas para o centro dos dados (FERREIRA et al., 1999).

A validação é o passo seguinte, onde amostras com concentrações conhecidas são inseridas para avaliar a eficiência do modelo criado. Os dois métodos comuns para a condução do processo de validação são por meio da validação interna, quando as próprias amostras de calibração são usadas para a validação e através da validação externa, em que é usado um conjunto distinto, mas com valores Y ainda conhecidos (MARTENS; NAES, 1996). Neste trabalho, os modelos de calibração multivariada de primeira ordem foram submetidos a validação externa. Na etapa de previsão, a resposta de interesse para uma amostra desconhecida é obtida utilizando o modelo matemático construído na etapa de calibração e validado posteriormente (Souza, 2014).

Neste trabalho, os modelos de calibração multivariada foram estabelecidos centrando os dados na média para a matriz **X** (valores de absorbância) e autoescalando os dados para o vetor de concentrações (vetor **y**).

1.7. Quadrados Mínimos Parciais (PLS)

O método desenvolvido por H. Wold (WOLD et al., 2001) conhecido como PLS “*Partial Least Square*” (regressão por Quadrados Mínimos Parciais) é considerado o algoritmo de regressão mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada a partir de dados de primeira ordem (Armenta *et al.*, 2007; Forina *et al.*, 2007). Este método não requer um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras, podendo realizar a previsão de amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes também estejam presentes na construção do modelo (WOLD et al., 2001).

O PLS retira para construção do modelo, informações de absorbância do conjunto de dados da matriz espectral (matriz **X**) e as correlaciona, através de operações matemáticas com as informações retiradas do conjunto de dados de referência (vetor **y**). Através de combinações

lineares dos dados espectroscópicos da matriz **X** e dos dados de concentração, do vetor **y**, se obtém as variáveis latentes (VL), novas variáveis que tem por finalidade alcançar a covariância máxima entre os espectros e a concentrações da espécie de interesse (Barker e Rayens, 2003).

As informações de **y** são incorporadas, de forma que cada componente principal do modelo, chamada agora de VL, é modificada para que a covariância entre a matriz **X** e o vetor concentração da espécie de interesse **y** seja maximizada. É usado para construção do modelo de calibração um número de VL que proporcione o menor erro possível de previsão, ou seja, que as diferenças entre os valores de referência e valores de previstos pelo modelo sejam as menores (ANDERSEN et al., 2012; WOLD et al., 2001). A matriz **X** é decomposta em vetores resultados **t** e **p** (scores e loads), além de uma matriz de erros **E**, de acordo com o esquema apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática da decomposição em variáveis latentes da matriz **X** para o modelo PLS.

$$\begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{X}} \\ n \end{matrix} = \sum_{i=1}^{i=A} \begin{matrix} l \\ \boxed{\mathbf{t}_i} \\ n \end{matrix} + \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{p}^T_i} \\ l \end{matrix} + \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{E}} \\ n \end{matrix}$$

Fonte: (Souza, 2014)

O PLS permite a identificação de amostras anômalas pelos valores de resíduais de **Q**, quando a amostra está fora do limite de confiança de 95%, e pelo valor limite de leverage (três vezes o número de variáveis latentes dividido pelo número de amostras) (MARBACH; HEISE, 1990).

A norma ASTM E1655-05 (ASTM, 2012) define leverage como a medida da influência da amostra no modelo de calibração multivariada, a localização do vetor espectral x dentro do multi-espaço de parâmetros de variáveis utilizadas no modelo, utilizado também para detecção de amostras anômalas (outliers) e para a estimativa da incerteza para um valor previsto pelo modelo.

A decomposição da matriz \mathbf{X} pode ser feita utilizando diversos algoritmos, como *NIPALS* (Nonlinear Iterative Partial Least Squares) ou *SIMPLS* (Straightforward Implementation of a Statistically Inspired Modification of the PLS) (JONG, 1993). No presente trabalho utilizou-se para a construção dos modelos o algoritmo SIMPLS, que considera um vetor \mathbf{y} que contém as concentrações da propriedade de interesse para determinar os pesos e scores.

O RMSE (do inglês, Root Mean Square Error) (POPPI, R. J.; BRAGA, J. W.; VALDERRAMA, P., 2009) ou raiz quadrada do erro médio quadrático fornece informação sobre o ajuste do modelo em relação aos dados de cada grupo, de calibração (RMSEC), validação cruzada (RMSECV) e previsão (RMSEP), obtido através da Equação 1.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_{previsto} - y_{real})^2}{n_{grupo} - 1}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde y_{prev} é o valor de concentração da espécie de interesse previsto, y_{real} o valor real de concentração da espécie de interesse presente na amostra e n_{cal} o número de amostras presentes no grupo de calibração. Para a determinação do número correto de VL, o método mais utilizado consiste na Validação Cruzada (CV – do inglês, Cross Validation).

Existem diversas técnicas para realização da validação cruzada dos dados, como a previsão de uma amostra tendo em conta o restante do conjunto, denominada leave-one-out; estilo randômico, onde as amostras são retiradas aleatoriamente em quantidade e sequência

variável e previstas em relação ao restante; por blocos de previsão, em que uma quantia de amostras previamente definida é retirada do modelo sequencialmente e prevista em relação ao restante; e por fim, a técnica de janelas de previsão aleatórias, conhecida como “*Venetian Blinds*” (venezianas cegas, em tradução livre), onde certa quantidade previamente determinada de amostras é retirada de forma aleatória do modelo, e previstas com base em agrupamentos das amostras restantes, ou seja, cada conjunto de teste é determinado selecionando cada um dos objetos no conjunto de dados, começando nos objetos numerados.

Em todos os casos, o processo é repetido até que todas as amostras tenham sido previstas e o erro quadrático médio da validação cruzada “*Root Mean Square Error of Cross Validation*” (RMSECV) é calculado.

A Média do erro relativo (EM) fornece uma importante informação sobre a eficiência do modelo, sendo calculada pela média dos valores obtidos para RMSEC, RMSECV e RMSEP.

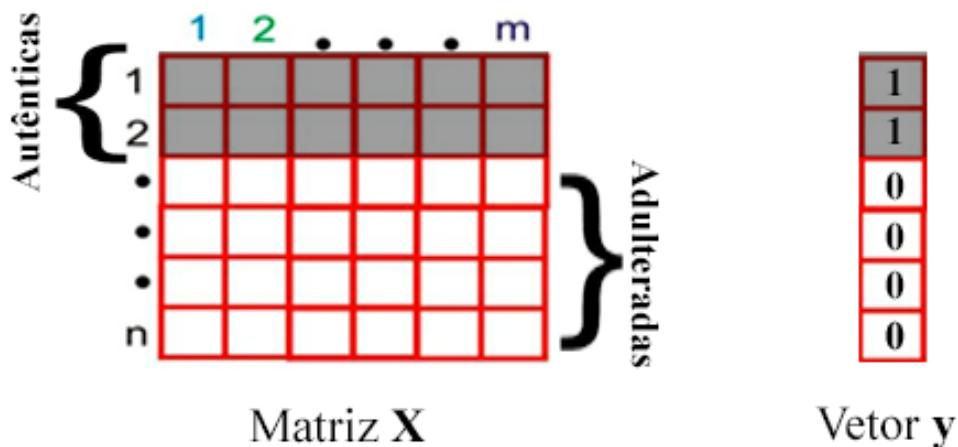
O PLS foi aplicado também na intenção de quantificar simultaneamente a dois tipos de adulterantes em OEL, para tal, foram escolhidos aqueles que apresentaram maior incidência de uso em práticas de fraude, o OS e OG. Utilizando a calibração multivariada com base na Regressão de mínimos quadrados parciais, então denominada PLS2, com a finalidade de comparar os resultados do PLS2 com os obtidos na quantificação de um único contaminante (PLS). Em PLS, as propriedades de um único analito podem ser quantificadas enquanto que para PLS2, vários analitos podem ser detectados e quantificados ao mesmo tempo. Um único conjunto de variáveis latentes (LV) é projetado para todas as variáveis dependentes (valores de absorbância) em PLS2. Estudos anteriores mostraram que o PLS geralmente apresenta resultados mais precisos, no entanto, PLS2 tem a vantagem de quantificação simultânea de vários analitos de interesse.

1.8. Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA)

A aplicabilidade de métodos de reconhecimento de padrões supervisionados é ampla, sendo recorrentemente empregados a dados químicos com diversas finalidades, tais como a identificação de perfis e/ou impressões digitais (Xu *et al.*, 2012), autenticação, detecção de falsificação (De Almeida *et al.*, 2013), avaliação da qualidade e pureza dos alimentos (Cebeci Malatas *et al.*, 2013; Botelho *et al.*, 2015), interpretação de dados, etc. (Botelho *et al.*, 2015). A Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA) é uma variação do algoritmo PLS. No PLS-DA, o vetor y trata-se de uma relação de valores correspondentes a classe à qual a amostra pertence (Barker e Rayens, 2003).

Neste trabalho, utilizaram-se duas classes, os óleos vegetais autênticos OEL e OEG, aos quais foram atribuídos os valores 1 correspondentes a classe de interesse denominada “puros” e amostras adulteradas para as quais foram atribuídos os valores 0, não pertencentes a classe de interesse, denominados “adulteradas”. A Figura 9 apresenta um esquema de organização da matriz X e vetor y para construção do modelo de classificação PLS-DA.

Figura 9 – Representação da matriz de dados X e o vetor de classes y usados no PLS-DA.



Fonte:(Santana, 2015).

Os valores previstos pelo modelo PLS-DA são próximos de 0 e 1, sendo classificado como 1 ou próximo, as amostras pertencentes a classe de interesse, enquanto aquelas definidas como não pertencentes apresentam valores 0 ou próximo a 0. Não obstante, faz-se necessário calcular um valor limite para separar tais classes (interesse e não-interesse), este valor é denominado “*threshold*” representado graficamente por uma linha tracejada, cujo o cálculo é baseado no teorema de Bayes (Barker e Rayens, 2003), que leva em consideração que a distribuição das amostras no conjunto de treinamento será semelhante a observada no conjunto de previsão. Usando a distribuição dos resultados, um limite é calculado de tal maneira que o número de falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN) sejam minimizados quando as amostras do conjunto de teste forem classificadas (ALMEIDA et al., 2013; WISE et al., 2006).

Quando a amostra apresentar um valor previsto acima do *threshold*, ela é considerada como pertencente a classe 1 (interesse) e as amostras abaixo deste valor limite são pertencentes a classe 0 (não-interesse).

Para a construção do modelo PLS-DA, procura-se encontrara quantidade de variáveis latentes (VL) que descreva com maior abrangência a covariância das amostras na matriz **X** com o vetor de classes **y**, que tenham a correlação máxima com a classe de valores conhecida, resultando em menor peso para a classe irrelevante ou a variância do ruído (BARKER; RAYENS, 2003). A escolha do número de Variáveis Latentes (VL) abaixo do número ideal causa a perda de informação por parte do modelo, informações relevantes são descartadas do modelo, denominado sub-ajuste. Em contrapartida, quando o número de Variáveis Latentes é excessivo se por consequência haverá a modelagem de ruídos e informações não relevantes para o modelo, tendo assim um sobre-ajuste do modelo multivariado.

Para a identificação destes problemas durante a etapa de modelagem será realizada uma validação nas amostras do conjunto de treinamento, neste trabalho optou-se pela validação cruzada do tipo “venetian blind” (janelas aleatórias). Para cada variável latente a eficiência da

validação é expressa pelo Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada (RMSECV).

Deve-se assegurar que no conjunto de treinamento constem apenas amostras representativas de cada classe, e que amostras muito divergentes do grupo, ou que apresentam erros grosseiros de medição (anômalas) sejam devidamente identificadas e retiradas do conjunto de treinamento, pois podem se tornar responsáveis pela inserção de erros durante a etapa de previsão de novas amostras. A ocorrência de anomalias deve-se a razões diversas e por vezes imprevisíveis como erros instrumentais, experimentais, presença de compostos químicos não pertencentes ao grupo analisado (contaminação accidental das amostras) ou pequenas diferenciações de composições químicas, entre outras.

A detecção de amostras anômalas, considerada fora do padrão em relação as demais, chamadas “*outliers*” pode ser observada graficamente através do gráfico de influência (leverage) versus resíduos de Student (Q Residual), no qual as amostras fora do limite de confiança de 95% são consideradas amostras anômalas. O leverage representa a distância da amostra em relação ao centro de distribuição das amostras em um espaço n dimensional e indica a capacidade da amostra em influenciar a estimativa dos coeficientes de regressão, geometricamente uma amostra que está próxima ao centro do modelo possui baixo valor de leverage, enquanto que uma mais distante apresenta um valor elevado. O resíduo de Student representa a diferença entre o valor experimental e o valor calculado pelo modelo de regressão já padronizado, que é obtido dividindo-se o resíduo por uma estimativa de seu próprio desvio padrão (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Após a construção do modelo PLS-DA, pode-se fazer a análise da Variável Importante na Projeção (VIP) com intuito de identificar quais variáveis dos espectros MIR apresentaram maior relevância para a separação das classes das amostras, como também podem ser utilizadas em métodos de seleção de variáveis, visando aumentar a eficiência do modelo ao eliminar variáveis não informativas (CHONG; JUN, 2005). As variáveis com escores maiores que 1 são

consideradas as principais variáveis, relevantes na construção do modelo. (MEHMOOD et al., 2012).

1.9. Validação Multivariada de metodologia de classificação

A avaliação dos parâmetros de desempenho do modelo de classificação é feita através da Tabela Confusão que fornece a base para descrever os resultados do modelo de classificação e caracterizar os erros, contribuindo a refinar a classificação. Os parâmetros utilizados foram as taxas de Falsos Positivos (FP), Falsos Negativos (FN), Verdadeiros Positivos (VP) e Verdadeiros Negativos (VN), sensibilidade, especificidade, precisão, eficiência e o Coeficiente de Correlação de Matthew's (CCM). É importante salientar que alguns parâmetros de desempenho têm o mesmo nome, mas diferem da definição utilizada em química analítica e metrologia. A taxa de FP é a probabilidade de uma amostra negativa (não pertencente a classe) ser classificada como uma amostra positiva (pertencente a classe). Em equivalência, a taxa de FN representaria uma amostra autêntica ser classificada como adulterada, o mesmo raciocínio é aplicado ao cálculo das taxas de VP e VN.

A sensibilidade equivale a capacidade do modelo de classificar corretamente as amostras VP, parâmetro calculado conforme a Equação 2 (Xu et al., 2012).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \quad (\text{Equação 2})$$

A especificidade é a capacidade do modelo de classificar corretamente as amostras verdadeiras negativas. Este parâmetro é calculado conforme a Equação 3 (XU et al., 2012).

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN+FP} \quad (\text{Equação 3})$$

A precisão é a proporção de classificação correta independente da classe na qual a amostra melhor se enquadra, sendo calculada conforme a Equação 4 (XU et al., 2012).

$$\text{Precisão} = \frac{VN+VP}{VN+VP+FN+FP} \quad (\text{Equação 4})$$

Ambos os parâmetros eficiência e o Coeficiente de Correlação de Matthew's (CCM) (Worley et al., 2013) expressam através de seus valores o grau de eficiência dos modelos construídos. A eficiência é determinada pela média aritmética dos valores de sensibilidade e especificidade sendo que o valor 1 corresponde a uma eficiência de 100%, isto é, numa situação em que todas as amostras foram corretamente classificadas, conforme sua classe de origem. O parâmetro CCM é calculado conforme a Equação 5 e tem resultados com valores entre -1 e +1, sendo seus limites, um valor de +1 corresponde a uma eficiência de 100%, valor igual a 0 uma classificação errada e igual a -1 uma classificação inversa (ALMEIDA et al., 2013).

$$CCM = \frac{(VP \times VN - FP \times FN)}{\sqrt{(VP+FN)(VP+FP)(VN+FN)(VN+FP)}} \quad (\text{Equação 5})$$

Os resultados do modelo PLS-DA geralmente são expressos através de um gráfico de estimativas de classes, onde as amostras posicionadas acima da linha tracejada que representa o limite para separação das classes (*threshold*) são classificadas como pertencentes a classe 1, de interesse. Já as amostras localizadas abaixo da linha tracejada, são classificadas como pertencentes a classe 0 ou seja, a classe que não é de interesse.

O sinal analítico líquido, do inglês "Net analyte signal", foi definido por Lorber (LORBER; FABER; KOWALSKI, 1997) como sendo a parte do sinal analítico que é ortogonal às contribuições de outros possíveis constituintes presentes na amostra (Souza, 2014). Com o uso do NAS é possível calcular um valor escalar livre de interferentes a partir do vetor sinal analítico (Ferré e Faber, 2003), o que torna possível a construção de uma nova forma de calibração, em que o modelo multivariado pode ser representado de uma forma pseudo-univariada (Equação 6). Para o cálculo do NAS usa-se a matriz de dados reconstruída com A variáveis latentes através do algoritmo SIMPLS.

$$\mathbf{r}_a^* = \mathbf{P}_{\text{NAS},a} \mathbf{r} = [\mathbf{I} - \mathbf{R}_{-a}(\mathbf{R}_{-a})^+] \cdot \mathbf{r} \quad (\text{Equação 6})$$

O conceito do NAS é comumente aplicado a validação de modelos PLS para determinações diretas de espécies presentes em amostras a partir de dados espectrais (FABER; KOWALSKI, 1997). O cálculo do NAS para dados analíticos de primeira ordem está presente nas recomendações da IUPAC para cálculo da incerteza e estimativa de figuras de mérito em calibração multivariada publicada em 2006 (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006).

Em calibração multivariada de primeira ordem, a concentração de a em amostras desconhecidas é obtida r conforme Equação 7.

$$\mathbf{Y}_{un,a} = \frac{\mathbf{s}_a^T \mathbf{P}_{\text{NAS},a} \mathbf{r}}{\mathbf{s}_a^T \mathbf{P}_{\text{NAS},a} \mathbf{s}_a} = \frac{\mathbf{s}_a^T \mathbf{P}_{\text{NAS},a} \mathbf{P}_{\text{NAS},a} \mathbf{r}}{\mathbf{s}_a^T \mathbf{P}_{\text{NAS},a} \mathbf{P}_{\text{NAS},a} \mathbf{s}_a} = \frac{(\mathbf{s}_a^*)^T \mathbf{r}_a^*}{\|\mathbf{s}_a^*\|^2} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde $P_{\text{NAS},a}$ é a matriz ortogonal de projeção para um determinado vetor para o espaço NAS, a identifica o analito de interesse, \mathbf{s}_a é um espectro contendo o analito a , \mathbf{s}_a^T sua correspondente NAS e \mathbf{r} representa o espectro de uma determinada amostra (ROCHA et al., 2012).

1.10. Figuras de Mérito

Quando um novo método analítico é desenvolvido existe a necessidade da certificação por parte de agências reguladoras, tais como INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas)(ABNT, 2008a;2009), ANVISA, International Conference on Harmonization (ICH) e American Society for Testing & Materials (ASTM, 2012), para atestar se o método apresenta uma performance adequada nas condições em que será aplicado. Esse processo de averiguação é denominado validação de metodologia.

A validação de metodologia de calibração multivariada se dá através da determinação de diversos parâmetros conhecidos como figuras de mérito. As principais figuras de mérito são exatidão, ajuste ou linearidade, seletividade, sensibilidade, sensibilidade analítica, teste para erro sistemático (bias), limite de detecção e limite de quantificação.

A maneira pela qual tais figuras de mérito devem ser determinadas é estabelecida pelos órgãos de fiscalização e regulamentação, encontra-se descrita em normas específica, guias de validação e trabalhos científicos.

Exatidão refere-se ao grau de concordância entre o valor estimado ou medido e o valor tido como verdadeiro ou de referência. Comumente em aplicações com calibração multivariada, a exatidão é estimada através da raiz quadrada do RMSEP (ROCHA et al., 2012). A eficiência de previsão dos modelos construídos neste trabalho foi avaliada através da análise dos valores de erro RMSEC, RMSECV e RMSEP (Equação 1), e através da determinação dos coeficientes de correlação (R) para previsão tem-se o Ajuste do modelo (ROCHA et al., 2012).

A Seletividade por sua vez, consiste na capacidade do modelo multivariado em distinguir a espécie de interesse em uma mistura na presença de componentes que possam interferir em sua determinação. É a medida do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e

os interferentes presentes na amostra e indica a parte do sinal que é perdida por essa sobreposição. Para modelos de calibração multivariada esse parâmetro é definido pela Equação 8, onde \widehat{nas}_i é o escalar NAS em relação a espécie a (ROCHA et al., 2012).

Sensibilidade é definida como fração de sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração da propriedade de interesse (INMETRO, 2007). Para modelos de calibração multivariada, é determinada pela Equação 9. Já a Sensibilidade Analítica, é definida como a razão entre a sensibilidade e uma estimativa do desvio padrão para a flutuação do sinal analítico (δx), calculado de acordo com a Equação 10 (POPPI et al., 2009).

A exatidão pode também ser analisada pela comparação dos valores obtidos para a inclinação e o intercepto de uma reta ajustada entre valores de referência, iguais a 1 e 0, (valores reais de proporção da espécie de interesse) e os valores de concentração estimados pelo modelo. Tal checagem é efetuada através da elipse de confiança (EJCR) “*elliptical joint confidence region*”. Os modelos podem ser considerados estatisticamente aceitáveis quando localizados dentro dos limites delimitados pela elipse, no nível de confiança considerado. Caso os valores estimados para a inclinação e intercepto apresentem-se fora de seus intervalos de confiança, há indícios de erros sistemáticos proporcionais e constantes, respectivamente (Souza, 2014).

O ajuste relaciona-se a linearidade do modelo (R), é estimado pela correlação entre os valores de referência da propriedade de interesse e os valores estimados pelo modelo de calibração multivariada, através da determinação por quadrados mínimos da reta que melhor se ajusta aos valores de referência e os valores estimados pelo modelo. É possível também determinar o ajuste do modelo através da reta que melhor descreva a relação dos valores de NAS contra a concentração de referência da propriedade de interesse. Qualitativamente, o gráfico dos resíduos para as amostras de calibração e validação pode indicar se os dados seguem um comportamento linear se a distribuição destes resíduos for aleatória (FERRÉ, J. et al., 1997; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007).

São definidos como Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) as menores proporções da propriedade de interesse que podem ser detectadas e previstas, respectivamente, pelo modelo de calibração multivariada. Nos modelos gerados, o LD foi calculado através da Equação 11, enquanto o LQ foi obtido a partir da Equação 12.

O termo bias é atribuído a erros sistemáticos que são calculados pela diferença entre a média e o valor verdadeiro para a espécie de interesse, segundo a IUPAC (THOMPSON et al., 2006), correspondendo as componentes de erro que não são aleatórias. A norma ASTM E1655-05 aborda a investigação desse parâmetro através de um teste-t para as amostras de validação no nível de 95% de confiança, para avaliar se o “bias” incluso no modelo é significativo. O bias médio para o conjunto de validação é calculado pela Equação 13. Onde k é o número de variáveis latentes (POPPI et al., 2009). A Tabela 4 traz as equações de Figuras de Mérito aplicadas a validação multivariada dos modelos de quantificação por PLS.

Tabela 4 – Equações de Figuras de Mérito aplicadas a validação multivariada dos modelos PLS.

Figura de Mérito	Equação	Parâmetro
Precisão	$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-1}}$ (Equação 1)	RMSEC (% w/w) RMSECV (% w/w) RMSEP (% w/w)
Limite de detecção (%m/m)	$LD = 3.3\delta_x \frac{1}{S\hat{E}N}$ (Equação 11)	
Limite de quantificação (%m/m)	$LQ = 10\delta_x \frac{1}{S\hat{E}N}$ (Equação 12)	
Seletividade (%)	$SEL_i = \frac{n_{\text{as}_i}}{\ x_i\ }$ (Equação 8)	
Sensibilidade	$S\hat{E}N = \frac{1}{\ \mathbf{b}_k\ }$ (Equação 9)	
Sensibilidade Analítica	$\gamma = \frac{S\hat{E}N}{\ \delta x\ }$	
Inverso da Sensibilidade Analítica	(Equação 10)	
	$bias = \frac{\sum_{i=1}^{n_{\text{val}}} (y_i - \hat{y}_i)}{n_{\text{val}}}$ (Equation 13)	Bias
Testes para Erros Sistemáticos	$SDV = \sqrt{\frac{\sum[(y_i - \hat{y}_i) - bias]^2}{n_{\text{val}} - 1}}$ (Equation 14)	Desvio padrão
	$t_{bias} = \frac{ bias \sqrt{n_{\text{val}}}}{SDV}$ (Equation 15)	Graus de liberdade t_{calc} t_{crit}

Legenda: Na Equação 1 \hat{y}_i corresponde ao valor previsto usando o modelo PLS, y_i corresponde ao valor de referência para a amostra I e n é a quantidade de amostras. Na Equação 9 n_{as_i} é a norma do vetor NAS e $\|x_i\|$ corresponde a norma de cada espectro.

Fonte: O autor.

Caso o valor de t_{bias} (Equação 15) encontrado, calculado em relação ao valor de desvio padrão dos erros de validação (FERRÉ, J. et al., 1997) (SDV – “*standard deviation of validation*”) definido pela Equação 14 apresente resultado maior do que $t_{crítico}$ tabelado para $n_{prev}-1$ graus de liberdade do modelo, é um indicativo de que erros sistemáticos presentes no modelo multivariado são significativos.

CAPÍTULO 2 – MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE ÓLEOS EXTRAVIRGEM

2.1. Objetivos

Quantificar adulterações por óleo de soja refinado (OS), óleo de girassol refinado (OG), óleo de milho refinado (OM) e óleo mineral derivado de Petróleo (OMP) em amostras de OEL, utilizando modelos de calibração multivariada PLS a partir de dados espectrais de MIR, em proporções de 1,00 a 30,00% (m/m) de adulteração;

Empregar metodologias analíticas com a finalidade de classificar, diferenciando os óleos puros de OEL e OEG dos adulterados com oleaginosas de menor valor econômico OS, OG, OM e OMP, empregando Espectrometria no Infravermelho Médio aliada ao método quimiométrico de Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA);

Aplicar a metodologia de calibração multivariada PLS a partir de dados espectrais de MIR, a fim de quantificar adulterações por óleo de soja refinado (OS), óleo de girassol refinado (OG), óleo de milho refinado (OM) e óleo mineral derivado de Petróleo (OMP) em amostras de OEG, em proporções de 1,00 a 30,00% (m/m) de adulteração;

Construir modelo PLS2 de quantificação simultânea de adulterações por OS, OG em OEL e OS, OMP em OEG;

Validar os modelos PLS, conforme recomendações da ASTM E1655-05 e através do cálculo das figuras de mérito e aplicar os modelos PLS construídos a amostras reais de OEL e OEG;

2.2. Procedimento Experimental

Para a construção dos modelos PLS de quantificação de adulterações em OEL assim como para os modelos PLS-DA, foram obtidos 10 lotes diferentes de OEL e 04 lotes diferentes de OEG, com certificado de pureza emitido pelo fabricante, ao passo que o OS, OG, OM e OMP

usados para adulteração das amostras, foram obtidos de supermercados locais.

Foram preparados grupos de amostras, adicionando proporções conhecidas de óleo adulterante diretamente no OEL e OEG, com diferentes concentrações de adulterante para cada amostra, variando entre 1,00-30,00% (m/m) para cada modelo PLS construído. Deste montante, aproximadamente 60% das amostras foram destinadas ao conjunto de calibração e 40% das amostras destinadas ao conjunto de previsão, respeitando a orientação da norma ASTM E1655-05, que indica que o número mínimo de amostras para um conjunto de calibração deve ser igual a $6(k + 1)$ para dados centrados na média (onde k é o número de variáveis latentes) enquanto o conjunto de previsão deve ser igual a $4k$.

Em todos os modelos, o grupo de calibração foi completamente independente do conjunto de previsão, ou seja, foram utilizadas amostras distintas para construção e teste dos modelos. As dimensões dos conjuntos de amostras preparadas para cada modelo de adulteração em OEL são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Amostras e números de variáveis latentes utilizados na construção dos modelos PLS-DA, PLS e PLS2.

Parâmetros do Modelo	PLS		PLS2		PLS-DA			
	OEL+OS	OEL+OG	OEL+OM	OEL+OS+OG	OEL	OS	OG	OM
Número de amostras de calibração	43	37	40	80	84	84	84	84
Número de amostras de Previsão	25	22	23	47	36	36	36	36
Variáveis Latentes	6	5	5	8	5	4	6	5

Fonte: o autor.

As quantidades de amostras utilizadas na construção dos modelos PLS e PLS-DA de OEG, por sua vez, são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 - Amostras e números de variáveis latentes utilizados na construção dos modelos PLS-DA, PLS e PLS2 de OEG.

Parâmetros do Modelo	PLS				PLS2				PLS-DA			
	OEG+ OS OG OM OMP				OEG+OS+OMP OEG OS OG OM OMP							
	OEG+	OEG+	OEG+	OEG+	OEG+OS+OMP	OEG	OS	OG	OM	OMP		
Número de amostras de calibração	42	37	40	42	88	84	84	84	84	84		
Número de amostras de previsão	25	31	24	22	45	36	36	36	36	36		
Variáveis Latentes	6	4	4	5	6	4	5	5	5	4		

Fonte: o autor.

Para todos os modelos PLS construídos foi realizado um “teste cego”, que consistiu em preparar amostras diferentes entre si, adulteradas artificialmente com proporções conhecidas de óleo (OS, OG, OM ou OMP) que foram então adicionadas ao grupo de previsão do PLS, porém sem informar ao modelo o valor de y , tendo assim uma previsão isenta de comparação inicial.

Para os modelos PLS OEL foram preparadas e adicionadas a cada modelo PLS respetivo 6 amostras com taxas de adulteração variando de 2,0 a 25,0% (m/m), obtendo um erro médio do “teste cego” para cada modelo. Para os modelos PLS de OEG também foram realizados “teste cego”, 6 amostras com taxas de adulteração de 1,6 a 25,0% (m/m) para cada modelo.

Para aplicação do modelo a amostras reais, OEL comercial foi obtido de três marcas diferentes, que por motivos legais, terão o nome omitido neste trabalho, sendo denominadas então A, B e C. As marcas A B e C foram adquiridas em 6 lotes cada, nas regiões brasileiras de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, respectivamente. Para aplicação do modelo a

amostras reais, OEG comercial foi obtido de duas marcas, ambas comercializam o OEG em formato de drágeas, e por motivos legais, tais marcas terão o nome omitido neste trabalho, sendo então denominadas D e E, adquiridas em 2 lotes cada, na região de Minas Gerais.

Os espectros de cada amostra foram obtidos em triplicata e adicionados aos modelos PLS construídos para detecção e quantificação da adulteração. Destas amostras reais, foram testadas a presença de adulterações por OS, OG, OM e OMP.

Os espectros MIR foram adquiridos em triplicata, utilizando equipamento espetrômetro Perkin Elmer Spectrum Two, aprovado com um acessório de reflectância total atenuada horizontal (HATR) de cristal ZnSe, obtidas medições de absorbância na região de 4000-600 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} em 16 varreduras cada. Aproximadamente um volume de 0,5 mL de cada amostra foi depositado na superfície do cristal HATR-ZnSe para obtenção do espetro. O HATR foi limpo com álcool Isopropílico após cada varredura, a fim de evitar a contaminação entre a amostra atual e amostras pré-carregadas. As linhas de base espetrais foram corrigidas usando o método de linha de base “*baseline*” para os intervalos de 190-22600 cm^{-1} e 3100-4000 cm^{-1} para ambas as matrizes de dados.

O software Matlab 7.5 (Mathworks Inc.) e PLS Toolbox 8.1 (Eigenvector Research) foram utilizados, o modelo foi desenvolvido com base nos algoritmos PLS, onde as variáveis no bloco X (dados espetrais) estão relacionadas à concentração de adulterante (%) de adulteração em gramas) informado ao modelo através do vetor y (Wold et al., 2001).

Para a construção dos modelos PLS-DA as amostras foram separadas aleatoriamente para compor os conjuntos de treinamento e teste, as matrizes de dados para os modelos PLS-DA de classificação de OEL e OEG adulterados com OS, OG, OM e OMP foram constituídas de 354, 360 e 348 espectros, respectivamente, com 2418 variáveis (valores de absorbância) por espetro.

O conjunto de dados da matriz **X** de valores de absorbância MIR foi dividido em dois

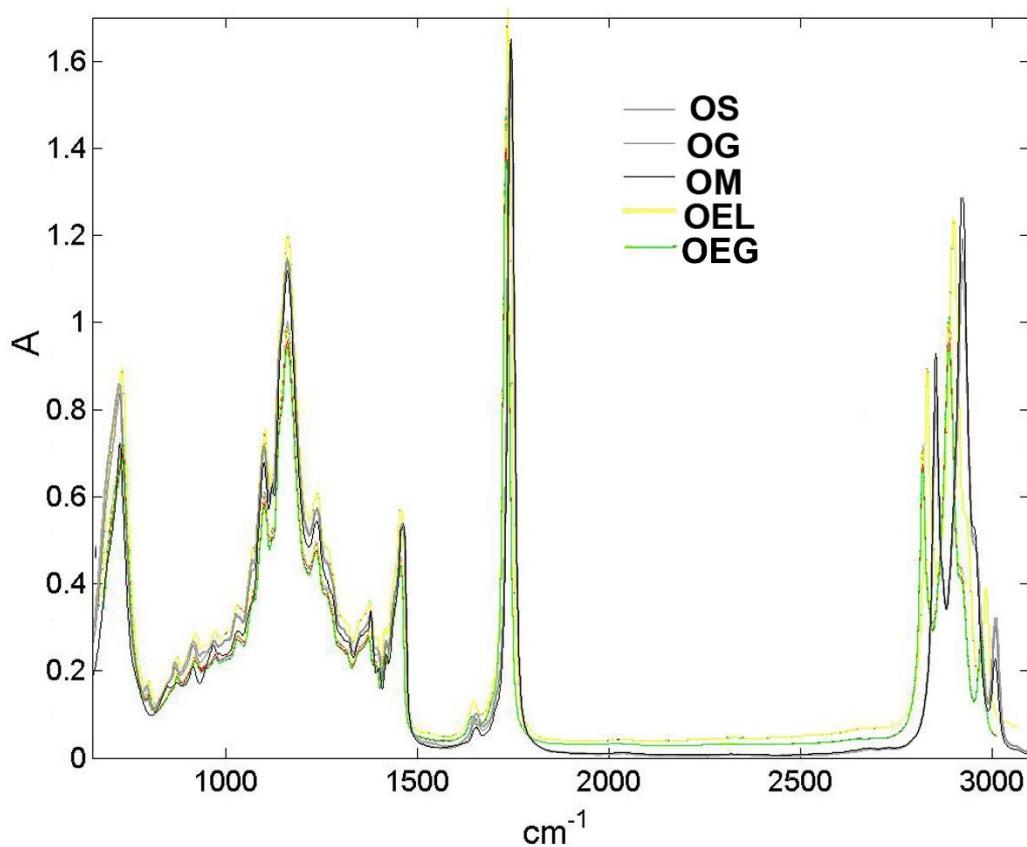
subconjuntos, um para o treinamento (calibração) e outro para teste (validação). Durante a construção do modelo PLS-DA foi escolhido o melhor número de Variáveis Latentes (VL) através do critério de menor RMSECV observado, na análise conjunta da variância acumulada em X e y.

Foi então realizada a detecção de *outliers*, através da análise gráfica da relação entre os valores de influência (leverage) versus resíduos de Student (Q Residual) para todas as amostras de calibração e teste, em seguida a qualidade dos modelos construídos foi avaliada através da tabela de confusão e os parâmetros RMSEC, RMSECV e RMSEP.

A validação cruzada aplicada na construção dos modelos PLS e PLS-DA para controle de qualidade de OEL e OEG foi o *venetian blinds* com 12 splits (aberturas) e 4 amostras por split, ou seja, selecionadas aleatoriamente 12 amostras do grupo de calibração e testadas 4 a 4 em relação as demais amostras selecionadas.

A Figura 10 apresenta os perfis espectrais de (—) OEL, (—) OEG, (—) OS, (—) OG e (—) OM. É possível observar que todos possuem grande semelhança em suas bandas de absorção, apresentam características espectrais relacionadas às dos triglicerídeos. Consequentemente, não é possível através de inspeção visual simples, realizar a diferenciação de amostras não adulteradas de adulteradas, tornando-se necessário a utilização de métodos quimiométricos.

Figura 10 – Perfis espectrais MIR dos óleos OEL, OEG, OS, OG e OM.



Fonte: o autor.

A simples análise visual dos perfis espectrais das amostras não permite estabelecer uma relação entre valores e/ou picos de absorbância e as concentrações de um óleo adulterante.

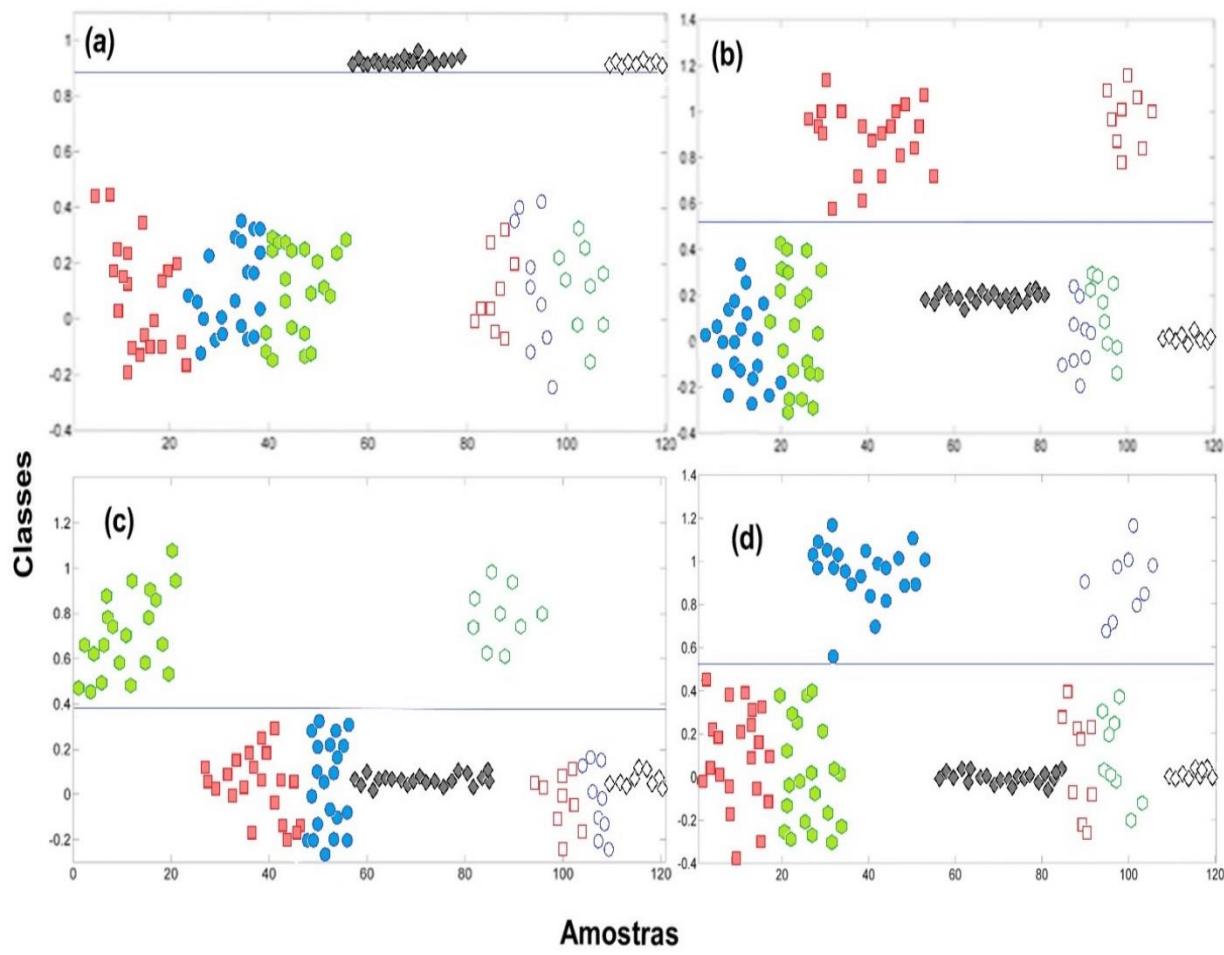
2.3. Modelos PLS-DA de Detecção de Adulterações por Óleos Refinados em Óleo de Linhaça Extravirgem

Os Modelos PLS e PLS-DA para adulterações de OEL por OMP não foram construídos, uma vez que, preparando amostras adulteradas com proporções de OMP superiores a 6,0% pôde-se observar mudança significativa da coloração da amostra em relação a OEL puro, que se apresentou visivelmente mais clara, podendo a diferença ser identificada a olho nu. Desta forma, concluiu-se que, dada a coloração castanho intenso do OEL, tal adulteração seria

invável de ocorrer comercialmente, uma vez que poderia ser facilmente percebida, sem necessidade do emprego de metodologias analíticas.

A Figura 11 apresenta os valores estimados de classe, para o conjunto de treinamento (amostras de calibração) e conjunto de teste (amostras de previsão). As amostras que estão acima do valor do limiar “*threshold*” são classificadas como pertencentes à OEL não adulterada (Figura 11(a)) e abaixo do valor do limite como OEL adulterado por (b) OS, (c) OM e (d) OG, respectivamente. O limite é o valor usado para separar as classes e calculado de acordo com o teorema de Bayes.

Figura 11 – Classes do PLS-DA para (a) OEL puro (\blacklozenge amostras de calibração e \lozenge amostras de teste), (b) OEL adulterado com OS (\blacksquare amostras de calibração e \square amostras de teste) (c) OM (\blacksquare amostras de calibração e \square amostras de teste) e (d) OG (\bullet amostras de calibração e \circ amostras de teste).



Fonte: o autor.

Pode-se observar que em todos os modelos PLS-DA houve classificação correta, uma vez que todas amostras pertencentes a classe de interesse em cada caso, se apresentaram acima do limiar Threshold. Os valores obtidos e a interpretação gráfica das classes evidenciam que os modelos PLS-DA construídos foram eficientes na classificação das amostras adulteradas e não adulteradas, assim como conseguiu, com eficiência de 100% classificar o óleo refinado utilizado na adulteração.

A Tabela 7 traz os resultados obtidos dos modelos PLS-DA, parâmetros de classificação para classificação de adulterações em OEL por OS, OG e OM.

Tabela 7 - Parâmetros de classificação obtidos para modelos PLS-DA de detecção de adulterações em OEL por OS, OG e OM.

Parâmetros	CLASSE PURO	CLASSE ADULTERADO COM		
	OEL	OS	OG	OM
Sensibilidade (%)	100	100	100	100
Especificidade (%)	100	100	100	100
VP	1.0	1.0	1.0	1.0
FP	0	0	0	0
VN	1.0	1.0	1.0	1.0
FN	0	0	0	0
Variância explicada % (X / y)	99.47/89.21	99.79/89.62	99.58/89.76	99.42/88.07
Threshold	0.86	0.57	0.38	0.55

Fonte: o autor.

Conforme os resultados apresentados acima, pode-se salientar que ouve classificação correta de 100% das amostras nos quatro modelos PLS-DA, sem presença de FP ou FN, resultando em valores de CCM iguais a +1 para todos os casos, com variância explicada entre os valores de absorbância (matrix **X**) e os valores de concentração dos óleos adulterantes (**y**) da ordem de 99%.

2.4. Modelos PLS de Quantificação de Adulterações por Óleos Refinados em Óleo de Linhaça Extravirgem

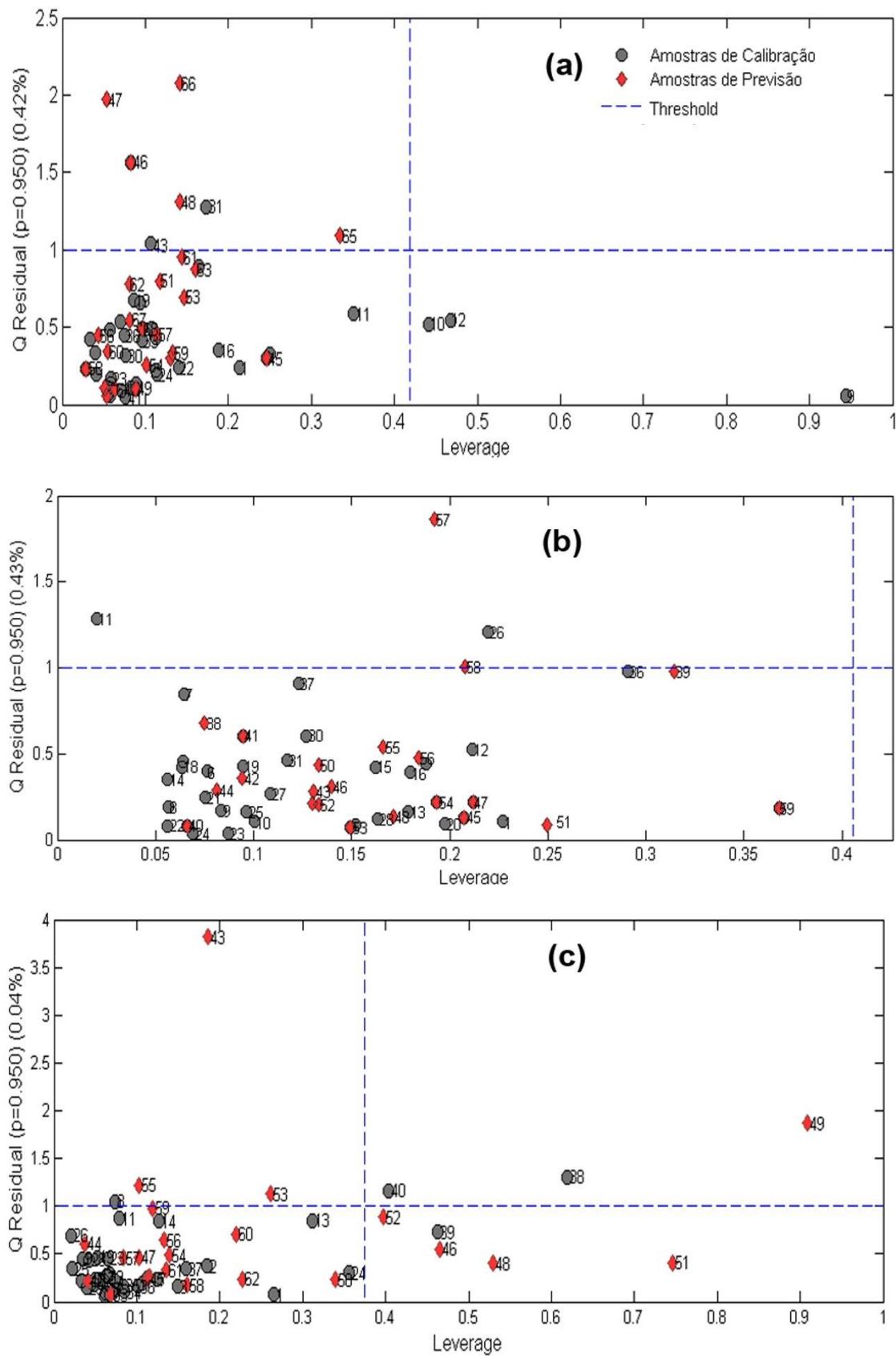
O teste para outliers de cada modelo é apresentado na Figura 12, as amostras pertencentes ao grupo de calibração são representadas por  , enquanto as amostras do grupo de previsão são representadas por  .

Nenhuma amostra dos grupos de calibração ou previsão foi considerada anômala nos modelos PLS OEL+OS e PLS OEL+OG. No modelo PLS OEL+OM foram detectadas três amostras consideradas outliers, por apresentarem elevados valores de resíduo e se distanciarem das demais amostras do modelo, localizando-se graficamente acima dos limites de Leverage e Q residual. As amostras 40 e 30 do grupo de calibração assim como a amostra 49 do grupo de previsão foram retiradas e o modelo então construído (Figura 12). Foi gerado novamente o gráfico Leverage versus Q residual para as amostras restantes e não foram observados novos outliers.

No modelo PLS2 OEL+OS+OG não foram observadas amostras anômalas. A decisão de eliminar as amostras se deu por meio da análise dos valores de resíduos não modelados por valores de leverage para um limite de confiança de 95% para cada amostra.

O teste de amostras cegas foi realizado, 6 amostras diferentes, preparadas adulterando artificialmente OEL com proporções conhecidas de adulteração por óleo de 2,0 a 25,0% (m/m) para cada modelo, obtendo erro médio de 1,21%, 1,65% e 1,84% para os modelos PLS OEL+OS, OEL+OG e OEL+OM, respectivamente.

Figura 12 - Leverage x Q residual (a) Óleo de Linhaça com óleo de soja (b) Óleo de Linhaça com óleo de girassol (c) Óleo de Linhaça com óleo de milho.



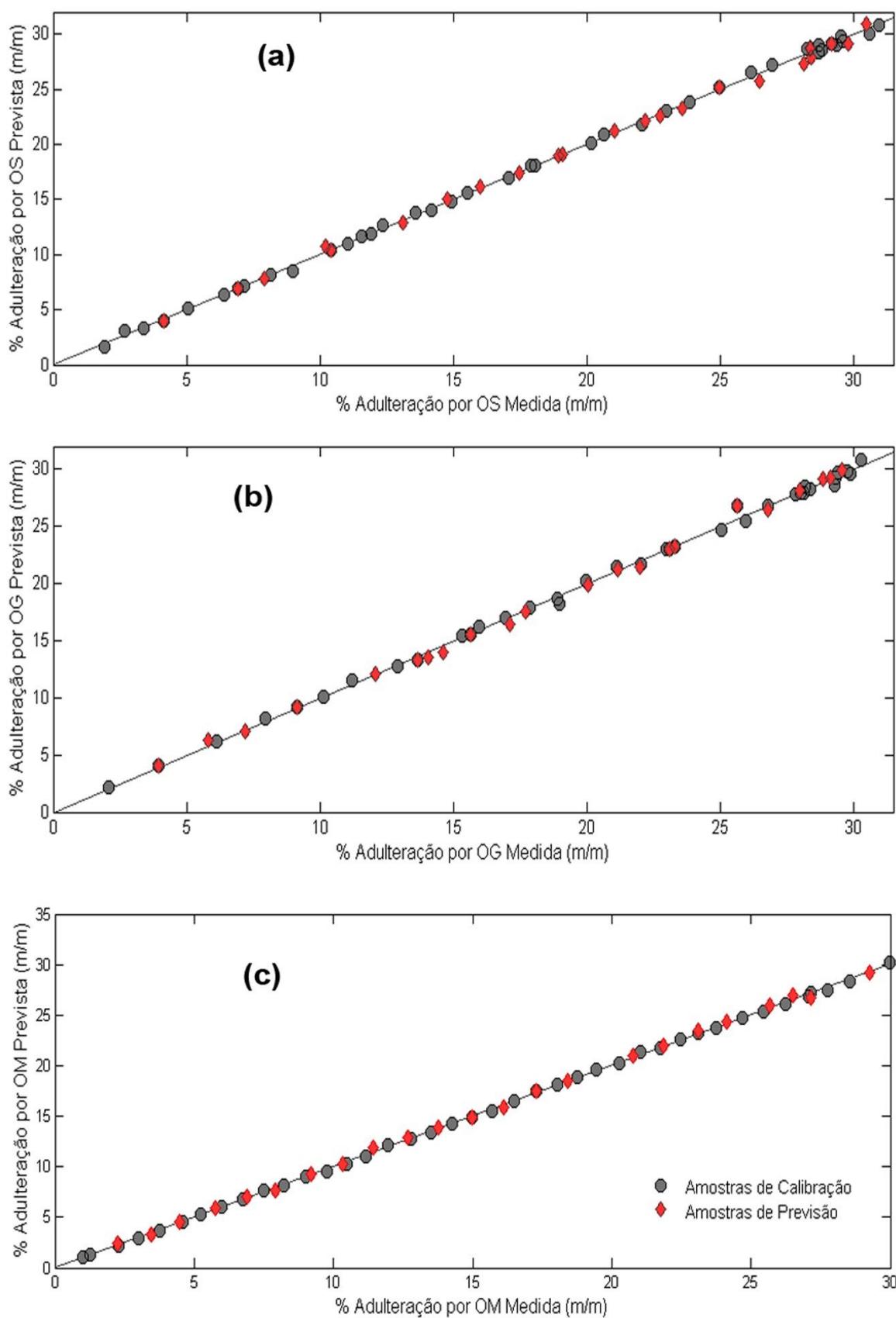
Fonte: o autor.

O ajuste obtido para os modelos PLS são apresentados na Figura 13, relacionando os valores reais de concentração de adulteração por cada um dos óleos com os valores previstos por cada modelo PLS, onde as amostras pertencentes ao grupo de calibração são representadas por  , enquanto as amostras do grupo de previsão são representadas por  .

A equação de reta para a relação pseudo-univariada obtida pelos valores de NAS é apresentada na Figura 14, observou-se boa correlação entre os valores de concentração do óleo adulterante de referência e os valores de NAS calculados para cada amostra.

Em ambas representações gráficas foi possível observar um comportamento linear dos modelos.

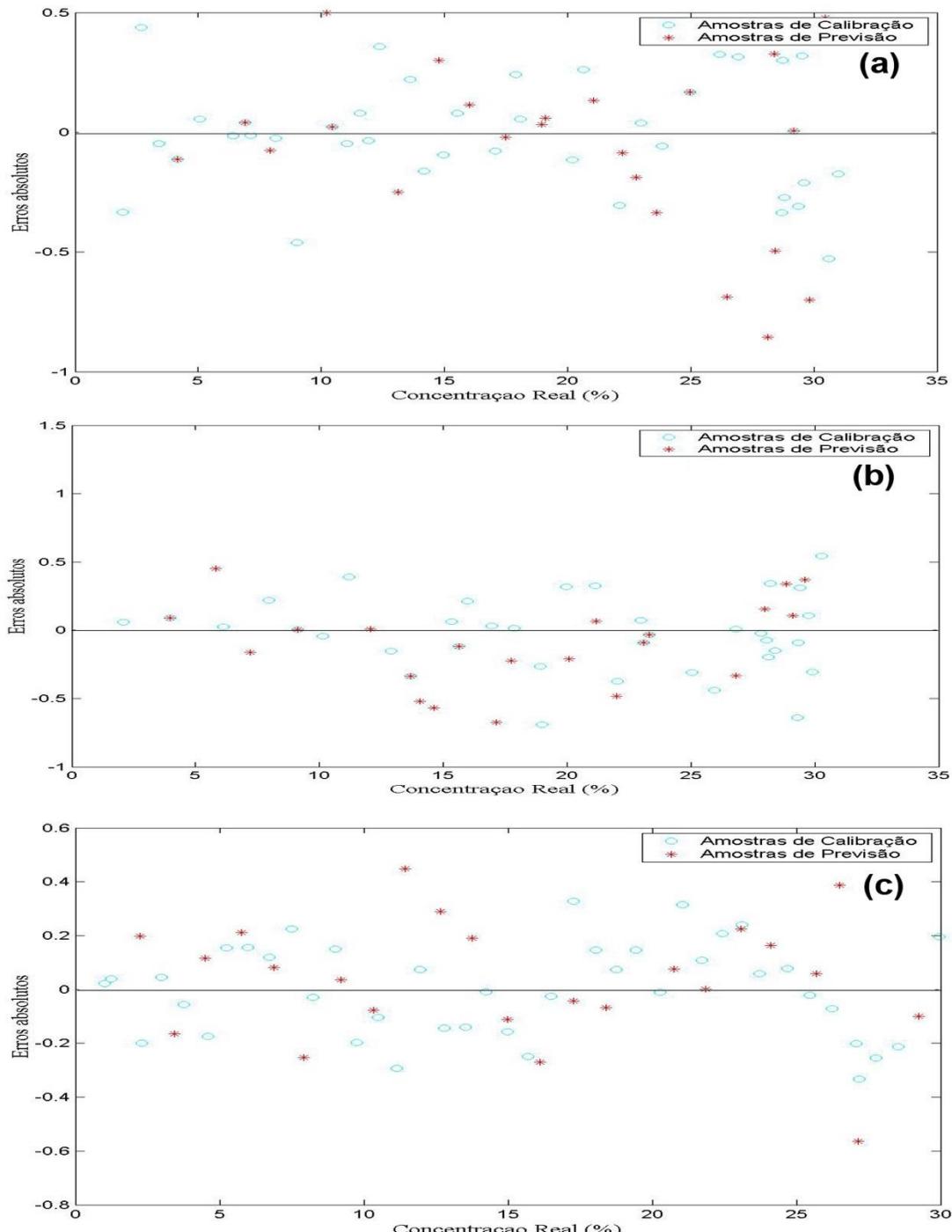
Figura 13 – Ajuste (R) dos modelos PLS (a) Óleo de Linhaça com óleo de soja (b) Óleo de Linhaça com óleo de girassol (c) Óleo de Linhaça com óleo de milho.



Fonte: o autor.

A aleatoriedade dos erros para cada amostra dos modelos PLS OEL são mostradas na Figura 14, pela distribuição dos erros foi possível averiguar a ausência de erros sistemáticos ou tendências nos resultados de previsão, todas as amostras apresentaram erros menores que 1,0%.

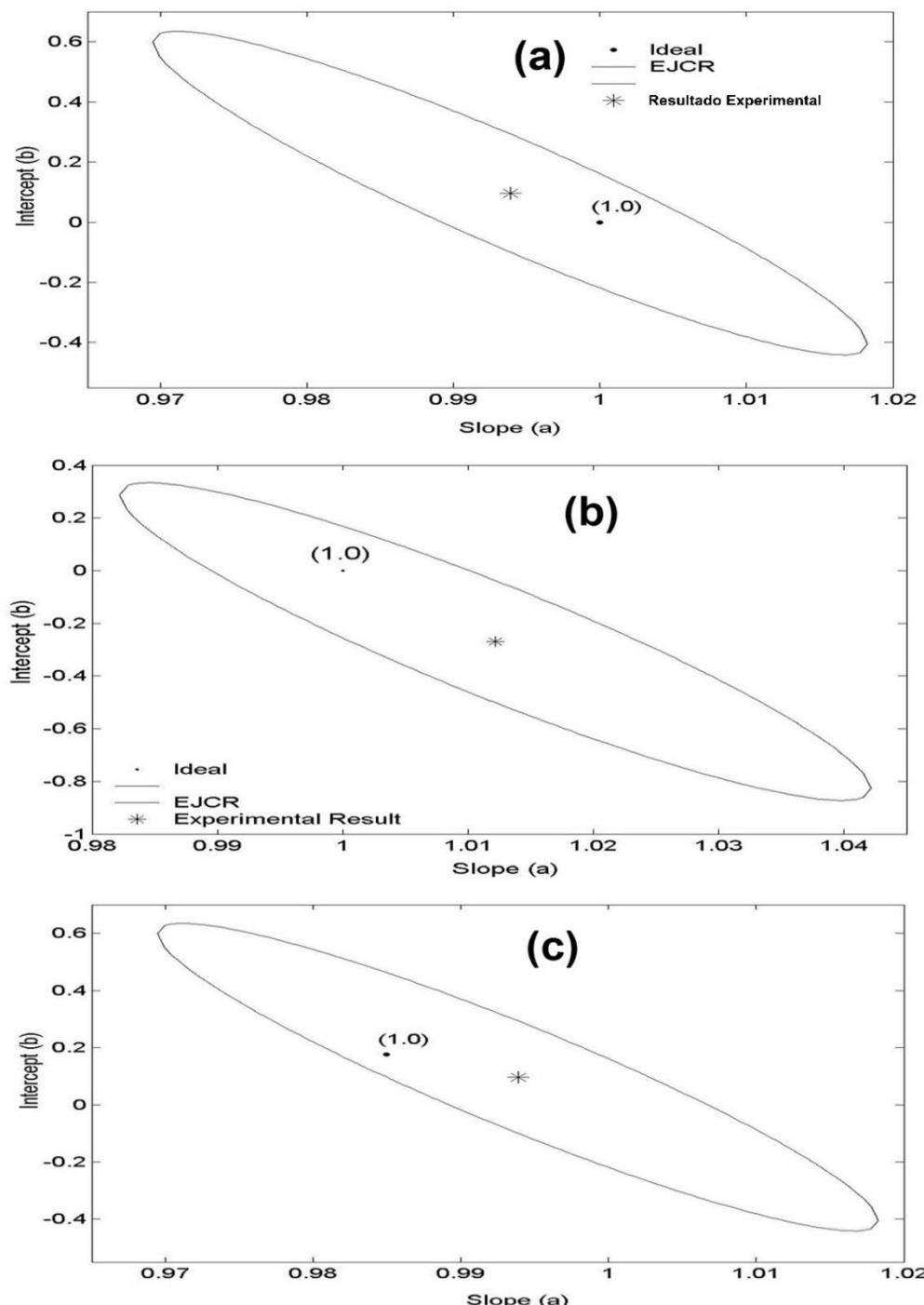
Figura 14 – Análise da aleatoriedade dos erros para amostras dos modelos PLS (a) Óleo de Linhaça com óleo de soja (b) Óleo de Linhaça com óleo de girassol (c) Óleo de Linhaça com óleo de milho.



Fonte: o autor.

A Figura 15, que traz a elipse de confiança para cada modelo PLS OEL evidencia que todos se encontram dentro dos limites de confiança de 95%, representados pelos limites da elipse, o valor ótimo (1,0) é representado por (•) enquanto os valores obtidos pelos modelos PLS são representados por (*).

Figura 15 – Elipse de confiança para os modelos PLS (a) Óleo de Linhaça com óleo de soja (b) Óleo de Linhaça com óleo de girassol (c) Óleo de Linhaça com óleo de milho.



Fonte: o autor.

A Tabela 8 apresenta os valores de figuras de mérito para os modelos PLS e PLS2 construídos para quantificação de adulterações em OEL.

Tabela 8 - Valores de figuras de mérito para os modelos PLS e PLS2 construídos para quantificação de adulterações em OEL por OS e/ou OG e OM.

Valores para PLS e PLS2				Parâmetros	Figuras de Mérito
PLS OEL+OS	PLS OEL+OG	PLS OEL+OM	PLS2 OEL+OS+OG		
0,999	0,998	0,992	0,998/0,995		Ajuste (R)
0,34	0,23	0,14	0,54	RMSEC (%)	
0,62	0,57	0,21	0,62	RMSECV (%)	
0,41	0,36	0,23	0,67	RMSEP (%)	Exatidão
0,45	0,39	0,19	0,61	EM (%)	
0,01	0,01	0,08	0,03	% (m/m)	Limite de Detecção
0,026	0,028	0,258	0,031	% (m/m)	Limite de Quantificação
0,02	0,02	0,01	0,036		Seletividade
0,11	0,08	0,11	0,11		Sensibilidade
456,34	351,06	348,67	487,51		Sensibilidade Analítica
0,002	0,002	0,002	0,002		Inverso da Sensibilidade Analítica
				Bias	
0,0292	0,0433	0,049	0,052	Desvio Padrão	
0,37	0,41	0,18	0,26	Graus de	
24	21	22	46	Liberdade	Erros Sistemáticos
0,393	0,492	1,338	0,945	t_{calc}	
2,059	2,079	2,063	1,645	t_{crit}	

Fonte: o autor.

Os modelos PLS foram construídos apresentando uma relação satisfatória entre os valores reais de adulteração e os valores previstos por cada modelo, mostrando valores R superiores a 0,99. De acordo com o teste-t proposto pela norma ASTM E1655-05, como t_{calc} apresentou valores menores que t_{crit} para determinados $n_{\text{prev-1}}$ de liberdade em todos os casos, pode-se deduzir que os modelos PLS construídos para controle de qualidade de OEL não apresentaram erros sistemáticos, o que também pode ser comprovado pela distribuição aleatória dos erros, observada na Figura 14. Todos os modelos PLS e PLS2 apresentaram valores de figuras de mérito aceitáveis, conforme disposto na Tabela 8. De acordo com os valores de LD e LQ calculados, os modelos são capazes de detectar variações de concentração de 0,01%, 0,01% e 0,08%, sendo capaz de quantificar variações da ordem de 0,02%, 0,02% e 0,25% para OS, OG e OM respectivamente. A Tabela 9 expõe um comparativo entre os valores de RMSE para os modelos PLS e PLS2, o pequeno aumento nos valores de erro é justificado pela vantagem da realização de quantificação simultânea de adulterações por OS e OG em amostras de OEL.

Tabela 9 – Comparaçāo entre a eficiēcia obtida nos modelos PLS de quantificaçāo de adulterações e usando PLS2 para classificaçāo simultânea de OS e/ou OG em amostras de OEL.

Parâmetro	PLS1		PLS2	
	OEL+OG	OEL+OS	OEL+OS+OG	Para OS
			Para OG	
Exatidão	RMSEC (% w/w)	0,34	0,23	0,58
	RMSEP (% w/w)	0,41	0,36	0,61
Ajuste (R)		0,998	0,999	0,995
			0,998	

Fonte: o autor.

Os resultados obtidos para as análises de amostras comerciais de OEL das marcas A, B e C (Tabela 10), sugerem adulteração por OS na marca B, em proporção de aproximadamente 8,5% e em C, da ordem de 6,0%, além de apresentar resultados de proporção de OG prevista de 1,65%

em média. As amostras não apresentaram proporções significativas de OM conforme resultados previstos pelos modelos PLS, o que sugere ausência de adulteração por tal óleo refinado.

Tabela 10 – Previsão de adulterações em amostras comerciais de OEL das marcas A, B e C.

Modelo PLS	Apresentação Utilizado (embalagem)	Amostras						
PLS OEL+OS	Frasco vidro âmbar – 250mL	% (m/m) OS em A	0,0	0,02	0,06	0,06	0,02	0,07
	Frasco vidro âmbar – 400mL	% (m/m) OS em B	8,97	8,67	8,55	9,06	8,61	8,58
	Drágeas de 1,2g	% (m/m) OS em C	6,18	6,08	6,12	6,51	6,09	6,21
PLS OEL+OG	Frasco vidro âmbar – 250mL	% (m/m) OG em A	0,01	0,03	0,01	0,0	0,02	0,0
	Frasco vidro âmbar – 400mL	% (m/m) OG em B	0,02	0,01	0,01	0,044	0,0	0,01
	Drágeas de 1,2g	% (m/m) OG em C	1,80	1,72	1,86	2,06	1,82	1,75
PLS OEL+OM	Frasco vidro âmbar – 250mL	% (m/m) OM em A	0,0	0,02	0,06	0,06	0,02	0,07
	Frasco vidro âmbar – 400mL	% (m/m) OM em B	0,0	0,02	0,06	0,06	0,02	0,07
	Drágeas de 1,2g	% (m/m) OM em C	0,0	0,03	0,0	0,02	0,0	0,01

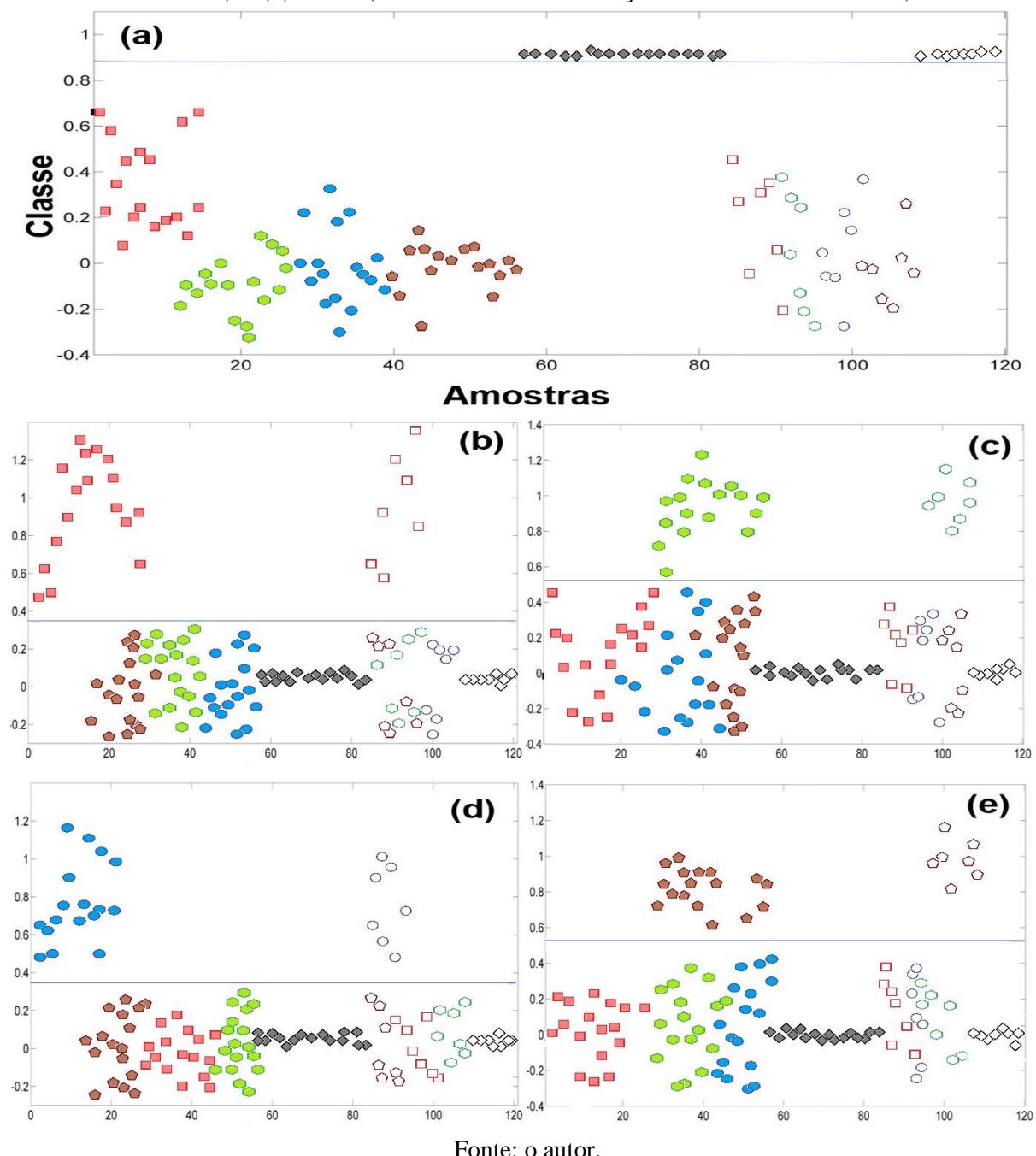
Fonte: o autor.

Observa-se através dos valores obtidos para concentração de óleos adulterantes que a marca B apresentou previsões de proporções de OS e OG superiores à média encontrada no teste cego (1,21% e 1,65%, respectivamente) par todas as 6 amostras, o que sugere presença de adulteração por OS e OG nas amostras da marca coletadas. Já nas amostras da marca C, há indícios de adulteração por OG, de acordo com os elevados valores de adulteração previstos pelo modelo PLS OEL+OG para todas as 6 amostras coletadas.

2.5. Modelos PLS-DA de Detecção de Adulterações por Óleos Refinados em Óleo de Ginkgo Biloba Extravirgem

A Figura 16 apresenta classificação das amostras nos modelos PLS-DA OEG construídos.

Figura 16 – Classes do PLS-DA para (a) OEL puro (\blacklozenge amostras de calibração e \lozenge amostras de teste), (b) OEL adulterado com OS (\blacksquare amostras de calibração e \square amostras de teste) (c) OM (\blacksquare amostras de calibração e \square amostras de teste), (d) OG (\bullet amostras de calibração e \circ amostras de teste) e (d) OMP (\blacksquare amostras de calibração e \square amostras de teste).



Fonte: o autor.

A Tabela 11 traz os resultados obtidos dos modelos PLS-DA, parâmetros de classificação para classificação de adulterações em OEG por OS, OG, OM e OMP, demonstrando que os modelos PLS-DA OEG foram eficientes na classificação das amostras adulteradas e não adulteradas, assim como conseguiu, com eficiência de 100% classificar o óleo adicionado no processo de fraude. Os modelos apresentaram valores de variância da ordem de 99%.

Tabela 11 - Parâmetros de classificação obtidos para modelos PLS-DA de detecção de adulterações em OEG por OS, OG, OM e OMP.

Parâmetros	CLASSE PURO	CLASSE ADULTERADO COM			
	OEG	OS	OG	OM	OMP
Sensibilidade (%)	100	100	100	100	100
Especificidade (%)	100	100	100	100	100
VP	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
FP	0	0	0	0	0
VN	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
FN	0	0	0	0	0
Variância explicada %	99,83	99,72	99,41	99,37	99,76
(X / y)	87,41	89,18	86,40	88,02	86,94
Threshold	0,88	0,37	0,52	0,36	0,53

Fonte: o autor.

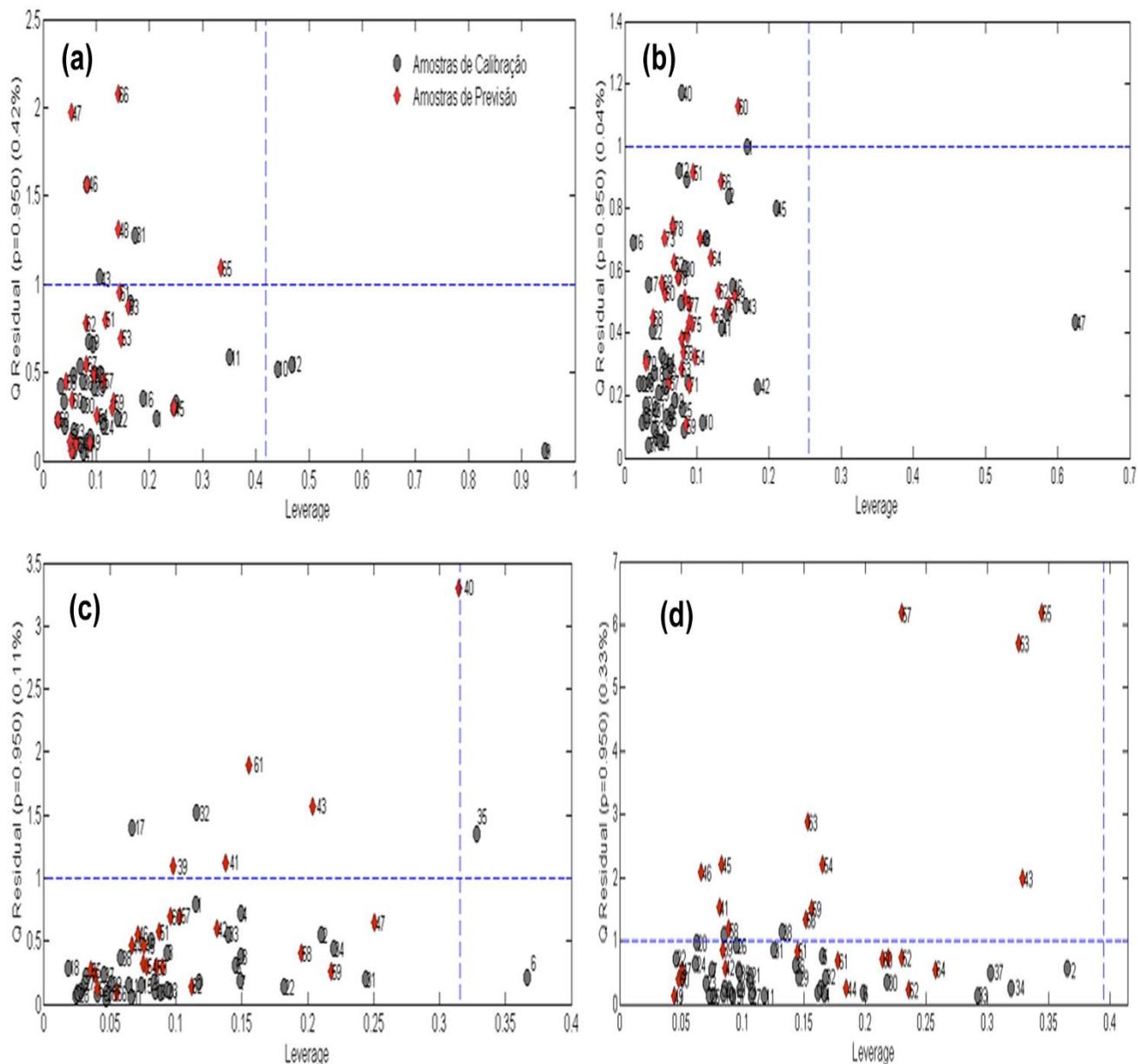
A classificação das amostras de “adulterada” e “não adulterada” obtida para os modelos PLS-DS OEG é apresentada na Figura 16, onde observa-se que as classes diferenciaram corretamente a totalidade das amostras. No entanto, pode-se notar para os modelos PLS-DA OEG+OS (Figura 16b) e PLS-DA OEG+OG (Figura 16c) que as amostras com baixas concentrações (entre 1,0 e 4,0% m/m) de adulteração por OG se posicionaram muito próximas ao threshold. O CCM apresentou valor +1 para todos os modelos, não houve FP ou FN.

2.6. Modelos PLS de Quantificação de Adulterações por Óleos Refinados em Óleo de Ginkgo Biloba

O teste para outliers de cada modelo é apresentado na Figura 18. Apenas no modelo PLS OEG+OM foram detectadas amostras anômalas, duas amostras foram retiradas. Os modelos PLS foram construídos apresentando uma relação satisfatória entre os valores reais de adulteração e os valores previstos por cada modelo, mostrando valores R superiores a 0,99 (Figura 19). Nenhuma amostra do grupo de calibração foi considerada anômala por meio da análise dos valores de resíduos não modelados por valores de leverage para um limite de confiança de 95% para cada amostra.

A Figura 17 traz a avaliação da presença de amostras anômalas para os modelos PLS OEG construídos, amostras pertencentes ao grupo de calibração são representadas por  , enquanto as amostras do grupo de previsão são representadas por .

Figura 17 - Leverage x Qresidual (a) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de soja (b) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de girassol (c) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de milho (d) Óleo de Ginkgo biloba com óleo mineral.



Fonte: o autor.

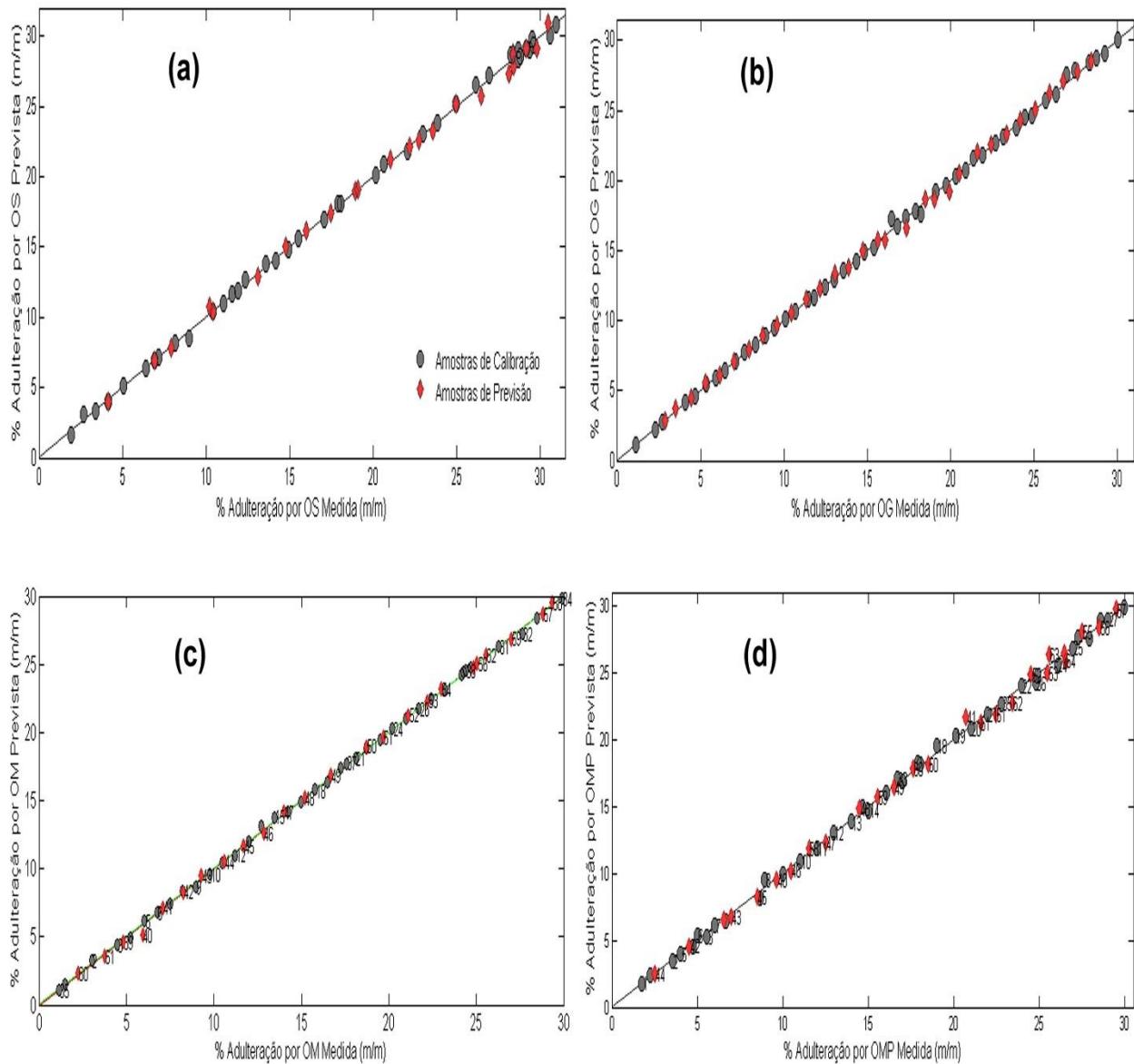
No modelo PLS OEG+OM (Figura 18c) foram detectadas duas amostras com comportamento anômalo, a amostra 35 do grupo de calibração e a amostra 40 do grupo de previsão. Ambas foram retiradas do modelo e o mesmo foi reconstruído, não sendo observados novos outliers pela relação leverage x Q residual.

O ajuste obtido para os modelos PLS OEG é apresentado graficamente na Figura 19, pela relação entre os valores reais de adulteração por óleo e os previstos pelos modelos, todos

apresentaram ajuste satisfatório. Na figura 18, as amostras de calibração são representadas por

- e as amostras de previsão por ◊.

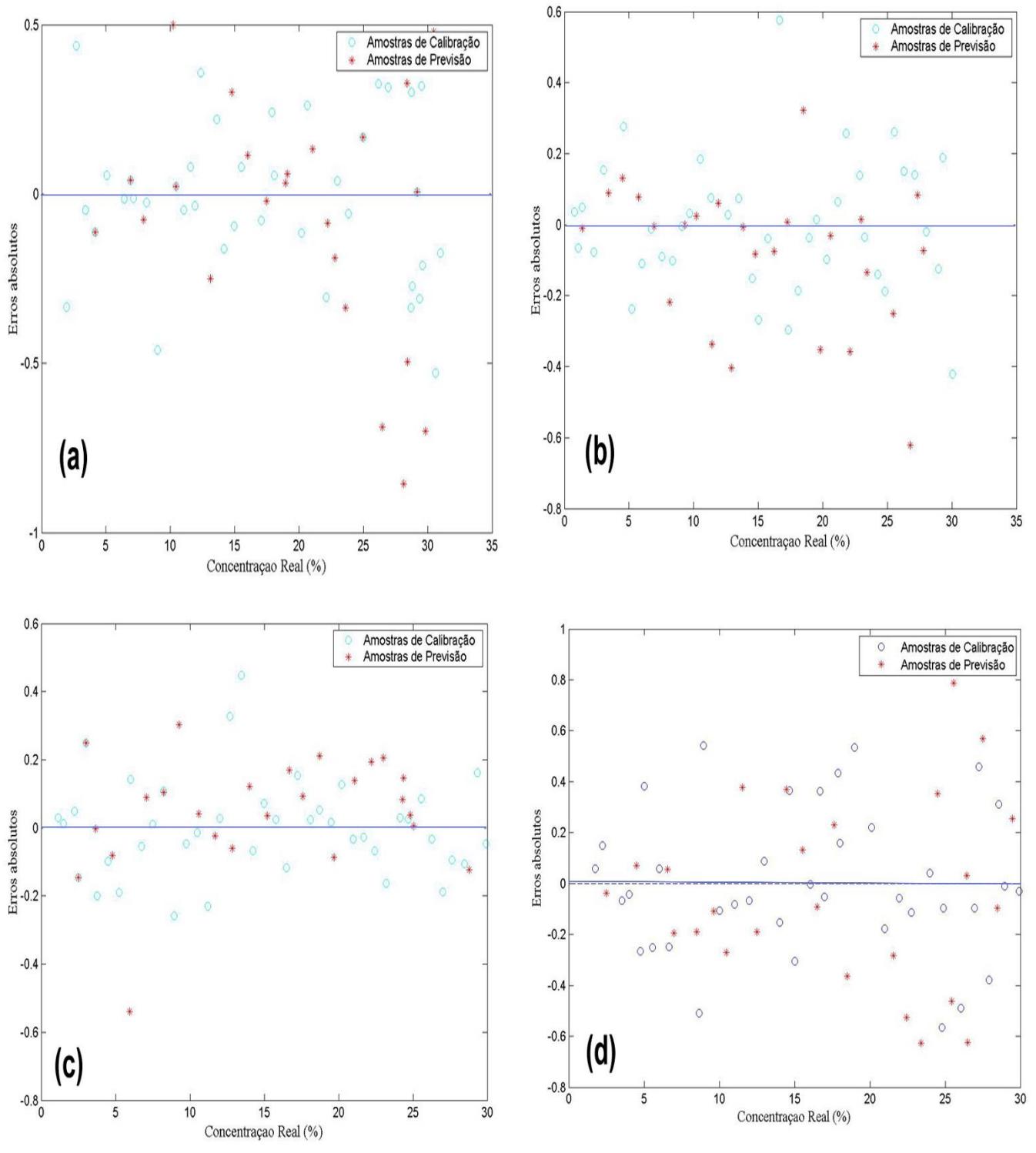
Figura 18 – Ajuste (R) dos modelos PLS (a) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de soja (b) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de girassol (c) Óleo de Ginkgo biloba com óleo de milho (d) Óleo de Ginkgo biloba com óleo mineral.



Fonte: o autor.

A aleatoriedade dos erros das amostras foi avaliada na Figura 19, é possível observar uma disposição randômica dos erros de cada amostra, sendo que para todas, o valor de erro comparado a concentração real de adulteração por óleo foi menor que 1,0%.

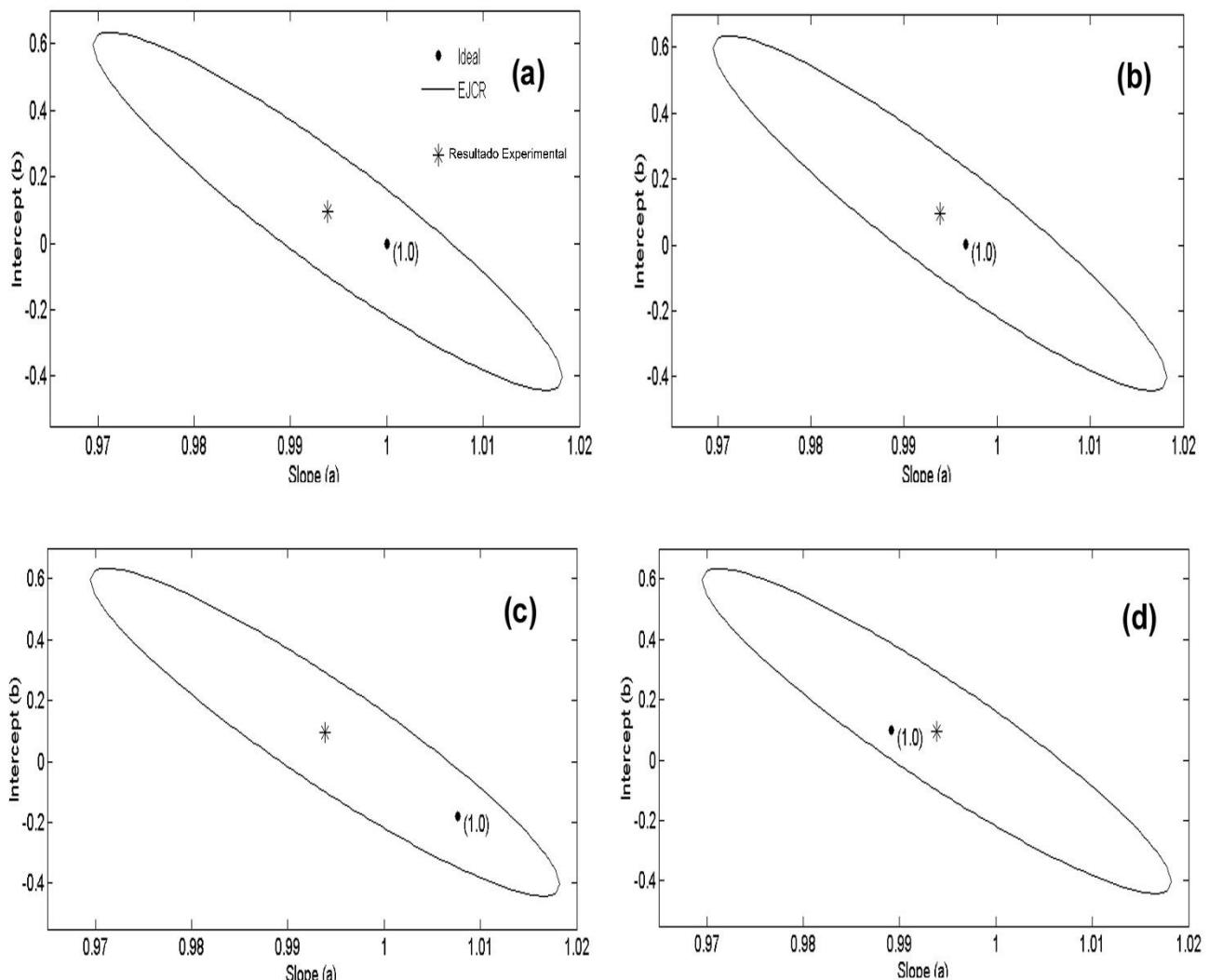
Figura 19 – Análise da aleatoriedade dos erros para amostras dos modelos PLS OEG **(a)** Óleo de Ginkgo biloba com óleo de soja **(b)** Óleo de Ginkgo biloba com óleo de girassol **(c)** Óleo de Ginkgo biloba com óleo de milho **(d)** Óleo de Ginkgo biloba com óleo mineral.



Fonte: o autor.

A elipse de confiança para os modelos PLS OEG é mostrada na Figura 20, os valores para cada modelo PLS se apresentaram localizados dentro dos limites de EJCR, para 95% de confiança.

Figura 20 – Elipse de confiança para os modelos PLS OEG **(a)** Óleo de Ginkgo biloba com óleo de soja **(b)** Óleo de Ginkgo biloba com óleo de girassol **(c)** Óleo de Ginkgo biloba com óleo de milho **(d)** Óleo de Ginkgo biloba com óleo mineral.



Fonte: o autor.

A Tabela 12 apresenta os valores de figuras de mérito para os modelos PLS e PLS2 construídos para quantificação de adulterações em OEG, é possível salientar que todos os modelos PLS e PLS2 apresentaram resultados satisfatórios, com erros RMSE aceitáveis.

Tabela 12 - Valores de figuras de mérito para os modelos PLS e PLS2 construídos para quantificação de adulterações em OEG por OS e/ou OG, OM e OMP.

Valores para PLS e PLS2					Parâmetros	Figuras de Mérito
PLS OEG+OS	PLS OEG+OG	PLS OEG+OM	PLS OEG+OMP	PLS2 OEG+OS+OMP		
0,9979	0,9988	0,9994	0,9916	0,9859 0,9848		Ajuste (R)
0,23	0,20	0,15	0,27	0,40	RMSEC (%)	Exatidão
0,77	0,33	0,24	0,37	0,81	RMSECV (%)	
0,36	0,26	0,20	0,39	0,61	RMSEP (%)	
0,46	0,52	0,39	0,64	0,83	EM (%)	
0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	% (m/m)	Limite de Detecção
0,02	0,02	0,02	0,04	0,06	% (m/m)	Limite de Quantificação
0,02	0,04	0,02	0,02	0,04		Seletividade
0,11	0,13	0,12	0,07	0,41		Sensibilidade
456,34	475,93	481,36	274,62	136,65		Sensibilidade Analítica
0,002	0,002	0,002	0,003	0,007		Inverso da Sensibilidade Analítica
0,0199	0,0837	0,0253	0,0043	0,1429	Bias	Erros Sistemáticos
0,3772	0,4381	0,4113	0,4041	0,9830	Desvio Padrão	
24	30	24	21	44	Graus de Liberdade	
0,3932	0,9568	0,4561	0,0543	1,023	t_{calc}	
2,0595	1,645	2,0595	2,0555	1,645	t_{crit}	

Fonte: o autor.

Os valores de LD e LQ calculados indicam que os modelos PLS construídos são capazes de detectar variações de concentração de 0,01% de óleo adulterante e quantificar variações da ordem de 0,02%, 0,02% , 0,02% e 0,04% para OS, OG, OM e OMP respectivamente.

Uma comparação entre os parâmetros de eficiência obtidos para os modelos PLS e PLS2

é apresentada na Tabela 13, pode-se notar que, apesar de um pequeno aumento nos valores de erro RMSE, tem-se a vantagem de uma quantificação simultânea de dois adulterantes, OS e OMP.

Tabela 13 – Comparação entre a eficiência obtida nos modelos PLS de quantificação de adulterações e usando PLS2 para classificação simultânea de OS e/ou OG em amostras de OEG.

Parâmetro	PLS1		PLS2	
	OEG+OMP	OEG+OS	OEG+OS+OMP	Para OS
	Para OMP			
RMSEC (% w/w)	0,27	0,23	0,45	0,41
Exatidão				
RMSEP (% w/w)	0,39	0,36	0,64	0,58
Ajuste (R)	0,9916	0,9979	0,9848	0,9859

Fonte: o autor.

O “teste cego” foi realizado, obtendo erro médio de 1,83%, 1,85%, 1,91% e 1,89% para os modelos PLS OEG+OS, OEG+OG, OEG+OM e OEG+OMP, respectivamente. Este parâmetro de erro foi utilizado para avaliar os resultados obtidos para quantificação de adulteração por óleo em amostras reais, através dos modelos PLS OEG construídos. Concentrações previstas com valores superiores ao erro médio calculado no teste cego podem evidenciar possíveis casos de adulteração.

Os modelos PLS construídos para controle de qualidade de OEG não apresentaram erros sistemáticos, o que pode ser deduzido pela análise da distribuição aleatória dos erros, observada na Figura 20. Os ajustes (Figura 19) expressão correlação aceitável entre os valores de proporção de óleo adulterante reais e os previstos por cada modelo, sendo R com valores de 0,99 para todos. Todos os modelos PLS e PLS2 apresentaram valores de figuras de mérito aceitáveis, conforme disposto na Tabela 12.

A Tabela 14 expõe os valores obtidos para a aplicação da metodologia a amostras comerciais de OEG D e E, ambas vendidas no formato de drágeas.

Tabela 14 – Previsão de adulterações em amostras comerciais de OEG das marcas D e E.

Modelo	Apresentação	Amostras						
PLS	(embalagem)							
Utilizado								
PLS	Drágeas de 1,2g	% (m/m) OS em D	0,0	0,01	0,03	0,04	0,04	0,03
OEG+OS	Drágeas de 1,6g	% (m/m) OS em E	0,0	0,01	0,03	0,04	0,04	0,03
PLS	Drágeas de 1,2g	% (m/m) OG em D	0,01	0,03	0,01	0,0	0,02	0,0
OEG+OG	Drágeas de 1,6g	% (m/m) OG em E	0,02	0,01	0,01	0,02	0,04	0,01
PLS	Drágeas de 1,2g	% (m/m) OM em D	0,0	0,08	0,0	0,06	0,02	0,06
OEG+OM	Drágeas de 1,6g	% (m/m) OM em E	0,0	0,0	0,06	0,06	0,02	0,07
PLS	Drágeas de 1,2g	% (m/m) OMP em D	2,00	2,02	2,06	2,03	2,01	2,08
OEG+OMP	Drágeas de 1,6g	% (m/m) OMP em E	12,40	13,31	12,88	12,97	13,89	14,12

Fonte: o autor.

Todos os modelos construídos se encontram dentro da região da elipse de confiança, para limites de 95%, assim como valores de figuras de mérito aceitáveis. Tais parâmetros conferem confiabilidade e eficiência a metodologia proposta através dos modelos PLS construídos para controle de qualidade de pureza de OEG.

Com relação a aplicação da metodologia a amostras reais, observa-se que ambas as marcas não apresentaram valores significativos de adulteração por OS e OG, uma vez que o

teste cego apresentou erro médio de previsão da ordem 1,02%, 0,86%, 1,27% e 0,96% para OS, OG, OM e OMP, respectivamente. Com base nos valores previstos pelos modelos PLS para as amostras reais, a presença de OMP foi confirmada em ambas as marcas (D e E), com proporção média de 2,0% para D e 13,0% para a marca E, o que sugere a presença de fraude, uma vez que as drágeas de ambas as marcas são comercializadas como suplemento alimentar com finalidades nutracêuticas.

CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram desenvolvidos métodos baseados na utilização da técnica de espectrometria MIR aliada ao método quimiométrico de quantificação PLS e classificação PLS-DA, com a finalidade de controlar a pureza dos Óleos Extravirgem de Linhaça e Óleos Extravirgem de Ginkgo biloba. Foram também propostos modelos de quantificação simultânea de dois óleos vegetais adulterantes nas amostras.

De acordo com os resultados apresentados, constatou-se que os modelos de calibração por PLS, PLS2 apresentaram valores de erros satisfatórios abaixo de 10%, com exigido pela legislação vigente, alta linearidade e eficiência na previsão das concentrações das amostras. Os modelos PLS-DA por sua vez, foram eficientes em classificar corretamente amostras adulteradas e não adulteradas, classificando em 100%. Os modelos de quantificação PLS2 apresentam vantagem em relação ao PLS, no entanto, observou-se que ao construir modelos de quantificação simultânea com 3 ou mais propriedades de interesse, os mesmos apresentaram valores de erros e RMSE muito superiores ao PLS, não se tornando assim uma alternativa viável.

Os métodos propostos se configuram como uma alternativa viável no controle de qualidade de Óleos Extravirgem comercializados com benefícios nutracêuticos, como o Óleo Extravirgem de Linhaça e o Óleo Extravirgem de Ginkgo biloba, uma vez que a pureza destes é de essencial relevância para garantir seus efeitos benéficos e metabólicos. Assim, tais métodos aqui propostos, podem vir a ser empregados na indústria e em órgãos de fiscalização e controle de qualidade, com a finalidade de identificar falsificações e fraudes destes produtos, já que trata-se de uma técnica rápida, de amostragem direta, não destrutiva, sem geração de resíduos ou uso de reagentes, garantindo assim a integridade das amostras que poderão ser novamente analisadas ou comercializadas, além de utilizar um volume reduzido da amostra (cerca de 0,5mL por análise). No mais, com o uso de equipamentos de infravermelho médio portáteis,

cria-se a possibilidade de que as análises sejam realizadas no local de comercialização ou na produção industrial, tornando-se um método “in-situ”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT, N. B. **Biodiesel - Determination of biodiesel content in diesel fuel oil by mid infrared spectroscopy.** backward ABNT NBR 15568:2008 2008a.
- AL-YAHYA, A. A.; Al-Majed, A.A.; Al-Bekairi, A.M.; Al-Shabanah, O.A.; Qureshi, S. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of Ginkgo Biloba in Swiss albino mice. **J Ethnopharmacol**, v. 107, n. 2, p. 222-228, setembro 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.014>
PMid:16624513
- ALMEIDA, M. R.; FIDELIS, C. H.; BARATA, L. E.; POPPI, R. J. Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. **Talanta**, Londres, v. 117, p. 305-311, dezembro 2013. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.025>
PMid:24209345
- ALVES, J.D.E, O. et al. Extra virgin (EV) and ordinary (ON) olive oils: distinction and detection of adulteration (EV with ON) as determined by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry and chemometric approaches. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 24, n. 13, p. 1875-80, julho 2010.
- ANDERSEN, A. H. et al. Partial least squares for discrimination in fMRI data. **Magn Reson Imaging**, v. 30, n. 3, p. 446-52, abril 2012.
- ANDRADE, J. M. et al. A review of the main factors influencing the FT-IR-PLS abilities exemplified with petrochemical qualimetric applications. **Talanta**, v. 44, p. 2167–2184, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00034-9)
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999** D.O.U. - DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO; PODER EXECUTIVO, Brasil 1999.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC 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. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/82d8d2804a9b68849647d64600696f00/RD_C_n_270.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 16 maio 2017.
- APETREI, C. Novel method based on polypyrrole-modified sensors and emulsions for the evaluation of bitterness in extra virgin olive oils. **Food Research International**, Barkingv. 48, n. 2, p. 673-680, junho 2012.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry. **Anal Chimica Acta**, v. 596, n. 2, p. 330-337, julho 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.028>
PMid:17631115

AZZOUZ, T. et al. Comparison between different data pre-treatment methods in the analysis of forage samples using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and partial least-squares multivariate calibration method. **Analytica Chimica Acta**, v. 484, n. 1, p. 121-134, 2003.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00308-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00308-8)

BALABIN, R. M.; SMIRNOV, S. V. Melamine detection by mid- and near-infrared (MIR/NIR) spectroscopy: a quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder. **Talanta**, Londres, v. 85, n. 1, p. 562-568, julho 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.026>
PMid:21645742

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, p. 166-173, 2003. <https://doi.org/10.1002/cem.785>

BOOKER, A. et al. Adulteration and poor quality of Ginkgo biloba supplements. **Journal of Herbal Medicine**, v. 6, n. 2, p. 79-87, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2016.04.003>

BORGES NETO, W. **Parametros de qualidade de lubrificantes e óleo de oliva através de espectroscopia vibracional, calibração multivariada e seleção de variáveis**. 2005. (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP.

BOTELHO, B. G. et al. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chem**, v. 181, p. 31-7, agosto 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.077>
PMid:25794717

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600027>

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Quim. Nova**, v. 7, p. 85 - 99, 1985.

CANEVELLI, M. et al. Effects of Gingko biloba supplementation in Alzheimer's disease patients receiving cholinesterase inhibitors: data from the ICTUS study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 6, p. 888-92, maio 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.01.003>
PMid:24548724

CASALE, M.; OLIVERI, P.; CASOLINO, C.; SINELLI, N.; ZUNIN, P.; ARMANINO, C.; FORINA, M. LANTERI, S. Characterisation of PDO olive oil Chianti Classico by non-selective (UV-visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical techniques. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 712, p. 56-63, janeiro 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.015>
PMid:22177065

CEBEKI MALTAS, D. et al. Rapid classification of pharmaceutical ingredients with Raman spectroscopy using compressive detection strategy with PLS-DA multivariate filters. **J Pharm Biomed Anal**, v. 80, p. 63-8, junho 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.029>
PMid:23531679

CHANDRA, A. et al. Qualitative categorization of supplement grade Ginkgo biloba leaf extracts for authenticity. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 2, p. 107-114, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.03.004>

CHONG, I. G.; JUN, C. H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 78, n. 1-2, p. 103-112, julho 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.011>

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 481-487, abril 2007.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200042>

CSERHATI, T. et al. Chromatography in authenticity and traceability tests of vegetable oils and dairy products: a review. **Biomed Chromatogr**, v. 19, n. 3, p. 183-90, abril 2005.
<https://doi.org/10.1002/bmc.486>
PMid:15803455

DABROSIN, C. et al. Flaxseed inhibits metastasis and decreases extracellular vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts. **Cancer Letters** v. 185, p. 31–37, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00239-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00239-2)

DE ALMEIDA, M. R. et al. Discrimination between authentic and counterfeit banknotes using Raman spectroscopy and PLS-DA with uncertainty estimation. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 170-177, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.006>

DE LA MATA, P.; DOMINGUEZ-VIDAL, A.; BOSQUE-SENDRA, J. M.; RUIZ-MEDINA, A.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; AYORA-CAÑADA, M. J. Olive oil assessment in edible oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics. **Food Control**, Guildford, v. 23, n. 2, p. 449-455, fevereiro 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.013>

DE VASCONCELOS, F. V. et al. Using near-infrared overtone regions to determine biodiesel content and adulteration of diesel/biodiesel blends with vegetable oils. **Anal Chimica Acta**, v. 716, p. 101-7, fevereiro 24 2012. ISSN 1873-4324

DIAMOND, B. J.; BAILEY, M. R. Ginkgo biloba: indications, mechanisms, and safety. **Psychiatr Clin North Am**, v. 36, n. 1, p. 73-83, março 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.psc.2012.12.006>
PMid:23538078

DIXIT, S.; KANAKRAJ, S.; REHMAN, A. Linseed oil as a potential resource for bio-diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 7, p. 4415-4421, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.04.042>

DO, T. K. T. et al. Authenticity of essential oils. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 146-157, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.007>

DUPUY, N.; GALTIER, O.; OLLIVIER, D.; VANLOOT, P.; ARTAUD, J. Comparison between NIR, MIR, concatenated NIR and MIR analysis and hierarchical PLS model. Application to virgin olive oil analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 666, n. 1-2, p. 23-31, maio 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.034>
PMid:20433960

EILATI, E. et al. Flaxseed enriched diet-mediated reduction in ovarian cancer severity is correlated to the reduction of prostaglandin E(2) in laying hen ovaries. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 89, n. 4, p. 179-87, setembro 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.08.001>
PMid:23978451 PMCid:PMC3811136

ELZEY, B.; POLLARD, D.; FAKAYODE, S. O. Determination of adulterated neem and flaxseed oil compositions by FTIR spectroscopy and multivariate regression analysis. **Food Control**, v. 68, p. 303-309, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.008>

FERNANDES, D. D. et al. Determination of biodiesel content in biodiesel/diesel blends using NIR and visible spectroscopy with variable selection. **Talanta**, v. 87, p. 30-4, dezembro 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.09.025>
PMid:22099644

FERRÉ, J. et al. Figures of merit in multivariate calibration. Determination of four pesticides in water by flow injection analysis and spectrophotometric detection **Analytica Chimica Acta** v. 348, p. 167 - 175, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00156-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00156-6)

FERRÉ, J.; FABER, N. M. Net analyte signal calculation for multivariate calibration. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 69, n. 1-2, p. 123-136, 2003.
[https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(03\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(03)00118-7)

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. **Quim. Nova**, v. 22, n. 5, p. 724 - 731, 1999.

FIGUEIREDO, M. S. et al. Flaxseed secoisolariciresinol diglucoside (SDG) during lactation improves bone metabolism in offspring at adulthood. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 161-171, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.021>

FILHO, A. D. C.; FAKOURY, M. K.; FERRY, F. R. D. A. Ginkgo biloba e memória - revisão sistemática. **REV. BRAS. GERIATR. GERONTOL.**, v. 13, n. 1, p. 145-152, 2010.

FITZL, G. et al. Protective effects of Gingko biloba extract EGb 761 on myocardium of experimentally diabetic rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 51, n. 3, p. 189-198, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(99\)80093-1](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(99)80093-1)

FORINA, M.; LANTERI, S.; CASALE, M. Multivariate calibration. **J Chromatogr A**, v. 1158, n. 1-2, p. 61-93, julho 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.082>
PMid:17420021

GONTIJO, L. C. et al. Quantification of soybean biodiesels in diesel blends according to ASTM E1655 using mid-infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Fuel**, v. 117, p. 1111-1114, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.10.043>

GONZALEZ-SARRIAS, A.; LARROSA, M.; GARCIA-CONEZA, M. T.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ESPIN, J. C. Nutraceuticals for older people: facts, fictions and gaps in knowledge. **Maturitas**, Amsterdam, v. 75, n. 4, p. 313-334, agosto 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.05.006>
PMid:23791247

GUILLÉN, M. A. D.; RUIZ, A. High resolution ^1H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 12, n. 9, p. 328-338, setembro 2001. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00101-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00101-7)

GROMADZKA, J.; WARDENCKI, W. Trends in Edible Vegetable Oils Analysis. Part B. Application of Different Analytical Techniques. **Pol. J. Food Nutr. Sci.**, v. 61, n. 2, p. 89-99 2011. <https://doi.org/10.2478/v10222-011-0009-5>

GURDENIZ, G.; OZEN, B. Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 519-525, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.068>

HU, C.; YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 11, p. 2219-27, novembro 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.05.017>

PMid:17624649

INMETRO. DOQ-CGCRE-008, ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS 2007.

ÍÑÓN, F. A.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, n. 2, p. 401-412, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.014>

ISMAIL, A. F.; EL-SONBATY, S. M. Fermentation enhances *Ginkgo biloba* protective role on gamma-irradiation induced neuroinflammatory gene expression and stress hormones in rat brain. **J Photochem Photobiol B**, v. 158, p. 154-63, maio 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.001>

PMid:23768346

JANGALE, N. M. et al. Dietary flaxseed oil and fish oil modulates expression of antioxidant and inflammatory genes with alleviation of protein glycation status and inflammation in liver of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Food Chem**, v. 141, n. 1, p. 187-95, novembro 2013.

JOHNSSON, P. **Bioactive Phytochemicals in Flaxseed With Particular Emphasis on the Secoisolariciresinol Oligomer**. 2009 76p. (Doutorado). Swedish University of Agricultural Sciences Swedish University of Agricultural Sciences Sweden.

JONG, S. T. SIMPLS: an alternative approach to partial least squares regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 18, p. 251 - 263, 1993.
[https://doi.org/10.1016/0169-7439\(93\)85002-X](https://doi.org/10.1016/0169-7439(93)85002-X)

KALUZA, J. et al. Diet quality and mortality: a population-based prospective study of men. **Eur J Clin Nutr**, v. 63, n. 4, p. 451-7, abril 2009.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602968>
PMid:18059415

KARTHEEK, M. et al. Determination of Adulterants in Food: A Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 629 - 636, 2011.

LANKMAYR, E.; MOCAK, J.; SERDT, K.; BALLA, B.; WENZI, T.; BANDONIENE, D.; GFRERER, M.; WAGNER, S. Chemometrical classification of pumpkin seed oils using UV-Vis, NIR and FTIR spectra. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 61, n. 1-2, p. 95-106, outubro 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.04.007>
PMid:15560925

LEYVA, D. R. et al. The effect of dietary flaxseed on improving symptoms of cardiovascular disease in patients with peripheral artery disease: rationale and design of the FLAX-PAD randomized controlled trial. **Contemp Clin Trials**, v. 32, n. 5, p. 724-30, setembro 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.cct.2011.05.005>
PMid:21616170

LORBER, A.; FABER, K.; KOWALSKI, B. R. Net Analyte Signal Calculation in Multivariate Calibration. **Anal. Chem.**, v. 69, p. 1620-1626, 1997.
<https://doi.org/10.1021/ac960862b>

LOPEZ-GUTIERREZ, N. et al. Quality control evaluation of nutraceutical products from Ginkgo biloba using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 121, p. 151-60, março 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.021>
PMid:26808064

Ministério da Saúde; ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 02, DE 07 DE JANEIRO DE 2002**. Brasil 2002.

MAHADEVAN, S.; PARK, Y. Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: chemistry, efficacy, safety, and uses. **J Food Sci**, v. 73, n. 1, p. R14-9, janeiro 2008.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00597.x>
PMid:18211362

MARBACH, R.; HEISE, H. M. Calibration Modeling by Partial Least-Squares and Principal Component Regression and its Optimization Using an Improved Leverage Correction for Prediction Testing. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 9, n. 45 - 63, 1990.

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

MASON, J. K.; CHEN, J.; THOMPSON, L. U. Flaxseed oil-trastuzumab interaction in breast cancer. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 8-9, p. 2223-6, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.052>

PMid:20580760

MAURER, K. et al. Clinical efficacy of Ginkgo biloba special extract EGb 761 in dementia of the Alzheimer type. **Phytomedicine**, v. 5, n. 6, p. 417-424, 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80037-8](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80037-8)

MEHMOOD, T.; LILAND, K. H.; SNIPEN, L.; SÆBØ, S. A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 118, p. 62-69, agosto 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.07.010>

MIAO, M. et al. Structure and functional properties of starches from Chinese ginkgo (Ginkgo biloba L.) nuts. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 303-310, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.038>

MILDNER-SZKUDLARZ, S.; JELEN, H. H. The potential of different techniques for volatile compounds analysis coupled with PCA for the detection of the adulteration of olive oil with hazelnut oil. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 751-761, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.053>

MOLENA-FERNANDES, C. A. et al. Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 12, n. 2, p. 201-207, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S1516-0572201000200012>

MONTEIRO, E. O.; MARIN, C. T. Alimentos Funcionais. **Moreira JR Grupo Editorial**, v. 67, n. 1, p. 1 - 7, 2015.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS: DEFINIÇÕES, LEGISLAÇÃO E BENEFÍCIOS À SAÚDE. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, c2006. ISSN 1808-0804.

MORALES, A.; MARMESAT, S.; RUIZ-MÉNDEZ, M. V.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; VELASCO, J. Formation of oxidation products in edible vegetable oils analyzed as FAME derivatives by HPLC-UV-ELSD. **Food Research International**, v. 62, p. 1080-1086, maio 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.063>

MÜLLER, A. L. H. et al. Attenuated total reflectance with Fourier transform infrared spectroscopy (ATR/FTIR) and different PLS Algorithms for simultaneous determination of clavulanic acid and amoxicillin in powder pharmaceutical formulation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1903-1912, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001000011>

NAKANISHI, K. Terpene trilactones from Gingko biloba: from ancient times to the 21st century. **Bioorg Med Chem**, v. 13, n. 17, p. 4987-5000, Sep 01 2005. ISSN 0968-0896 (Print) 0968-0896 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15990319>>.

NAWROCKA, A.; LAMORSK, J. **Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods.** 2013.

NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 ANOS DE QUIMIOMETRIA NO BRASIL. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401 - 1406, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600042>

NICOLAÏ, B. M. et al. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 99-118, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.024>

NOGUEIRA, G. F. et al. A IMPORTÂNCIA DA LINHAÇA COMO ALIMENTO FUNCIONAL E SUA UTILIZAÇÃO POR UNIVERSITÁRIOS DO CENTRO UNIVERSITÁRIO AMPARENSE. **UNIFIA**, v. 10, p. 1-15, 2010.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, N. **Tabela brasileira de composição de alimentos** CAMPINAS., U.-U. E. D. Brasil 2011.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Flaxseed proteins-a review **Food Chemistry** v. 48, p. 109-114 1993. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90043-F](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90043-F)

OSKOUEI, D. S. et al. The effect of Ginkgo biloba on functional outcome of patients with acute ischemic stroke: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 22, n. 8, p. 557-563, novembro 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.06.010>

PMid:23871729

PEREIRA, A. F. C. et al. NIR spectrometric determination of quality parameters in vegetable oils using iPLS and variable selection. **Food Research International**, v. 41, n. 4, p. 341-348, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.013>

PILAR, B. C. et al. 28-days dietary supplementation with golden flaxseed improves biochemical and oxidative parameters in patients with metabolic syndrome. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 232-242, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.020>

POSSI, R. J.; BRAGA, J. W.; VALDERRAMA, P. ESTADO DA ARTE DE FIGURAS DE MÉRITO EM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA. **Quim. Nova**, v. Vol. 32, n. No. 5, p. 1278-1287, 2009a.

QUIÑONES-ISLAS, N. et al. Detection of adulterants in avocado oil by Mid-FTIR spectroscopy and multivariate analysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 148-154, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.037>

ROCHA, W. F.; NOGUEIRA, R.; VAZ, B. G. Validation of model of multivariate calibration: an application to the determination of biodiesel blend levels in diesel by nearinfrared spectroscopy. **Journal of Chemometrics**, v. 26, n. 8-9, p. 456-461, 2012.

<https://doi.org/10.1002/cem.2420>

ROHMAN, A.; CHE MAN, Y. B. The use of Fourier transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy for detection and quantification of adulteration in virgin coconut oil. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 583-588, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.070>

SANTANA, F. B. D. Uso De Espectroscopia no Infravermelho Médio e Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais na Determinação De Adulterações Em Óleos de Andiroba, Prímula e Rosa Mosqueta. 2015. 79 (mestrado). Instituto De Química Programa De Pós-Graduação Em Química, Universidade Federal De Uberlândia, Brasil.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. **Food Chem**, v. 138, n. 1, p. 19-24, maio 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.024>
PMid:23265450

SEZGIN, Z.; DINÇER, Y. Alzheimer's disease and epigenetic diet. **Neurochem Int**, v. 78, p. 105-16, dezembro 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.09.012>
PMid:25290336

SHEALY, C. E. Flaxseed Oil. p. Natural Medicine Comprehensive Database Web site, 2003. Disponível em: < <http://www.natural database.com/> >. Acesso em: janeiro de 2016.

SILVA, M. A. et al. Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 89, p. 342-51, Jan 30 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.039>
PMid:22284501

SOUZA, L. M. Uso de espectroscopia no infravermelho médio, calibração multivariada e seleção de variáveis na quantificação de adulterantes em biodiesel e suas misturas com diesel. 2014. 102p. (mestrado). Instituto De Química Programa De Pós-Graduação Em Química, Universidade Federal De Uberlândia, Brasil.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; STANLEY, R. C. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8 ed. norte-americana. São Paulo, Ed. Cengage Learning, 2007.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 145-196, 2006.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W.; 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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 8331–8338, 2007.

<https://doi.org/10.1021/jf071538s>
PMid:17927144

WISE, B. M.; GALLAGHER, N. B.; BRO, R.; SHAVER, J. M.; WINDIG, W.; KOCH, R. S. **PLS_Toolbox 4.0 for use with MATLAB™**. Wenatchee: Eigenvector Research Inc., 2006.

WOLD, S.; SJOSTROM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, p. 109–130, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)

WORLEY, B.; HALOUSKA, S.; POWERS, R. Utilities for quantifying separation in PCA/PLS-DA scores plots. **Anal Biochem**, v. 433, n. 2, 102-104, fevereiro 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.011>
PMid:23079505 PMCid:PMC3534867

WU, Y. W.; SUN, S. Q.; ZHOU, Q.; LEUNG, H. W. Fourier transform mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid quality assessment of Chinese medicine preparation Honghua Oil. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 46, n. 3, 498-504, fevereiro 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.021>
PMid:18180127

XU, L. et al. Rapid discrimination of pork in Halal and non-Halal Chinese ham sausages by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics. **Meat Sci**, v. 92, n. 4, 506-510, dezembro 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.05.019>
PMid:22726700

YANG, H.; IRUDAYARAJ, J.; PARADKAR, M. Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, 25-32, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.039>

YUAN, Q. et al. Effects of Ginkgo biloba on dementia: An overview of systematic reviews. **J Ethnopharmacol**, v. 195, p. 1-9, janeiro 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.005>
PMid:27940086

ZHANG, W.-B. Review on analysis of biodiesel with infrared spectroscopy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, 6048-6058, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.07.003>