

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

Júnia de Oliveira Alves

ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY (ESI-MS)  
E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS: CARACTERIZAÇÃO DE AZEITES DE OLIVA  
(EXTRA VIRGEM E PURO) E OUTROS ÓLEOS VEGETAIS E QUANTIFICAÇÃO  
DE ÓLEOS ADULTERANTES EM AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM

Belo Horizonte  
2010

UFMG/ICEx/DQ 804<sup>a</sup>

D. 469<sup>a</sup>

Júnia de Oliveira Alves

ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY (ESI-MS)  
E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS: CARACTERIZAÇÃO DE AZEITES DE OLIVA  
(EXTRA VIRGEM E PURO) E OUTROS ÓLEOS VEGETAIS E QUANTIFICAÇÃO  
DE ÓLEOS ADULTERANTES EM AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM

Dissertação apresentada ao Departamento  
de Química do Instituto de Ciências Exatas  
da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre em Química –Química  
Analítica.

Belo Horizonte

2010

Alves, Júnia de Oliveira

A474e      Espectrometria de massas com ionização electrospray  
2010      (ESI-MS) e métodos quimiométricos: caracterização de  
D      azeites de oliva (extra virgem e puro) e outros óleos  
vegetais e quantificação de óleos adulterantes em  
azeite de oliva extra virgem./ Júnia de Oliveira  
Alves. 2010.

x; 80 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti.

Co-Orientador: Waldomiro Borges Neto

Mestrado (Dissertação) - Universidade Federal de  
Minas Gerais. Departamento de Química.  
Bibliografia p.76-80

1.Química analítica - Teses 2.Espectrometria de



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3409-5732  
FAX: 031 - 3409-5711  
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



**"Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray (ESI-MS) e Métodos Quimiométricos: Caracterização de Azeite de Oliva (Extra Virgem e Puro) e outros Óleos Vegetais e Quantificação de Óleos Adulterantes em Azeite de Oliva Extra Virgem"**

**Júnia de Oliveira Alves**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador  
UFMG

Prof. Valmir Fascio Juliano  
UFMG

Profª. Leticia Malta Costa  
UFMG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2010.

A DEUS por me guiar e proteger.  
Aos meus avós Augusto e Risoleta.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a oportunidade de estar aqui e por ter colocado pessoas em minha vida que hoje são insubstituíveis.

Aos meus pais, Jorge José Alves e Maria de Lourdes Oliveira Alves, que são o grande amor da minha vida, eu agradeço pela dedicação, apoio e torcida.

Aos meus queridos irmãos, Juninho e Mariana, eu agradeço pela amizade e companheirismo.

Aos professores que me ensinaram a arte do saber fazer e, desta forma, despertaram em mim o gosto pela ciência.

Ao Prof. Rodinei por ter me recebido tão bem no laboratório. Obrigada pelos valiosos ensinamentos, por todo o carinho, pelo exemplo de vida, dedicação ao trabalho e por ser tão presente e paciente.

Ao Prof. Waldomiro, que também é um exemplo de profissional, eu agradeço pela dedicação em me ensinar e por toda amizade e carinho, principalmente durante o tempo que estive em Uberlândia.

Ao Prof. Valmir eu agradeço pelos conselhos e incentivo em seguir carreira acadêmica. À FAPEMIG EDT PRONEX 479/07 pela compra do equipamento ESI-MS.

Ao meu querido amigo Ravi pelas valiosas discussões sobre quimiometria.

Aos meus amigos Karla, Jaqueline, Glayson, Karol, Serginho, Isabela, Renata, Maria Elisa, Renata, Vanessa, Amauri, Átila e Helvécio pela ótima convivência no laboratório e pelas festinhas de grupo.

Ao meu querido André pelo grande apoio no período que mais precisei.

À Rose por todo carinho e amizade.

Ao pessoal do GEAPA por me considerar parte do grupo.

Aos amigos da físico-química, Raquel, Vinícius, Marco Túlio, Felipe, Luis, Marcelo e Taiane pela sexta do desabafo e pela amizade.

Aos amigos uberlandenses Rodrigo, Paulo, Patrícia e Polyana por todo o carinho.

Aos amigos Jaque, Poly, Liliane, Núbia, Beatriz, Felipe, Mei, Naira, Valéria, Ana, Bruninho, Thiago, Diego, Carioca, Roberta, Gabi e Grazi pela amizade sincera.

Às secretárias Paulete, Kátia e Liliam por toda paciência e ajuda com a parte burocrática do curso.

Ao prof. Humberto pela confiança e amizade no início conturbado do mestrado.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

*“Se não houver frutos  
Valeu a beleza das flores  
Se não houver flores  
Valeu a sombra das folhas  
Se não houver folhas  
Valeu a intenção da semente.”*  
HENFIL, do livro *Diretas Já*

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
<i>1.1 Azeite de oliva</i> .....	<b>3</b>
<i>1.2 Espectrometria de massas: ionização electrospray e analisador ion trap</i> .....	<b>6</b>
<i>1.3 Quimiometria</i> .....	<b>10</b>
<i>1.3.1 Análise de componentes principais – PCA</i> .....	<b>10</b>
<i>1.3.2 Análise hierárquica de agrupamentos – HCA</i> .....	<b>14</b>
1.3.2.1 Método de ligação simples.....	<b>16</b>
1.3.2.2 Método de ligação completa.....	<b>16</b>
1.3.2.3 Método da média das distâncias.....	<b>17</b>
1.3.2.4 Método do centróide.....	<b>17</b>
1.3.3 Mínimos quadrados parciais – PLS.....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>24</b>
<i>3.1 Reagentes</i> .....	<b>24</b>
<i>3.2 Amostras</i> .....	<b>24</b>
<i>3.2.1 Amostras de azeite de oliva extra virgem adulteradas pela adição dos outros óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola)</i> .....	<b>24</b>
<i>3.3 Preparo das amostras para injeção no espectrômetro de massas</i> .....	<b>25</b>

3.4	<i>Obtenção dos espectros de massas</i> .....	25
3.5	<i>Análise Quimiométrica</i> .....	26
4.	<b>DIFERENCIAÇÃO ENTRE AZEITES DE OLIVA (EXTRA VIRGEM E PURO) E OUTROS ÓLEOS VEGETAIS (SOJA, MILHO, GIRASSOL E CANOLA) A PARTIR DOS ESPECTROS DE MASSAS COM IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY (FINGERPRINTS)</b> .....	28
4.1	Espectros de massas com ionização electrospray no modo negativo (ESI(-)-MS).	28
4.2	Espectros de massas com ionização electrospray no modo positivo (ESI(+)-MS).	31
4.3	Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA): distinção entre as amostras de azeite de oliva extra virgem e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).....	35
4.4	Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA): distinção entre as amostras de azeite de oliva puro e extra virgem.....	38
4.5	Conclusões Parciais.....	43
5.	<b>CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES EM AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM POR ESI-MS. APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA</b> .....	46
5.1	Adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleo de soja.....	46
5.2	Adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleo de milho.....	53
5.3	Adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleo de girassol.....	56
5.4	Adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleo de canola.....	58
5.5	Adulteração de azeite de oliva extra virgem com azeite de oliva puro.....	61
5.6	Quantificação do teor óleo de soja em amostras de azeite de oliva extra virgem adulteradas: calibração multivariada aplicada aos dados de ESI-MS.....	66

5.6.1 Calibração multivariada com os dados dos ESI(-)-MS.....	66
5.6.2 Calibração multivariada com os dados dos ESI(+)-MS.....	70
5.7 Conclusões Parciais.....	74
<b>6. CONCLUSÕES FINAIS.....</b>	<b>76</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>

## RESUMO

Neste trabalho, a espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS), em conjunto com técnicas quimiométricas, foram usadas para caracterizar azeites de oliva (extra virgem e puro) e óleos vegetais (soja, milho, girassol, canola), bem como detectar e quantificar adulterações de azeite de oliva extra virgem pela adição dos outros óleos vegetais (incluindo o azeite de oliva puro).

Deste modo, técnicas de análise exploratória (análise de componentes principais, PCA, e análise de agrupamentos hierárquicos, HCA), aplicadas aos dados dos ESI(-)-MS e ESI(+)-MS (espectros de massas nos modos negativo e positivo, respectivamente) das amostras permitiram a distinção inequívoca de cada um dos óleos vegetais e azeites de oliva. Além disso, a diferenciação entre os azeites de oliva extra virgem e puro também foi realizada com sucesso, a partir do tratamento dos dados dos ESI(+)-MS por PCA e HCA.

Amostras de azeite de oliva extra virgem foram adulteradas pela adição de um dos óleos vegetais (soja, milho, girassol, canola) ou azeite de oliva puro, em proporções variando entre 1 e 20% m/m, com intervalos de 1% m/m (num total de 20 amostras para cada adulterante). Os dados dos ESI(-)-MS e ESI(+)-MS das amostras adulteradas e dos azeites de oliva extra virgem autênticos, quando tratados por PCA e HCA, permitiram uma inequívoca detecção da fraude (mesmo em níveis tão baixos quanto 1,0% m/m)

Finalmente, um azeite de oliva comercial foi adulterado com crescentes proporções de um óleo de soja (de 0,5% m/m a 20% m/m, com intervalos de 0,5% m/m, resultando um total de 40 amostras). A aplicação de calibração multivariada (através da regressão por mínimos quadrados parciais, PLS) aos dados dos ESI(-)-MS e ESI(+)-MS permitiu a construção de modelos que apresentaram excelente concordância entre os valores reais e previstos para o teor de óleo de soja, com erros quadráticos médios de calibração (RMSEC) e previsão (RMSEP) inferiores à metodologias similares descritas na literatura.

## ABSTRACT

In this work, electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), with chemometric approaches, were used to typify olive oils (extra virgin and pure) and other vegetable oils (soybean, corn, canola, sunflower). Furthermore, the detection and determination of the adulterant content in counterfeit samples of extra virgin olive oil, adulterated by the addition of such vegetable oils (including pure olive oil), were also performed.

Hence, exploratory analysis techniques (such as principal component analysis, PCA, and hierarchical clustering analysis, HCA), applied to set of the ESI(-)-MS and ESI(+)-MS (mass spectra in the negative and positive ion modes, respectively) data allowed an unequivocal distinction between such vegetable and olive oils. Furthermore, the differentiation between extra virgin and pure olive oils was also successfully achieved after treatment of the ESI(+)-MS data by PCA and HCA approaches.

Extra virgin olive oils were adulterated by addition of each vegetable oils (soybean, corn, canola, sunflower) or pure olive oil, in proportions varying from 1 to 20% w/w with increments of 1% w/w (hence, a total of 20 samples were prepared for each adulterant oil). The ESI(-)-MS and ESI(+)-MS of the counterfeit and authentic extra virgin olive oil samples were treated by the PCA and HCA methodologies and an unambiguous fraud detection (even at levels as low as 1% w/w) was achieved.

Finally, one sample of a commercial extra virgin olive oil was adulterated with increasing proportions of a given soybean oil (from 0.5% m/m to 20% m/m with increments of 0.5% m/m, a total of 40 samples). The application of multivariate calibration (via the partial least square regression, PLS) to the ESI(-)-MS e ESI(+)-MS data allowed the construction of models that presented excellent performance, with RMSEC (root mean square error of calibration) and RMSEP (root mean square error of prediction) values lower than the ones described in similar works reported in literature.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Representação esquemática de um espectrômetro de massas, com todas as partes constituintes.....	7
Figura 1.2: Representação do processo de ionização por electrospray e formação do cone de Taylor.....	8
Figura 1.3: Interpretação geométrica da análise de componentes principais para $p=2$ ...11	
Figura 1.4: Esquema de armazenamento de distâncias numa matriz 3x3.....	15
Figura 1.5: Método de ligação simples.....	16
Figura 1.6: Método de ligação completa.....	17
Figura 3.1: Construção da matriz de dados $X$ a partir dos espectros de massas das amostras.....	26
Figura 4.1: ESI(-)-MS ( <i>fingerprint</i> ) de uma amostra de azeite de oliva extra virgem....	28
Figura 4.2: ESI(-)-MS ( <i>fingerprint</i> ) típico de uma amostra de óleo de soja.....	29
Figura 4.3: ESI(-)-MS ( <i>fingerprint</i> ) típico de uma amostra de óleo de milho.....	30
Figura 4.4: ESI(-)-MS ( <i>fingerprint</i> ) típico de uma amostra de óleo de girassol.....	30
Figura 4.5: ESI(-)-MS ( <i>fingerprint</i> ) típico de uma amostra de óleo de canola.....	30
Figura 4.6: ESI(+)-MS ( <i>fingerprint</i> ) típico de uma amostra de azeite de oliva extra virgem.....	32
Figura 4.7: ESI(+)-MS ( <i>fingerprint</i> ) típico de uma amostra de azeite de oliva puro.....	32
Figura 4.8: ESI(+)-MS ( <i>fingerprint</i> ) típico de uma amostra de óleo de soja.....	33
Figura 4.9: ESI(+)-MS ( <i>fingerprint</i> ) típico de uma amostra de óleo de milho.....	33
Figura 4.10: ESI(+)-MS ( <i>fingerprint</i> ) típico de uma amostra de óleo de girassol.....	34
Figura 4.11: ESI(+)-MS ( <i>fingerprint</i> ) típico de uma amostra de óleo de canola.....	34
Figura 4.12: Dendograma obtido com os dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).....	36
Figura 4.13: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).....	36
Figura 4.14: Dendograma obtido com os dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).....	37

Figura 4.15: Gráfico de escores, construído com as componentes principais 1, 2 e 4, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).....	38
Figura 4.16: Dendrogramas obtidos a partir dos dados de ESI(-)-MS: (a) separação entre os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro(amostras 31-60); (b) separação entre os óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) e os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro (amostras 31-40).....	39
Figura 4.17: Gráficos de escores obtidos a partir dos dados de ESI(-)-MS: (a) separação entre os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro(amostras 31-60); (b) separação entre os óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) e os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro (amostras 31-40).....	40
Figura 4.18: Dendrogramas obtidos a partir dos dados de ESI(+)-MS: (a) separação entre os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro(amostras 31-60); (b) separação entre os óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) e os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro (amostras 31-40).....	41
Figura 4.19: Gráficos de escores obtidos a partir dos dados de ESI(+)-MS: (a) separação entre os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro(amostras 31-60); (b) separação entre os óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) e os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro (amostras 31-40).....	42
Figura 5.1: ESI(-)-MS de amostras adulteradas de azeite de oliva com as seguintes concentrações de óleo de soja: (a) 0% m/m; (b) 10% m/m e (c) 20% m/m.....	47
Figura 5.2: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(-)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m).....	48
Figura 5.3: Gráfico de escores, construído com a primeira, terceira e quarta componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m).....	49
Figura 5.4: ESI(+)-MS de amostras adulteradas de azeite de oliva com as seguintes concentrações de óleo de soja: (a) 0% m/m; (b) 10% m/m e (c) 20% m/m.....	50
Figura 5.5: Dendrograma obtidos a partir dos dados de ESI(+)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m).....	51

Figura 5.6: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m).....	52
Figura 5.7: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(-)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m).....	53
Figura 5.8: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m).....	54
Figura 5.9: Dendrograma obtidos a partir dos dados de ESI(+)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m).....	55
Figura 5.10: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m).....	56
Figura 5.11: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(-)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de girasol (com 1 a 20% m/m).....	57
Figura 5.12: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de girasol (com 1 a 20% m/m).....	57
Figura 5.13: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(-)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m).....	58
Figura 5.14: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m).....	59

Figura 5.15: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(+)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m).....	60
Figura 5.16: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m).....	61
Figura 5.17: ESI(+)-MS de amostras adulteradas de azeite de oliva extra virgem com as seguintes concentrações de azeite de oliva puro: (a) 0% m/m; (b) 10% m/m e (c) 20% m/m.....	63
Figura 5.18: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(+)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de azeite de oliva puro (com 1 a 20% m/m).....	64
Figura 5.19: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de azeite de oliva puro (com 1 a 20% m/m).....	64
Figura 5.20: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(+)-MS de azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (51-60) e amostras adulteradas (31-50, preparadas pela seleção de um azeite de oliva extra virgem, ao qual foram adicionadas quantidades crescentes (1 a 20% m/m) de um azeite de oliva puro específico).....	65
Figura 5.21: Gráfico de escores, construído com PC1, PC2 e PC4, de azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (51-60) e amostras adulteradas (31-50, preparadas pela seleção de um azeite de oliva extra virgem, ao qual foram adicionadas quantidades crescentes (1 a 20% m/m) de um azeite de oliva puro específico).....	66
Figura 5.22: Curva dos valores previsto <i>versus</i> real para os teores de óleo de soja nas 30 amostras (conjunto de calibração) adulteradas de azeite de oliva extra virgem. Tal gráfico foi obtido com base nos dados dos ESI(-)-MS.....	68
Figura 5.23: Curva dos valores previsto <i>versus</i> real para os teores de óleo de soja nas 10 amostras (conjunto de previsão) adulteradas de azeite de oliva extra virgem. Tais resultados, utilizados na validação do modelo de calibração, foram obtidos a partir dos dados dos ESI(-)-MS.....	70

Figura 5.24: Curva dos valores previsto versus real para os teores de óleo de soja nas 30 amostras (conjunto de calibração) adulteradas de azeite de oliva extra virgem. Tal gráfico foi obtido com base nos dados dos ESI(+)-MS.....73

Figura 5.25: Curva dos valores previsto versus real para os teores de óleo de soja nas 9 amostras (conjunto de previsão) adulteradas de azeite de oliva extra virgem. Tais resultados, utilizados na validação do modelo de calibração, foram obtidos a partir dos dados dos ESI(+)-MS.....74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Ácidos graxos e suas composições presentes nos azeites de oliva.....	4
Tabela 4.1: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).....	36
Tabela 4.2: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).....	37
Tabela 4.3: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-60).....	40
Tabela 4.4: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-40) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).....	40
Tabela 4.5: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-60).....	41
Tabela 4.6: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-40) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).....	42
Tabela 5.1: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m).....	48
Tabela 5.2: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m).....	51

Tabela 5.3: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m).....	54
Tabela 5.4: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m).....	55
Tabela 5.5: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de girasol (com 1 a 20% m/m).....	57
Tabela 5.6: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m).....	59
Tabela 5.7: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m).....	60
Tabela 5.8: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de azeite de oliva puro (com 1 a 20% m/m).....	64
Tabela 5.9: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (51-60) e amostras adulteradas (31-50, preparadas pela seleção de um azeite de oliva extra virgem, ao qual foram adicionadas quantidades crescentes (1 a 20% m/m) de um azeite de oliva puro específico).....	65
Tabela 5.10: Concentração das amostras utilizadas na construção do modelo de calibração com o valor real, o valor calculado pelo modelo e o erro de cada previsão. Tais resultados foram calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS.....	67

Tabela 5.11: Concentração das amostras utilizadas na validação do modelo de calibração com o valor real, o valor calculado pelo modelo e o erro de cada previsão. Tais resultados foram calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS.....	69
Tabela 5.12: Concentração das amostras utilizadas na construção do modelo de calibração com o valor real, o valor calculado pelo modelo e o erro de cada previsão. Tais resultados foram calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS.....	72
Tabela 5.13: Concentração das amostras utilizadas na validação do modelo de calibração com o valor real, o valor calculado pelo modelo e o erro de cada previsão. Tais resultados foram calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS.....	73

## CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO

O azeite de oliva é extraído do fruto colhido da oliveira (*Olea europaea*, Linné, família oleácea) por processos mecânicos, o que o torna diferente de outros óleos vegetais, uma vez que, normalmente, os óleos vegetais são extraídos com a utilização de solventes. A extração do azeite de oliva sem a inclusão de processos químicos [1], faz com que o processo tenha baixo rendimento, pois, para cada 5 kg de azeitona produz-se, em média, 1 L de azeite [2].

O azeite de oliva representa pequeno volume em termos de produção mundial de óleos (aproximadamente 2% do total de óleos produzidos), mas contribui com cerca de 15% do valor monetário da produção de óleos em todo o mundo [3]. O consumo do azeite de oliva no mundo aumenta a cada dia, não somente pelo seu sabor e aroma, mas também por ser comprovadamente benéfico à saúde [4], devido a sua eficácia na proteção de enfermidades cardiovasculares [5] e prevenção de diversos tipos de cânceres [6]. Sabe-se que no azeite de oliva são encontrados antioxidantes naturais, como os tocoferóis e compostos fenólicos, e, mais recentemente, foi descoberta uma molécula antiinflamatória, o oleocanthal [7].

Até recentemente, não havia produção de azeite de oliva no Brasil. No entanto, em Maria da Fé, Minas Gerais, já existe uma fazenda experimental para a produção deste insumo [8]. O azeite produzido no Brasil ainda não é comercializado, sendo que a demanda interna do país é atendida por importações, as quais têm crescido nos últimos anos, atingindo volumes consideráveis no cenário mundial. O Brasil importa azeite de oliva da Argentina e de países europeus, sendo que o óleo pode ser envasado no país de origem ou no Brasil [9].

Devido as suas características sensoriais excepcionais, aos inúmeros benefícios à saúde, ao alto valor agregado e a sua produção limitada, o azeite de oliva vem sendo alvo freqüente de adulterações [10], sendo a mais habitual a adição de outros óleos vegetais de menor valor comercial [11]. Este tipo de fraude é mais comum quando o azeite é engarrafado no Brasil. Contudo, outras fraudes menos grotescas, relativas à qualidade do azeite de oliva, podem ocorrer devido às diferentes categorias de azeites existentes, o que pode confundir o consumidor [9].

O azeite de oliva extra virgem, de sabor mais agradável e mais benéfico à saúde, pode ser adulterado com um azeite de qualidade inferior. A produção de azeite de oliva extra virgem é pequena quando comparada a toda produção de azeite de oliva [2].

Um levantamento sobre a adulteração em azeite de oliva, entre os anos 1993 a 2000, feito no Instituto Adolfo Lutz, revelou que das 236 amostras analisadas, 39 estavam adulteradas com outros óleos vegetais e, dentre essas, 34 foram envasadas no Brasil [9]. Este levantamento revelou que as adulterações estão diminuindo no decorrer dos anos, mas não se sabe se realmente elas estão diminuindo ou se apenas as fraudes mais grosseiras diminuíram. Sabe-se, também, que os índices físico-químicos clássicos e a composição de ácidos graxos, os quais são aplicados freqüentemente nos laboratórios brasileiros para avaliação dos azeites, detectam justamente as fraudes mais grosseiras.

Levando-se em consideração toda esta problemática, é necessário desenvolver uma metodologia rápida e confiável para identificar e quantificar adulterações em azeite de oliva extra virgem por outros óleos vegetais.

### ***1.1 Azeite de oliva***

Existe uma diferença fundamental entre azeites e óleos, a qual está relacionada à origem de tais insumos. No caso dos óleos, a extração se faz a partir das sementes pela utilização de solventes enquanto que os azeites são extraídos dos frutos. No caso do azeite de oliva, a extração é feita por prensagem, sem uso de produtos químicos [2].

O azeite de oliva, assim como os outros óleos vegetais, são misturas complexas sendo composto, principalmente, por triacilgliceróis. São encontrados, também, os diacilgliceróis, os ácidos graxos que foram formados pela hidrólise dos triacilgliceróis e alguns compostos fenólicos [12].

Os triacilgliceróis (triéster) e diacilgliceróis (diéster) são formados da combinação de uma molécula de glicerol com três ou duas moléculas de ácidos graxos, respectivamente [13].

Os ácidos graxos são moléculas constituídas por cadeias hidrocarbonadas, com vários comprimentos e graus de insaturação, contendo um grupo carboxila numa das extremidades.

Uma notação muito usada para estes compostos é Cn:m, onde n indica o número de carbonos e m o número de ligações duplas carbono-carbono numa molécula de um ácido graxo específico. Por exemplo, as notações C18:0 e C18:2 indicam ácidos graxos contendo 18 átomos de carbono em suas estruturas, com nenhuma e duas ligações duplas carbono-carbono, respectivamente [14].

Os átomos de carbono dos ácidos graxos são numerados a partir do terminal carboxílico. Assim, os átomos de carbono 2 e 3 são chamados  $\alpha$  e  $\beta$ , enquanto que o carbono da metila na extremidade distal da cadeia é determinado  $\omega$ . Numa outra notação muito usada, a posição da dupla ligação é contada a partir da extremidade distal da cadeia, com o carbono  $\omega$  recebendo o número 1. Por exemplo, o ácido graxo C18:1  $\omega$  3, possui uma insaturação entre os carbonos 15 e 16 [14].

De acordo com a norma do *Codex Alimentarius*, (do latim e significa código alimentar), (CODEX STAN 33-1981 (Rev. 1-1989)), a composição em ácido graxo do azeite de oliva deve seguir os valores mostrados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Ácidos graxos e suas composições presentes nos azeites de oliva

Ácido graxo	Cn:m <sup>a</sup>	% em m/m de ésteres metílicos
Ácido láurico	C12:0	Não detectável
Ácido mirístico	C14:0	<0,1 %
Ácido palmítico	C16:0	7,5 - 20,0
Ácido palmitoleico	C16:1	0,3 - 3,5
Ácido heptadecanoico	C17:0	<0,5
Ácido heptadecenoico	C17:1	<0,6
Ácido esteárico	C18:0	0,5 - 5,0
Ácido oléico	C18:1	55,0 - 83,0
Ácido linoléico	C18:2	3,5 - 21,0
Ácido linolênico	C18:3	<1,5
Ácido araquídico	C20:0	<0,8
Ácido behénico	C22:0	<0,3
Ácido erúico	C22:1	Não detectável
Ácido lignocérico	C24:0	<1,0

<sup>a</sup> n = número de carbonos; m = número de duplas ligações carbono-carbono presentes na estrutura da molécula.

Outros constituintes do azeite que são de grande interesse para os pesquisadores são os compostos fenólicos, os quais são antioxidantes [15]. A quantidade de compostos fenólicos no azeite de oliva depende da qualidade da azeitona que foi usada na sua produção. Azeitonas intactas, colhidas manualmente na época apropriada, transportadas imediatamente e comprimidas e pressionadas em temperaturas inferiores a 25°C, produzem um azeite de alta qualidade, rico em compostos fenólicos. Dentre os fenóis, o hidroxitirosol fenol (HT) e a oleuropeína (OE), resultantes da esterificação do HT com o álcool elenólico, parecem ser os mais importantes [2].

O aquecimento de carnes e de outros alimentos promove a formação de produtos das reações de Maillard que, reagindo com produtos da oxidação lipídica (malonaldeído), originam as aminas aromáticas heterocíclicas, substâncias de elevado poder cancerígeno. No entanto, estudos demonstraram que os componentes fenólicos do azeite de oliva inibem a formação de tais aminas em 30 – 50 % [2], o que comprova os benefícios deste produto.

O azeite de oliva é um produto tão importante que é o único no setor de óleos e gorduras que possui seu próprio acordo internacional de comércio, o Conselho Oleícola Internacional (COI) [3]. Tal órgão coordena a produção dos produtos da oliveira para garantir sua qualidade e autenticidade [16].

A qualidade do azeite de oliva está relacionada à classe em que se enquadra. Os azeites de oliva extra virgem, considerado um óleo de *gourmet*, e virgem são os de maiores preços no mercado e representam, em muitos dos países produtores, 10% da produção total de azeite de oliva [2].

As outras classes de azeite de oliva apresentam sabores inferiores e são utilizadas na culinária em geral. Além disso, mais de 50% do azeite de oliva produzido nos países mediterrâneos têm acidez elevada, características organolépticas pobres, não sendo adequado para o consumo humano, a menos que seja refinado. Este refino faz com que alguns compostos fenólicos sejam perdidos, resultando num produto com qualidade inferior e, conseqüentemente, com um menor valor de mercado [2].

O Codex Alimentarius (1993) estabelece as seguintes classificações para os azeites de oliva, as quais se enquadram aos padrões brasileiros:

- azeites de oliva virgem e extra virgem: apresentam acidez menor ou igual a 3,3%. São os de melhor qualidade e apresentam atributos positivos em testes sensoriais e organolépticos;

- azeite de oliva refinado: obtido de azeitonas com defeitos sensoriais, as quais são colhidas em anos afetados por problemas climáticos. O refino não modifica a estrutura química do azeite e nem elimina os seus defeitos, resultando em um produto com acidez não superior a 0,3%. Possui menor concentração de compostos fenólicos e vitamina E e, com isso, tem sua estabilidade diminuída quando comparado aos azeite virgem e extra virgem. O azeite de oliva refinado não é vendido aos consumidores, sendo misturado com outros azeites de oliva, como o virgem e outros óleos comestíveis;
- a mistura dos azeites de oliva refinado e virgem recebe a denominação de azeite de oliva puro, com grau de acidez inferior a 1,5% [11] [17]. Essa limitação fixa uma proporção mínima do azeite virgem na sua produção. A principal aplicação do azeite de oliva puro é na culinária [2].

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA define que o azeite de oliva é obtido do fruto da oliveira e, além da prensagem, só poderá ser submetido a tratamentos como lavagem, decantação, centrifugação e filtração [18]. Desse processo resulta um resíduo, o bagaço de azeitona (com baixo valor comercial), o qual pode ser utilizado na produção do óleo de bagaço de oliva refinado. Segundo normas da ANVISA esse insumo deve ser obtido pelo tratamento do bagaço de azeitona com solventes, ou outros tipos de tratamentos físicos, e deve, obrigatoriamente, ser refinado [18].

## ***1.2 Espectrometria de massas: ionização electrospray e analisador ion trap***

A espectrometria de massas pode ser considerada como uma das técnicas analíticas de maior importância, por permitir a elucidação da estrutura química de compostos desconhecidos e a quantificação de moléculas conhecidas em misturas complexas. A espectrometria de massas fornece informações valiosas para profissionais de diversas áreas: químicos, biólogos, farmacêuticos, físicos, astrônomos, etc. Uma representação esquemática de um espectrômetro de massas é mostrada na Figura 1.1.

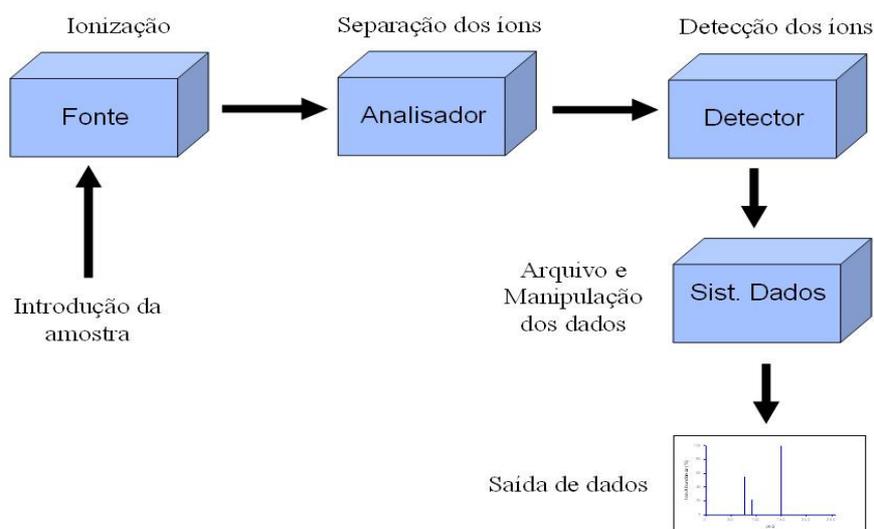


Figura 1.1: Representação esquemática de um espectrômetro de massas, com todas as partes constituintes.

Na espectrometria de massas (MS), átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados na fonte, e a razão massa-carga ( $m/z$ ) de cada íon é determinada pelo analisador. Os íons atingem o detector gerando sinais elétricos que são registrados na forma de um espectro de massas. A partir do valor de  $m/z$  de um íon consegue-se estimar ou obter o valor exato da massa nominal da molécula correspondente. Quase todas as substâncias podem ser analisadas por MS, já que existem diversos tipos de fontes de ionização, analisadores de massas e detectores.

As técnicas de ionização mais conhecidas em espectrometria de massas são a ionização por elétrons (EI) e a ionização química (CI) [19]. Desde que no desenvolvimento do presente estudo fez-se uso exclusivo da ionização *electrospray* (ESI), informações mais detalhadas sobre esta técnica são a seguir apresentadas.

A ionização *electrospray* (ESI) é considerada uma técnica de ionização branda, pois os íons gerados possuem, normalmente, uma baixa quantidade de energia interna. Conseqüentemente, nos espectros de massas, pouca ou nenhuma fragmentação pode ser usualmente observada [20]. Neste tipo de ionização, a solução contendo a amostra é submetida a um spray eletrolítico sob pressão atmosférica. Um fino spray se forma na presença de um alto campo elétrico (4000V). Gotas com excesso de carga (positiva ou negativa) são formadas. A evaporação do solvente, devido à ação do gás nebulizador, diminui o tamanho destas gotas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática

entre as cargas. A tensão superficial das gotas vai se tornando cada vez menor até que a gota seja rompida (cone de Taylor - Figura 1.2). Eventualmente, gotas contendo apenas um íon são formadas, ou íons são expelidos das gotas para a fase gasosa devido à alta repulsão entre íons de mesma carga [21].

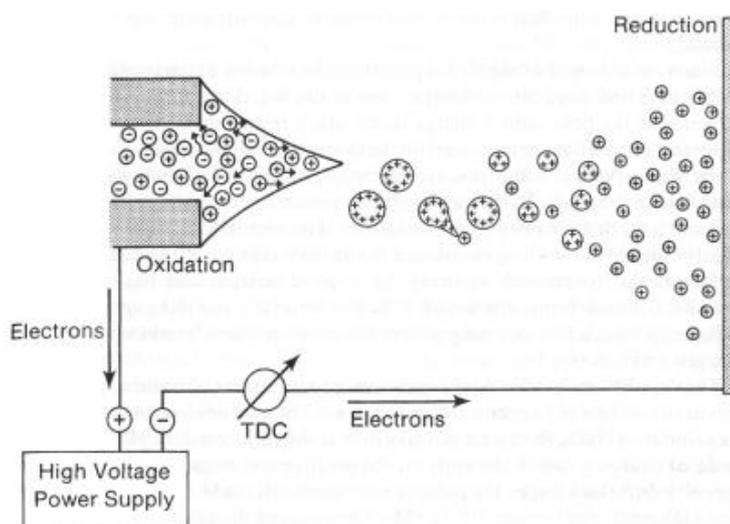


Figura 1.2: Representação do processo de ionização por electrospray e formação do cone de Taylor [22].

Na ionização *electrospray*, pode-se escolher se serão analisados íons positivos ou negativos, dependendo se o analito em questão é mais susceptível a formar cátions ou ânions. Por exemplo, moléculas que possuem o grupo funcional amina em sua estrutura geram, com facilidade, espécies protonadas (ácido conjugado) em solução aquosa. Assim sendo, melhores resultados são obtidos quando se trabalha no modo positivo de ionização. Espectros de massas obtidos nos modos positivo e negativo são representados pelas siglas ESI(+)-MS e ESI(-)-MS, respectivamente.

Após a ionização, os íons formados na fonte são direcionados ao analisador de massas. Os analisadores mais comuns são: quadrupolo, *ion trap* e tempo de voo (TOF). No analisador *ion trap* (armadilha de íons), presente no espectrômetro de massas utilizado no desenvolvimento do presente trabalho, íons de massas diferentes, formados na fonte de ionização, são aprisionados e, após algum tempo, são liberados seqüencialmente, de acordo com suas  $m/z$ , e detectados para gerar um espectro de

massas. Este sistema também permite a realização de experimentos de espectrometria de massas seqüencial (MS/MS) [19].

Os espectros de massas com ionização *electrospray* de amostras complexas geralmente apresentam vários sinais, cada um referente a uma substância presente na amostra. Estes espectros de massas são chamados *fingerprints*, os quais são, de fato, verdadeiras impressões digitais que podem ser úteis na caracterização e diferenciação de cada amostra. Por exemplo, tais espectros de massas podem ser usados para se verificar a autenticidade ou procedência de uma amostra qualquer.

A técnica ESI-MS vem sendo empregada com sucesso para se obter *fingerprints* de uma série de amostras. As respostas são rápidas e a manipulação das amostras não envolve etapas complexas. Nesta linha de raciocínio, Mauri e colaboradores [23] aplicaram a técnica ESI-MS na identificação dos componentes principais de vários extratos de plantas. Segundo o autor, espectros de massas de extratos alcoólicos de várias plantas, os quais foram obtidos pela inserção direta dos extratos na fonte do espectrômetro de massas, foram utilizados na caracterização de tais plantas. Além da obtenção de espectros de massas típicos para cada extrato de planta, foi possível a identificação de uma série de espécies químicas como antocianinas, triterpenos, flavonas, dentre outras.

Cooper e colaboradores [24] aplicaram a técnica ESI-MS para obter *fingerprints* de vinhos californianos como California Red, Corbiere, Zinfandel, Beaujolais, and Sauvignon Blanc, sem a necessidade de uma preparação prévia das amostras (aspecto bem frisado pelos autores como uma grande vantagem da técnica). A utilização de um analisador de massas com transformada de Fourier permitiu a identificação de mais de 30 compostos, devido à alta capacidade que este analisador possui de fornecer a  $m/z$  com grande exatidão (resolução  $\geq 80000$ ) o que, segundo o autor, é ideal na análise de misturas complexas.

Araújo e colaboradores [25] conseguiram obter impressões digitais para amostras de cerveja por ESI(+)-MS e, com o auxílio de métodos quimiométricos, distinguiram amostras de cervejas escuras, do tipo Bock e Stout. Entretanto, a caracterização das amostras do tipo Pale foi melhor visualizada por ESI(-)-MS (modo negativo). Foi ainda possível a identificação de alguns aminoácidos, como a prolina.

Num outro trabalho, Møller e colaboradores [26] obtiveram impressões digitais, por ESI(-)-MS, de amostras de *whisky* de diversas procedências, incluindo produtos

falsificados. Foram identificadas adulterações pela adição de caramelo, identificado pelo padrão de fragmentação característico.

Num trabalho similar ao aqui descrito, Wu e colaboradores [27] obtiveram *fingerprints* de óleos vegetais através da técnica ESI(-)-MS. Foram obtidas diferentes impressões digitais (espectros de massas) para os óleos de canola, oliva e soja.

### ***1.3 Quimiometria***

A quimiometria usa métodos matemáticos e estatísticos para otimizar experimentos, obter conhecimento geral de sistemas químicos e extrair as informações mais relevantes [28]. De todos os ramos da química, a química analítica foi a mais afetada pelo desenvolvimento da quimiometria. A *Chemometrics Society*, organização responsável pelo desenvolvimento de métodos quimiométricos é composta quase que totalmente por químicos analíticos [29].

Dependendo do objetivo do trabalho, devem-se usar algumas das áreas da quimiometria. No presente trabalho foi usada análise exploratória (análise de componentes principais e análise de agrupamentos hierárquicos) e calibração multivariada (método dos mínimos quadrados parciais).

#### ***1.3.1 Análise de componentes principais – PCA***

A técnica denominada análise de componentes principais (PCA) está fundamentada no artigo de Hotelling, de 1933 [30], mas somente nos anos 70 passou a ser usada para análise exploratória de dados, sendo posteriormente introduzida na calibração multivariada [31]. A PCA é uma técnica não supervisionada, não podendo, portanto, ser usada para prever uma nova amostra. Quando uma nova amostra é inserida no conjunto de dados, um novo modelo deve ser construído [32]. Este conjunto de dados é composto por  $n$  amostras e  $p$  variáveis inerentes a cada elemento amostral [30].

O objetivo da PCA é explicar a estrutura de variância e covariância dos vetores, composto por  $p$  variáveis, através do cálculo das componentes principais (PCs), as quais são combinações lineares das variáveis originais. Se no estudo é possível medir  $p$  variáveis, é possível calcular  $p$  PCs. No entanto, o objetivo é reduzir o número de variáveis sem perder informação significativa; então a informação de  $p$  variáveis será substituída pela informação de  $k$  componentes com  $k < p$  [33].

Reduzir o número de variáveis é muito importante para uma informação visual do comportamento das amostras. Se as amostras estão em um espaço de  $p$  dimensões, depois do cálculo das componentes principais é possível ver as amostras em um espaço de duas ou três dimensões em um novo sistema de coordenadas, e este sistema será composto pelas componentes principais, geralmente as primeiras, pois elas trazem a maior quantidade de informação [34].

A Figura 1.3 mostra uma ilustração gráfica das componentes principais no caso de duas variáveis. Como pode ser visto no gráfico, cada ponto no sistema de coordenadas originais  $X_1$  e  $X_2$  é projetado no novo sistema de coordenadas  $Y_1$  e  $Y_2$  [33].

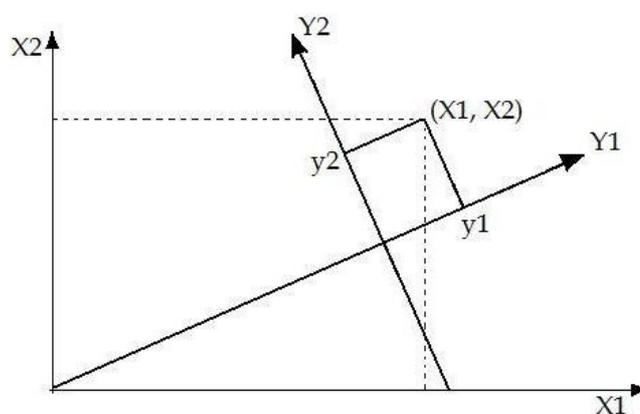


Figura 1.3: Interpretação geométrica da análise de componentes principais para  $p=2$  [33].

Para o cálculo das PCs é necessário que se calcule a matriz de covariância. Esta matriz precisa ser calculada através dos dados amostrais que estão armazenados na matriz  $\mathbf{X}$  de dados. Em um conjunto de  $n$  amostras, com  $p$  variáveis para cada amostra, têm-se  $n$  vetores linha e  $p$  vetores coluna, os quais constituem a matriz de dados  $\mathbf{X}$  [35].

$$X_{n \times p} = \begin{bmatrix} a_{11} & \cdots & a_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{n1} & \cdots & a_{np} \end{bmatrix}$$

O vetor de médias é definido por:

$$X_{med} = [X_{1med} \ X_{2med} \ \dots \ X_{pmed}] \quad \text{e} \quad X_{med} = \frac{1}{n} [X_1 + X_2 + \dots + X_n]$$

A matriz de covariância S irá isolar a fonte de variação dos dados [28].

$$S_{p \times p} = \begin{bmatrix} s_{11} & \cdots & s_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ s_{p1} & \cdots & s_{pp} \end{bmatrix}$$

Sendo  $S_{ij} = S_{ji}$ ,  $j \neq i$  e  $S_{ii}$  definidos, respectivamente, por:

$$S_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^n (X_{li} - X_{imed})(X_{lj} - X_{jmed})}{n - 1}$$

que é a covariância amostral entre a  $i$ -ésima e  $j$ -ésima variáveis e

$$S_{ii} = \frac{\sum_{l=1}^n (X_{li} - X_{imed})^2}{n - 1}$$

que é a variância amostral da  $i$ -ésima variável.

A matriz de covariância é então diagonalizada. Chama-se diagonalização o processo de encontrar as matrizes P e D, tais que

$$S = PDP^{-1} \quad \text{ou} \quad D = P^{-1}SP$$

A matriz D é uma matriz diagonal cujos elementos são autovalores de S. Um número real  $\lambda$  é chamado autovalor de S se existe um vetor não nulo  $V^T = [V_1 \ V_2 \ \dots \ V_p]$ , tal que:

$$SV = \lambda V$$

Cada autovalor tem autovetores associados e a matriz P é composta por estes autovetores [36].

$$P_{p \times p} = \begin{bmatrix} V_{11} & \dots & V_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ V_{p1} & \dots & V_{pp} \end{bmatrix} \quad D_{p \times p} = \begin{bmatrix} \lambda_1 & \dots & 0 \\ \vdots & \lambda_2 & \vdots \\ 0 & \dots & \lambda_p \end{bmatrix}$$

Cada vetor coluna da matriz P será dividido pela sua norma  $\|V\|$  e, então, se tem a matriz O que é composta pelos autovetores normalizados de S, isto é:

$$O_{p \times p} = \begin{bmatrix} e_{11} & \dots & e_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ e_{p1} & \dots & e_{pp} \end{bmatrix}$$

Considerando o sistema escrito na forma matricial:

$$[PC_1 \ PC_2 \ \dots \ PC_p]^T = O^T [Var_1 \ Var_2 \ \dots \ Var_p]^T$$

onde as componentes principais são combinações lineares das variáveis originais [37]:

$PC_1 = e_{11}Var_1 + e_{21}Var_2 + \dots + e_{p1}Var_p$  é a primeira componente principal,

$PC_2 = e_{12}Var_1 + e_{22}Var_2 + \dots + e_{p2}Var_p$  é a segunda componente principal

e  $PC_j = e_{1j}Var_1 + e_{2j}Var_2 + \dots + e_{pj}Var_p$  é a definição da *j-ésima* componente principal.

Os valores de  $e_{ij}$  são constantes reais e representam os pesos de cada variável na componente principal [33]. Para obter o valor numérico (escores) de cada amostra na componente principal basta substituir o valor da variável na expressão da componente principal. Os valores dos pesos são dados pela matriz O e os valores das variáveis são

medidos. Assim tem-se um valor numérico para cada amostra em cada PC sendo, então, possível desenhar o gráfico de escores. Este gráfico reproduz o mesmo comportamento que as amostra têm em um espaço de p dimensões, mas com uma grande vantagem que é a visualização das amostras [33].

A variância explicada para cada PC é dada pelo valor de  $\lambda$ . Para a primeira componente tem-se [38]:

$$\text{Variância explicada} = \frac{\lambda_1}{\sum_{j=1}^p \lambda_j} (100)$$

Alguns exemplos de aplicação da análise por componentes principais podem ser citados: Souza e colaboradores [39] aplicaram a análise de componentes principais e análise hierárquica de agrupamentos no estudo de diferenciação de cachaças mineiras envelhecidas em diferentes madeiras. Os autores utilizaram a técnica de espectrometria de massas com ionização *electrospray* para a obtenção dos *fingerprints* das amostras e as variáveis usadas no tratamento quimiométrico foram os dados dos espectros adquiridos no modo negativo ( $m/z$  e intensidades relativas dos íons).

Sarmento e colaboradores [40] separaram féculas extraídas de diferentes cultivares de mandioca utilizando a análise de componentes principais. Os autores avaliaram tanto a composição química, quanto os teores de umidade das féculas. Os autores também utilizaram como variáveis o tamanho do grânulo das féculas, o qual foi medido por um analisador de partícula a laser, a cristalinidade do grânulo, determinada por difração de raio X, e a densidade absoluta, determinada pelo método do deslocamento do xileno num picnômetro.

### 1.3.2 Análise hierárquica de agrupamentos – HCA

A análise de agrupamentos, também conhecida como análise de conglomerados é uma técnica não supervisionada e da mesma maneira que o PCA é utilizada para análise exploratória dos dados [41].

HCA tem como objetivo dividir os elementos da amostra, ou população, em grupos de forma que os elementos pertencentes a um mesmo grupo sejam similares

entre si, com base nas variáveis que neles foram medidas, e os elementos em grupos diferentes sejam heterogêneos em relação a estas mesmas características [33].

Uma questão importante refere-se ao critério a ser utilizado para se decidir até que ponto dois elementos do conjunto de dados podem ser considerados como semelhantes ou não. Para isso, é necessário considerar medidas que descrevam a similaridade entre elementos amostrais; uma forma de se avaliar a similaridade é calculando a distância entre estes elementos [33].

Para cada elemento amostral têm-se informações de  $p$  variáveis armazenadas em um vetor, sendo que a comparação de diferentes elementos amostrais poderá ser feita através de medidas de distância. Assim, é possível calcular as distâncias entre os vetores de observações dos elementos amostrais e agrupar aqueles de menor distância. Quanto menor a distância maior a similaridade entre as amostras [34].

Vários cálculos de distância podem ser usados, mas o mais comum é a distância euclidiana [42]. A distância euclidiana entre dois elementos  $X_l$  e  $X_k$ ,  $l \neq k$ , é definida por:

$$d(X_l, X_k) = \left[ \sum_{j=1}^p (X_{lj} - X_{kj})^2 \right]^{1/2}$$

Os valores de distância entre as amostras são armazenados em uma matriz de dimensão  $n \times n$ , chamada matriz de distâncias, como mostra a Figura 1.4 [33].

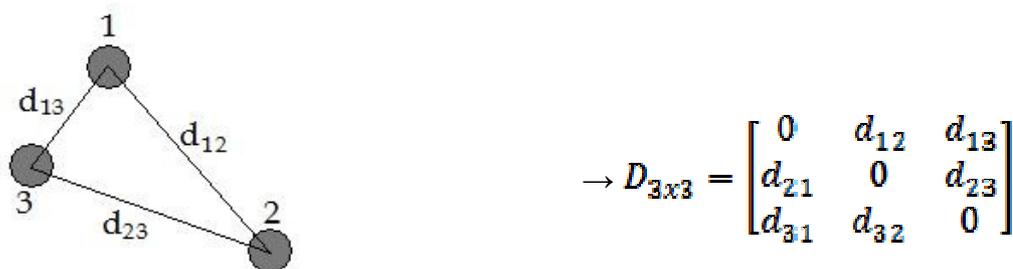


Figura 1.4: Esquema de armazenamento de distâncias numa matriz 3x3. (adaptação-[33])

O HCA parte do princípio de que no início do processo de agrupamento têm-se  $n$  conglomerados, ou seja, cada amostra representa um grupo. Em cada passo do algoritmo, as amostras vão sendo agrupadas, formando novos grupos, até que todas as

amostras formam um único grupo. Métodos diferentes podem ser usados para o agrupamento das amostras [33].

### 1.3.2.1 Método de ligação simples

Neste método, a similaridade entre dois grupos é definida pelos dois elementos mais semelhantes, ou seja, o vizinho mais próximo (Figura 1.5). Então, a distância entre esses dois grupos será definida por [33] [42]:

$$D(G_1, G_2) = \min\{d(X_l, X_k, l \neq k, l = 1, 3, 7 \text{ e } k = 2, 6)\}$$

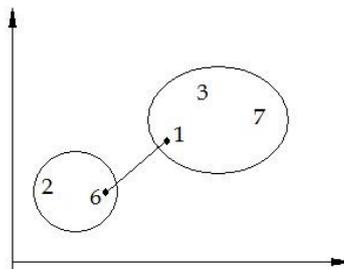


Figura 1.5: Método de ligação simples [33].

### 1.3.2.2 Método de ligação completa

Neste método, a similaridade entre dois grupos é definida pelas amostras menos semelhantes, ou seja, a distância entre as amostras mais distantes, Figura 1.6.

$$D(G_1, G_2) = \max\{d(X_l, X_k, l \neq k, l = 1, 3, 7 \text{ e } k = 2, 6)\}$$

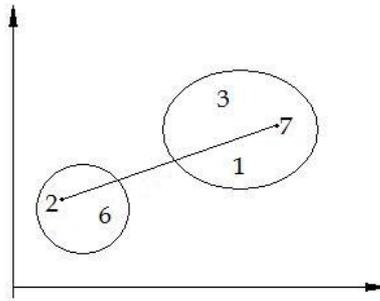


Figura 1.6: Método de ligação completa [33].

### 1.3.2.3 Método da média das distâncias

Este método trata a distância entre dois grupos como a média das distâncias entre as amostras. Considerando os mesmos grupos anteriores pode-se definir a distância média como:

$$D(G_1, G_2) = \frac{1}{6} [d(X_1, X_2) + d(X_1, X_6) + d(X_3, X_2) + d(X_3, X_6) + d(X_7, X_2) + d(X_7, X_6)]$$

### 1.3.2.4 Método do centróide

Neste método a distância entre dois grupos é definida como sendo a distância entre os vetores de médias, chamados centróides. Assim, supondo os mesmos grupos anteriores, tem-se

$$\text{Vetor de média de } G_1 = X_{1 \text{ med}} = \frac{1}{3} [X_1 + X_3 + X_7]$$

$$\text{Vetor de média de } G_2 = X_{2 \text{ med}} = \frac{1}{2} [X_2 + X_6]$$

e a distância entre  $G_1$  e  $G_2$  é calculada usando os valores dos vetores médios [33].

Alguns exemplos de aplicação da HCA podem ser citados da literatura.

Ragno e colaboradores [43] utilizaram as análises PCA e HCA para o monitoramento de águas de nascente do sul da Itália. As variáveis avaliadas pelos

autores foram: condutividade, concentração de nitrato, concentração de cloreto e dureza da água.

Silva e colaboradores [44] realizaram um estudo com o objetivo de agrupar amostras de água mineral de diferentes regiões do estado de São Paulo e, para isso, utilizaram as análises PCA e HCA. O pH e os teores de Ba, Ca, K, Mg, Na e V foram as variáveis utilizadas pelos autores. Eles utilizaram um espectrômetro de emissão ótica para quantificar os teores de Ba, Ca, K, Mg, Na e V.

Morgano e colaboradores [45] utilizaram as análise de componentes principais e análise hierárquica de agrupamentos no estudo de vegetais de diferentes classes, dentre eles: grãos, tubérculos e verduras. Entre as variáveis avaliadas pelos autores, estão os teores de cinco metais (Na, K, Ca, Mg e Fé) e os teores de fósforo, nitrogênio total, umidade, gordura, fibra, carboidratos, proteínas, caloria, tiamina e niacina.

Torres e colaboradores [41] aplicaram HCA para classificar os alimentos de acordo com os valores nutritivos. Umidade, teor de cinzas, carboidratos, proteínas, lipídios, fibra total e teor calórico foram as variáveis utilizadas pelos autores. Eles analisaram 53 amostras de alimentos (batata frita, arroz, rúcula, alface, abobrinha e feijão) adquiridas em quatro restaurantes diferentes.

### *1.3.3 Mínimos quadrados parciais – PLS*

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi desenvolvida por Herman Wold na década de 1960 no campo da econometria [38]. O PLS é um método de regressão utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada [46]. Por ser multivariado, mesmo que as amostras tenham interferentes, pode-se fazer previsão da concentração do analito, mas isso só será possível se estes interferentes estiverem presentes no conjunto de calibração [28].

No modelo de PLS a matriz  $\mathbf{X}$  também terá todo o tratamento como foi descrito para o PCA para o cálculo das PCs, mas neste modelo além da matriz  $\mathbf{X}$  existe também a matriz  $\mathbf{Y}$  que contém as concentrações das amostras e para o cálculo das componentes principais é levado em consideração à matriz  $\mathbf{Y}$ . Cada PC do modelo sofre uma pequena rotação buscando a maior covariância entre  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , buscando encontrar um equilíbrio

entre explicar as variáveis de medida e prever a variável de resposta [38]. Devido esta rotação, a componente principal passa a se chamar variável latente, com conseqüente mudança no valor dos escores [47].

As variáveis latentes, assim como as componentes principais, são combinações das variáveis originais [28].

Outro modelo de regressão muito utilizado é o PCR, onde o tratamento para o cálculo das componentes principais das matrizes **X** e **Y** é feito de forma independente [38].

Na análise por componentes principais, a primeira PC explica a maior parte da variância dos dados. No método PLS, o comportamento é o mesmo, pois a variância explicada pela primeira variável latente é maior que a variância explicada pela segunda, e assim sucessivamente, até que se tenha um valor ótimo de variáveis latentes [28].

Para avaliar se o modelo de regressão é bom ou não, é feito o cálculo do erro médio quadrático (RMSE – do inglês, *root mean square error*) e erro relativo (E). Esses cálculos avaliam a diferença entre o valor real de concentração e o valor previsto pelo modelo. O cálculo do erro quadrático médio pode ser feito com as amostras do conjunto de calibração, obtendo-se o valor de RMSEC (*root mean square error calibration*). Por outro lado, se o cálculo for feito com as amostras do conjunto de previsão ou validação externa, ter-se-á o valor do RMSEP (*root mean square error prediction*) para avaliar a qualidade do modelo [42]. De acordo com a segunda edição do guia prático para quimiometria, o aumento do número de variáveis latentes no modelo sempre causa a obtenção de um valor menor de RMSEC. Por outro lado, o parâmetro RMSEP atinge um valor mínimo e depois volta a aumentar com o aumento do número de variáveis latentes. Deste modo, o ideal é que se encontre um meio termo onde tanto os valores de RMSEC quanto RMSEP sejam pequenos.

Os erros são definidos como [28]:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_{prev} - y_{real})^2}{N}}$$

onde N é o número de amostras.

$$E = \sqrt{\frac{(y_{prev} - y_{real})^2}{(y_{real})^2}} \times 100\%$$

Pode-se citar da literatura alguns exemplos de utilidade da análise quantitativa multivariada através da aplicação da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Ozen e colaboradores [48] quantificaram óleo de linhaça em óleo de girassol utilizando a técnica de espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier. Os autores utilizaram cinco amostras para o conjunto de calibração e quatro amostras para o conjunto de validação.

Christy e colaboradores [49] quantificaram óleo de soja, milho, girassol, noz e avelã em azeite de oliva, por espectrometria de infravermelho próximo. Os autores utilizaram 30 amostras para o conjunto de calibração e obtiveram um RMSEC de 0,6. Para o conjunto de validação, 15 amostras foram utilizadas, com RMSEP acima de 0,6.

Barthus e colaboradores [47] quantificaram simultaneamente riboflavina (VB2), tiamina (VB1), piridoxina (VB6) e nicotinamida em medicamentos. As análises foram feitas por espectrofotometria na região do ultravioleta. Foram adquiridos espectros de 140 amostras (sete tipos de medicamento). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que foi utilizada como técnica padrão, e os autores concluíram que o PLS pôde modelar adequadamente os dados.

## CAPÍTULO 2

## 2. OBJETIVOS

### *Objetivos gerais*

Utilizar a técnica de espectrometria de massas com ionização *electrospray* (ESI-MS), em conjunto com técnicas quimiométricas de análise exploratória (análise de componentes principais, PCA, e análise hierárquica de agrupamentos, HCA), na caracterização de vários tipos de óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) e azeites de oliva (extra virgem e puro). Além disso, uma calibração multivariada (regressão por mínimos quadrados parciais, PLS) será aplicada aos dados dos espectros de massas (valores das  $m/z$  dos íons e suas respectivas intensidades relativas) de amostras de azeite de oliva extra virgem adulteradas com óleo de soja, para a construção de modelos visando a quantificação de tal adulteração.

### *Objetivos específicos*

- . Construir modelos de PCA e HCA com os dados do ESI-MS para promover a distinção entre o azeite de oliva e os óleos adulterantes.
  
- . Construir modelos de PCA e HCA com dados do ESI-MS para diferenciar o azeite de oliva extra virgem e o azeite de oliva puro.
  
- . Utilizar PCA e HCA para identificar amostras adulteradas.
  
- . Construir modelos de PLS para quantificar óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem.

## CAPÍTULO 3

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### ***3.1 Reagentes***

Os seguintes reagentes foram utilizados no presente trabalho: metanol (grau HPLC, 99.9% de pureza, Merck, Darmstadt, Germany), hidróxido de amônio (P.A. 28-30%, Synth, São Paulo, Brasil) e ácido fórmico (P.A. 85%, Synth, São Paulo, Brasil). A água utilizada foi purificada num sistema Milli-Q (Millipore, Alemanha).

#### ***3.2 Amostras***

As amostras de azeite de oliva e dos outros óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) foram adquiridas no comércio local foi adquirida uma amostra de cada marca. Analisou-se 10 marcas de azeite de oliva extra virgem e 10 marcas de azeite de oliva puro. Para os outros óleos vegetais, somente uma marca foi adquirida e analisada.

##### ***3.2.1 Amostras de azeite de oliva extra virgem adulteradas pela adição de azeite de oliva puro e outros óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola)***

Escolheu-se uma marca de azeite de oliva extra virgem e adicionaram-se proporções crescentes dos óleos de soja, milho, girassol, canola e azeite de oliva puro. O primeiro lote de amostras adulteradas foi preparado pela adição dos óleos vegetais e azeite de oliva puro ao azeite de oliva extra virgem, em concentrações variando de 1 a 20,0% m/m, com intervalos de 1% m/m (um total de 20 amostras foram preparadas para cada adulterante). Com os dados dos espectros de massas destas amostras, análises exploratórias (HCA e PCA) foram realizadas. No segundo lote de amostras adulteradas, o azeite de oliva extra virgem foi adulterado pela adição do óleo de soja, com

concentrações variando de 0,5 até 20,0 % m/m, com intervalos de 0,5 % m/m (neste caso, um total de 40 amostras adulteradas foi preparado). Os dados dos espectros de massas dessas 40 amostras foram coletados e tratados pelo método PLS (calibração multivariada).

### ***3.3 Preparo das amostras para injeção no espectrômetro de massas***

As amostras dos óleos vegetais (originais e adulteradas, 100 µL) foram transferidas para um frasco Eppendorf, ao qual se adicionou 1,0 mL de uma solução de metanol/água (1:1) contendo 1% de ácido fórmico (para as análises realizadas no modo positivo) ou 1% de hidróxido de amônio (para as análises no modo negativo). Essa mistura foi agitada em vortex (Phoenix AP-56) por 30 segundos e mantida em repouso até a separação completa das fases (orgânica e aquo-metanólica). Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

### ***3.4 Obtenção dos espectros de massas***

Os espectros de massas foram obtidos num espectrômetro de massas com ionização *electrospray* e analisador *ion trap* (LCQFleet, Thermo-Scientific, San Jose, CA). Para a obtenção dos espectros de massas, injetou-se a fase aquo-metanólica, obtida a partir das amostras dos óleos como descrito no item anterior, diretamente na fonte de ionização por meio de uma microseringa (Hamilton, 500 µL), num fluxo de 10 µL/min. Condições típicas empregadas no espectrômetro de massas foram as seguintes: tensão do capilar para o modo negativo variou de -30 a -35V e a tensão de cone variou de 2,5 a 3,0 KV; para o modo positivo a tensão do capilar variou de 25 a 30 V e do cone 2,5 a 3,5 KV; temperatura do capilar (300 °C); fluxo do gás secante (nitrogênio, 10 L/min).

### 3.5 Análise Quimiométrica

Após a aquisição dos espectros de massas, os dados ( $m/z$  dos íons e suas respectivas intensidades relativas) foram tratados usando o programa Matlab 6.1 e PLS\_Toolbox versão 3.0. Para a realização dos cálculos quimiométricos, uma matriz de dados  $X$  foi construída colocando-se as amostras nas linhas e as respectivas variáveis  $m/z$  dos íons obtidos a partir dos espectros de massas das amostras nas colunas. As extrações foram feitas em triplicata e o valor médio das intensidades relativas dos sinais nos espectros de massas foi utilizado na construção da matriz.

A construção da matriz de dados é mostrada esquematicamente na Figura 3.1.

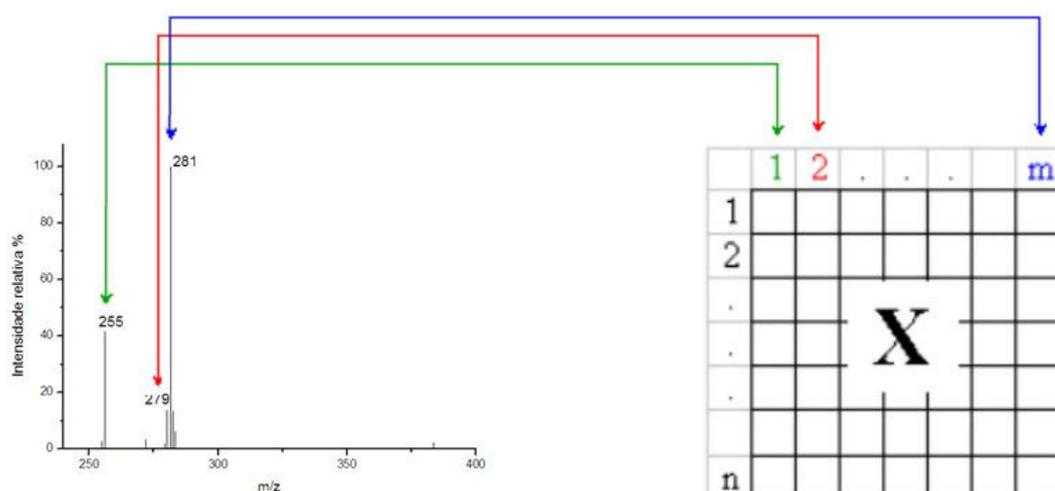


Figura 3.1: Construção da matriz de dados  $X$  a partir dos espectros de massas das amostras.

## CAPÍTULO 4

#### 4. DIFERENCIAÇÃO ENTRE AZEITES DE OLIVA (EXTRA VIRGEM E PURO) E OUTROS ÓLEOS VEGETAIS (SOJA, MILHO, GIRASSOL E CANOLA) A PARTIR DOS ESPECTROS DE MASSAS COM IONIZAÇÃO *ELECTROSPRAY* E TÉCNICAS DE ANÁLISE EXPLORATÓRIA (HCA E PCA)

##### 4.1 Espectros de massas com ionização *electrospray* no modo negativo (*ESI(-)-MS*)

Os espectros de massas com ionização *electrospray* no modo negativo, *ESI(-)-MS*, dos azeites de oliva (extra virgem e puro) e dos outros óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) apresentaram sinais com  $m/z$  referentes aos ácidos graxos mais abundantes presentes em cada amostra. Observa-se que os sinais ( $m/z$  dos ânions) nesses espectros são os mesmos para todas as amostras, ocorrendo variações em suas intensidades relativas, dependendo do tipo de óleo analisado. Na Figura 4.1 pode-se ver um espectro de massas típico de um azeite de oliva. Os *ESI(-)-MS* das amostras dos azeites de oliva extra virgem e puro mostraram ser indistinguíveis.

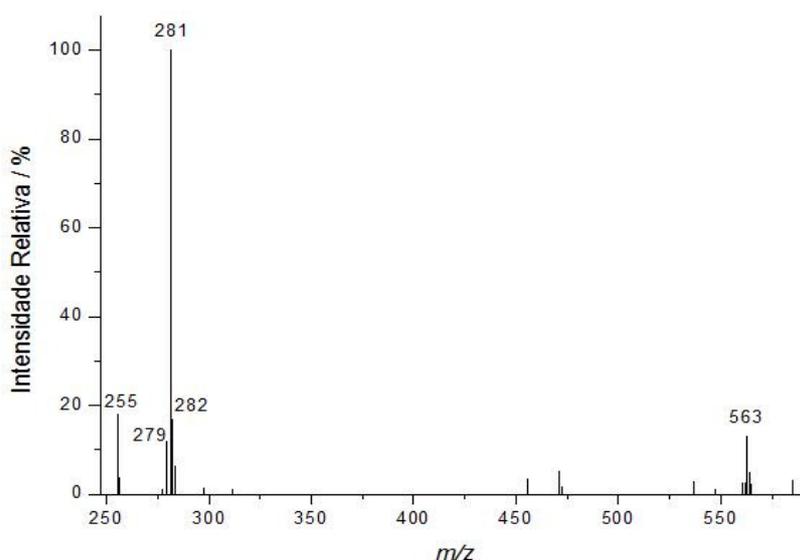


Figura 4.1: *ESI(-)-MS (fingerprint)* de uma amostra de azeite de oliva extra virgem.

O espectro de massas da Figura 4.1 apresenta o ânion de  $m/z$  281 como o sinal mais abundante, o qual refere-se à forma desprotonada do ácido oléico [12]. Os ânions de  $m/z$  279 e 255 referem-se às formas desprotonadas dos ácidos linoléico e palmítico, respectivamente [12]. Um outro ânion com  $m/z$  563, também observado neste espectro de massas, é relativo à formação, provavelmente nas condições da fonte de ionização do espectrômetro de massas, do dímero do ácido oléico, i. e.  $[(\text{ácido oléico})_2 - \text{H}]^-$ . Nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 pode-se observar espectros de massas, ESI(-)-MS, típicos dos óleos de soja, milho e girassol, respectivamente. Note que cada tipo de óleo apresenta um espectro de massas característico, os quais podem ser considerados como sendo impressões digitais (*fingerprints*) de cada amostra. Note-se que o espectro de massas do óleo de canola (Figura 4.5) é muito semelhante ao do azeite de oliva (Figura 4.1), visto que possui os mesmos ânions com intensidades relativas semelhantes. Assim, os espectros de massas desses óleos apresentam como ânion predominante, a forma desprotonada do ácido oléico ( $m/z$  281). Em contraste, nos espectros de massas dos óleos de soja, milho e girassol (Figuras 4.2, 4.3 e 4.4, respectivamente), a forma desprotonada do ácido linoléico ( $m/z$  279) é a mais abundante.

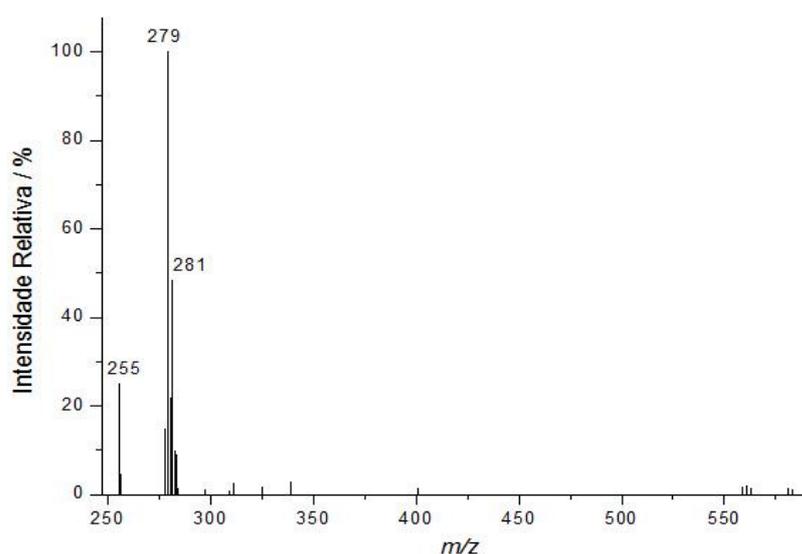


Figura 4.2: ESI(-)-MS (*fingerprint*) típico de uma amostra de óleo de soja.

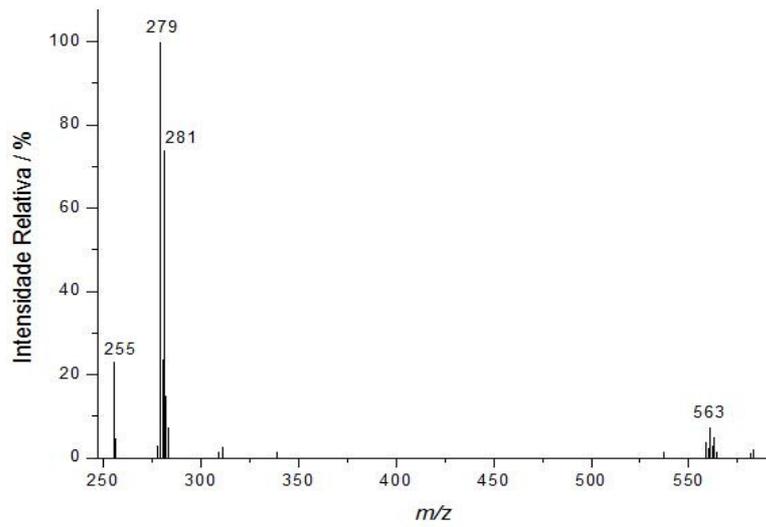


Figura 4.3: ESI(-)-MS (*fingerprint*) típico de uma amostra de óleo de milho.

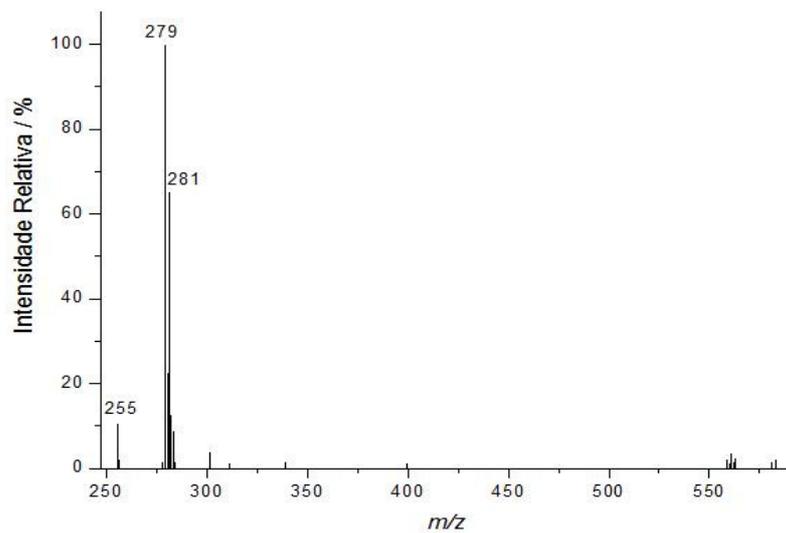


Figura 4.4: ESI(-)-MS (*fingerprint*) típico de uma amostra de óleo de girassol.

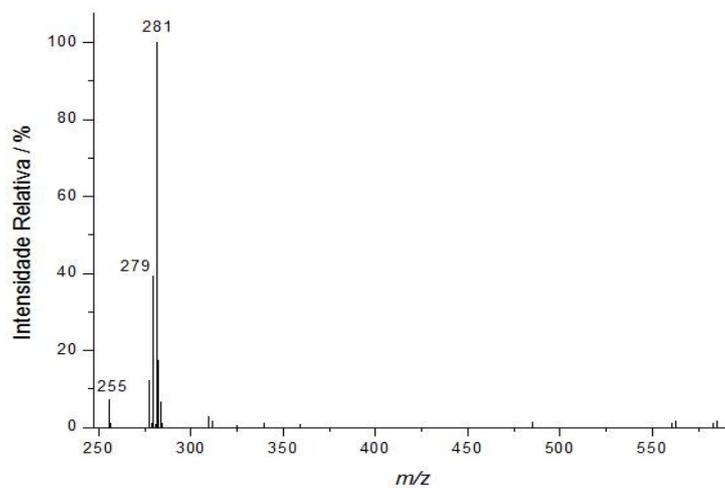


Figura 4.5: ESI(-)-MS (*fingerprint*) típico de uma amostra de óleo de canola.

## ***4.2 Espectros de massas com ionização electrospray no modo positivo (ESI(+)-MS)***

Nos espectros de massas com ionização *electrospray* no modo positivo, ESI(+)-MS, das amostras dos azeites de oliva e demais óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) é possível se observar uma quantidade maior de sinais (cátions), embora nem todos tenham sido identificados. Os espectros ESI(+)-MS típicos dos azeites de oliva extra virgem e puro (Figuras 4.6 e 4.7, respectivamente), os quais apresentaram diferenças significativas contrariamente ao observado nos espectros ESI(-)-MS de tais amostras. Nos ESI(+)-MS pode-se observar os íons com  $m/z$  121 e 137, os quais referem-se às formas protonadas dos compostos fenólicos tirosol e hidroxitirosol, respectivamente. [12] [15] O íon com  $m/z$  417 refere-se à forma protonada do  $\beta,\gamma$ -tocoferol, substância lipossolúvel pertencente à família da vitamina E, comumente encontrada em vários tipos de azeite de oliva [50]. Este composto é encontrado nos óleos de soja, milho, girassol e canola [50]. No entanto, nos ESI(+)-MS de tais amostras (Figuras 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11, respectivamente) não se observou a presença do íon com  $m/z$  417.

Nos ESI(+)-MS é possível se observar, também, íons referentes às formas protonadas dos triacilglicerois (TAG), diacilglicerois (DAG) e monoacilglicerois (MAG). Os íons com  $m/z$  acima de 800 referem-se aos TAGs, enquanto que aqueles com  $m/z$  entre 497-603 e 286-339 são relativos aos DAGs e MAGs, respectivamente [11]. Os TAGs, DAGs e MAGs são observados em todos os ESI(+)-MS dos óleos analisados (Figuras 4.6-4.11).

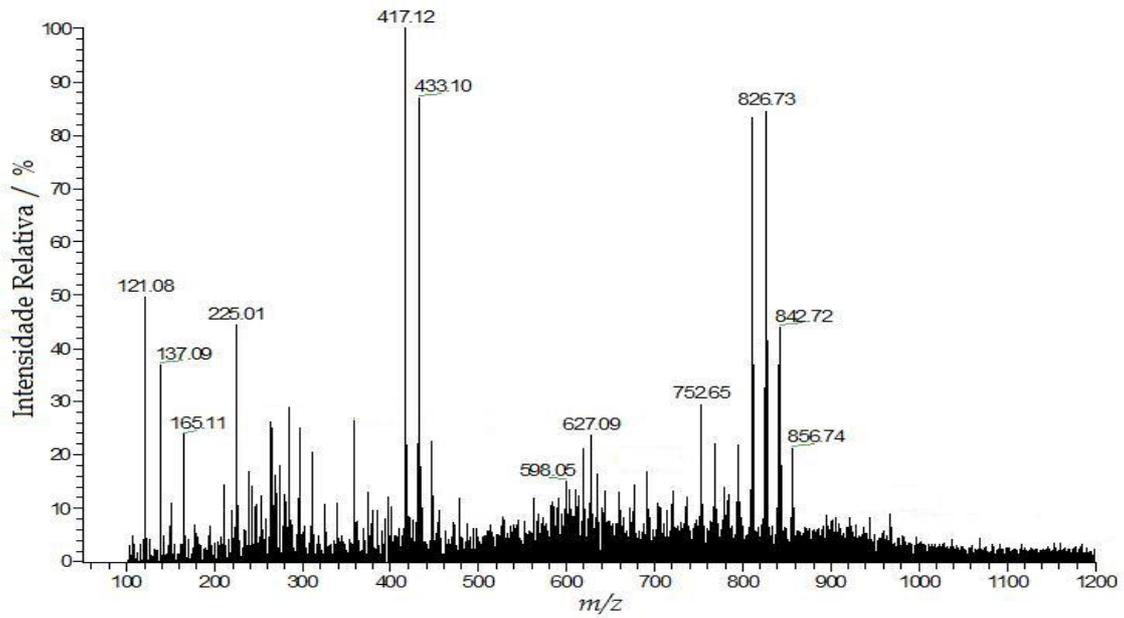


Figura 4.6: ESI(+)-MS (*fingerprint*) típico de uma amostra de azeite de oliva extra virgem.

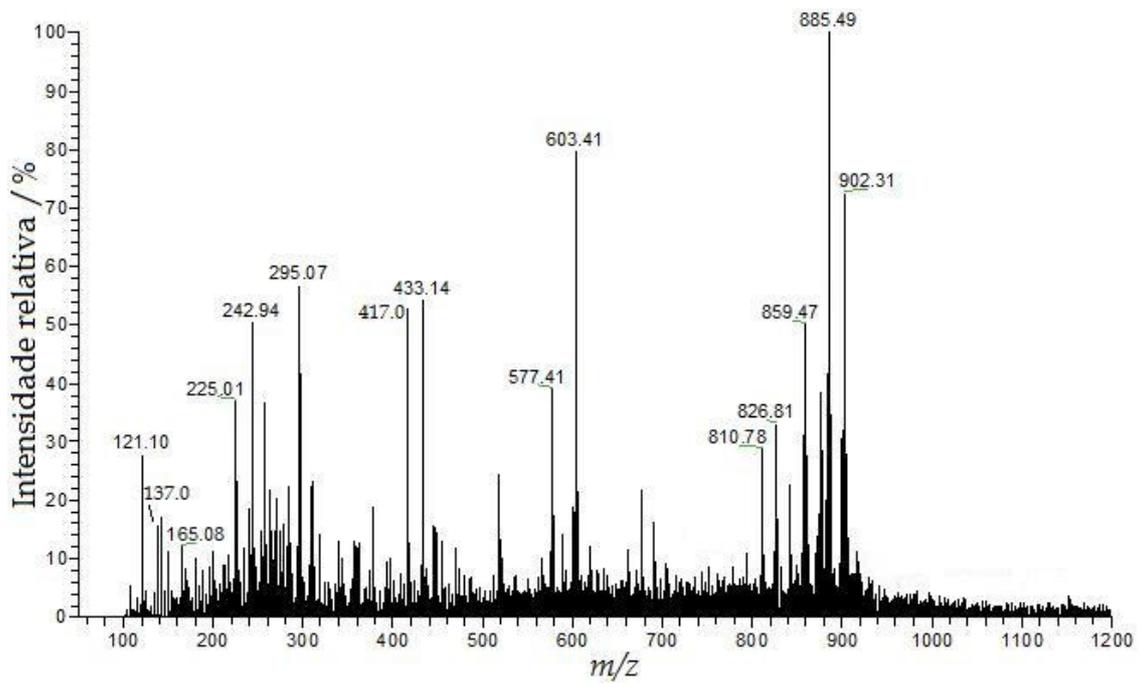


Figura 4.7: ESI(+)-MS (*fingerprint*) típico de uma amostra de azeite de oliva puro.

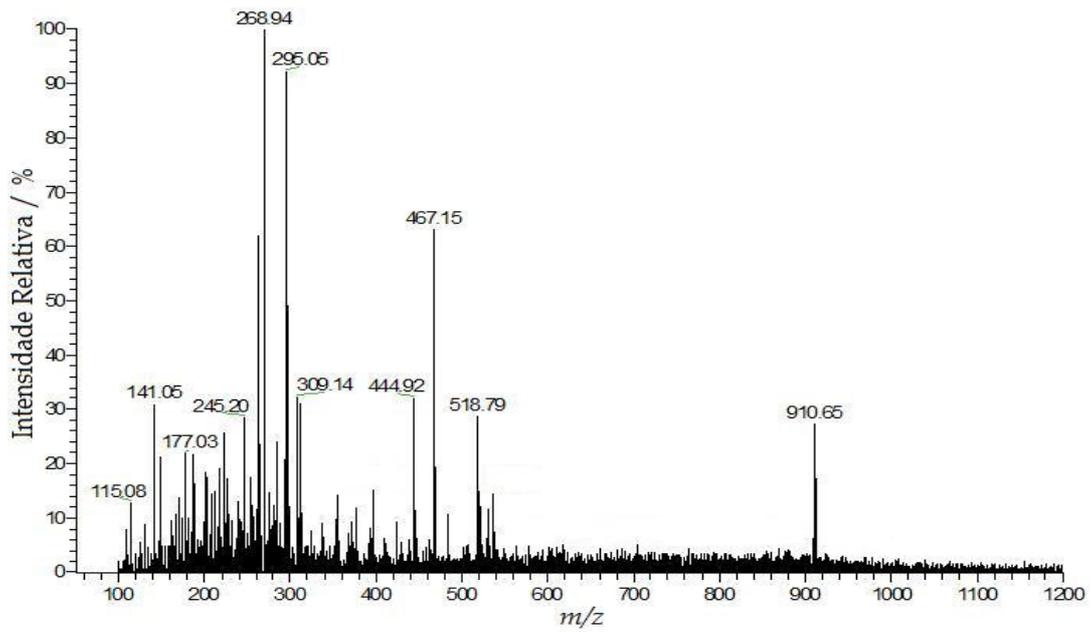


Figura 4.8: ESI(+)-MS (*fingerprint*) típico de uma amostra de óleo de soja.

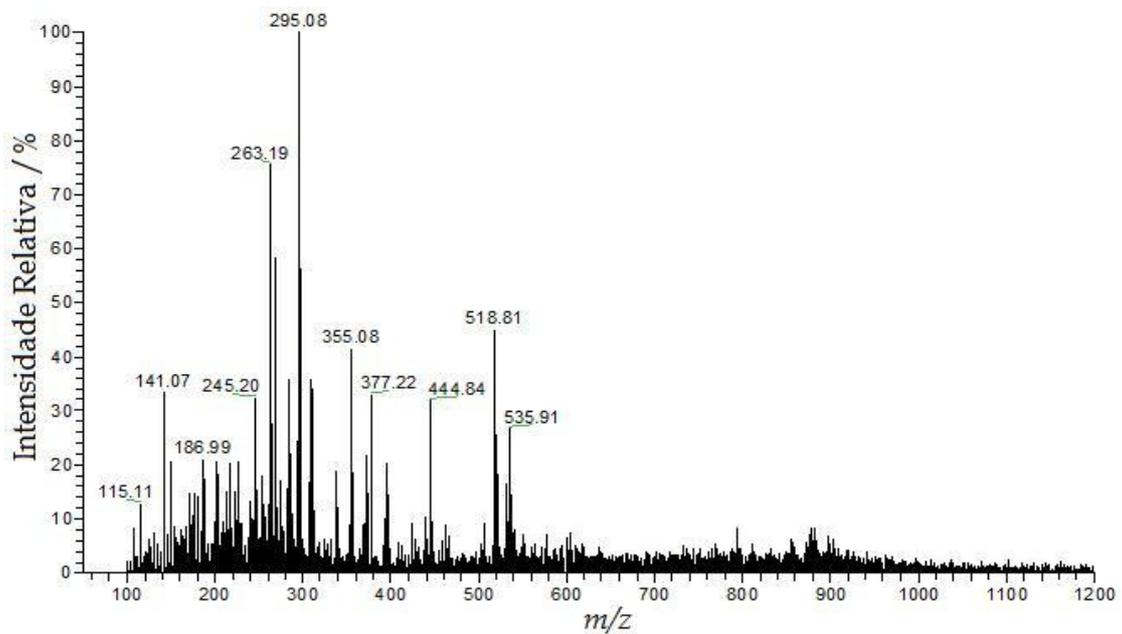


Figura 4.9: ESI(+)-MS (*fingerprint*) típico de uma amostra de óleo de milho.

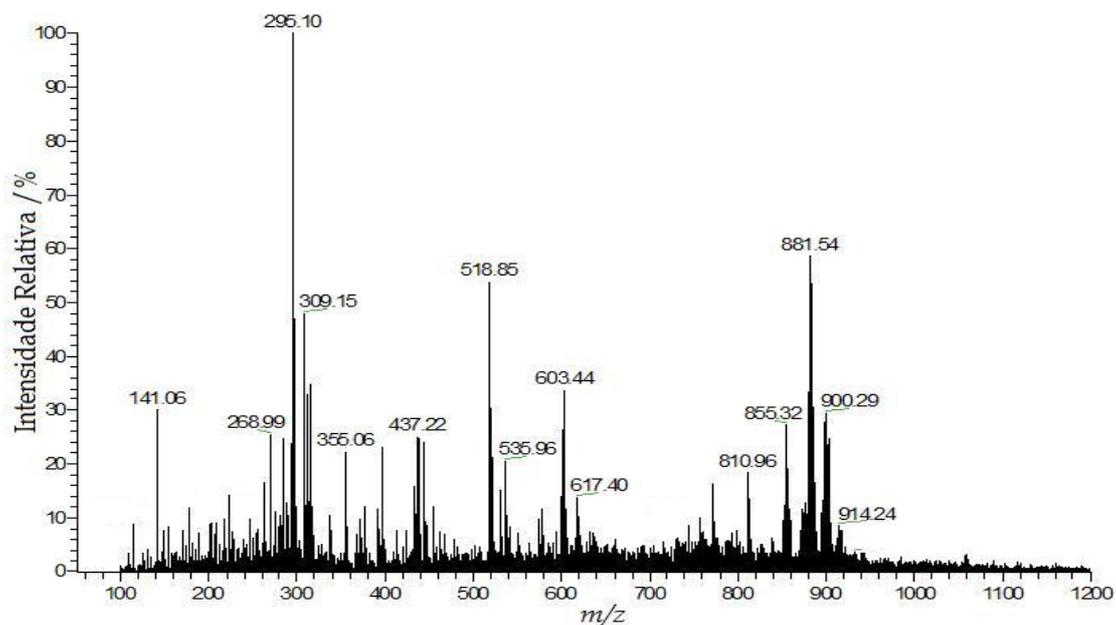


Figura 4.10: ESI(+)-MS (*fingerprint*) típico de uma amostra de óleo de girassol.

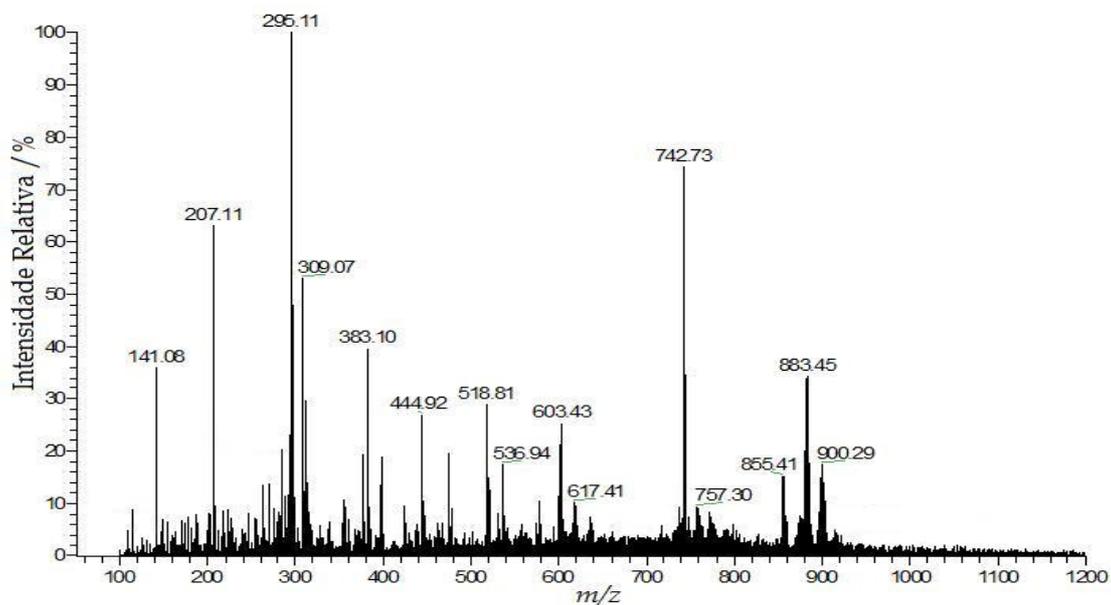


Figura 4.11: ESI(+)-MS (*fingerprint*) típico de uma amostra de óleo de canola.

### ***4.3 Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA): distinção entre as amostras de azeite de oliva extra virgem e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).***

Foram construídas duas matrizes com os dados provenientes dos ESI(-)-MS e ESI(+)-MS das amostras dos azeites extra virgem e os óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).

A Figura 4.12 mostra o dendrograma obtido com os dados dos ESI(-)-MS, onde pode-se notar que houve uma separação nítida entre os diferentes tipos de óleos. Devido à semelhança nos ESI(-)-MS, o óleo de canola apresentou maior similaridade com o azeite de oliva em comparação com os outros óleos vegetais (soja, milho e girassol). Na Figura 4.13, o gráfico dos escores, construído com as três primeiras componentes principais, mostra a presença de grupos bem definidos relacionados a cada uma das amostras analisadas. Nota-se que, mais uma vez, as amostras de canola estão mais próximas do grupo formado pelas das amostras de azeite de oliva. Para este modelo de PCA, as quatro primeiras PCs explicaram 99,1% da variância total (Tabela 4.1).

O dendrograma mostrado na Figura 4.14, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS, indica claramente a separação das amostras em grupos distintos. Para este conjunto de dados, no entanto, as amostras de óleo de canola mostraram ser mais semelhantes aos outros óleos vegetais do que com os azeites de oliva. Na Figura 4.15 está representado o gráfico dos escores, construído com as PC1, PC2 e PC4, onde é possível ver a presença de grupos bem definidos relacionados às amostras dos azeites de oliva e dos óleos vegetais. Note que PC1 promove a separação entre as amostras de azeite de oliva e dos óleos vegetais e PC4 é responsável pela diferenciação entre os óleos de soja, milho, girassol e canola. Este modelo de PCA foi construído com as oito primeiras PCs explicando 93,73% da variância total (Tabela 4.2).

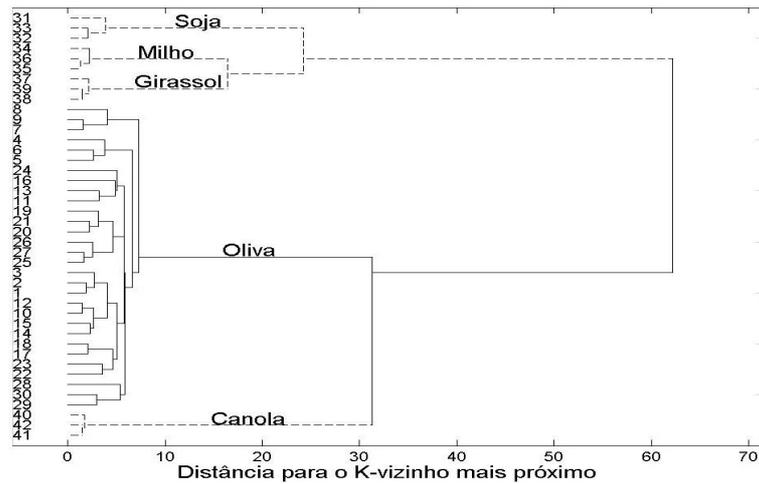


Figura 4.12: Dendrograma obtido com os dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).

Tabela 4.1: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de $\mathbf{X}$	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$1,4 \times 10^3$	92,92	92,92
2	41,7	2,77	95,69
3	34,5	2,28	97,97
4	17,1	1,13	99,10

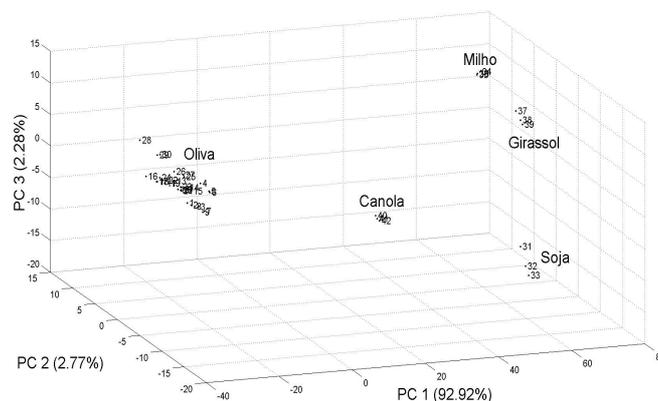


Figura 4.13: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).

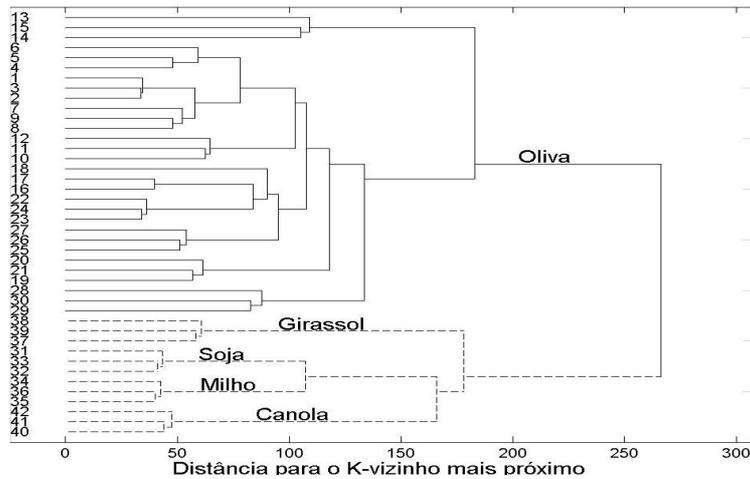


Figura 4.14: Dendrograma obtido com os dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).

Tabela 4.2: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de X	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$1,52 \times 10^4$	50,75	50,75
2	$5,57 \times 10^3$	18,60	69,35
3	$3,05 \times 10^3$	10,20	79,55
4	$1,82 \times 10^3$	6,09	85,64
5	$1,00 \times 10^3$	3,35	88,99
6	723	2,42	91,40
7	386	1,29	92,69
8	312	1,04	93,73

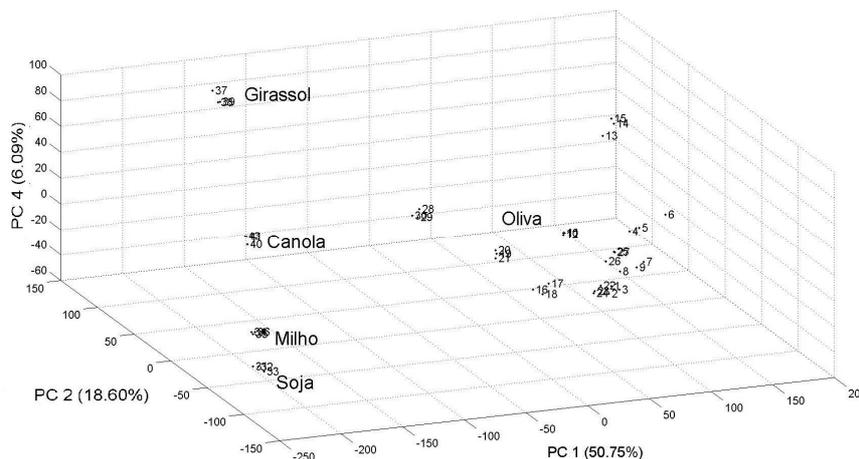


Figura 4.15: Gráfico de escores, construído com as componentes principais 1, 2 e 4, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva (extra virgem) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola).

#### ***4.4 Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA): distinção entre as amostras de azeite de oliva puro e extra virgem***

Visando diferenciar as amostras de azeite de oliva extra virgem e puro, novos modelos foram obtidos. Novas matrizes foram construídas incluindo-se os dados dos ESI(-)-MS e ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva puro. Assim, a Figura 4.16(a) mostra o dendrograma obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras de azeite de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-60). Houve a distinção entre os dois tipos de azeite, mas as amostra 49-60 (de azeite de oliva puro) se confundiram com o grupo das amostras extra virgem, ou seja, a separação não ocorreu de forma eficaz. Na Figura 4.17(a), o gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, mostra uma tendência semelhante: dois grupos principais foram formados (azeites de oliva extra virgem e puro), mas as amostras 49-60 (puro) foram agrupadas com as amostras extra virgem. Para este modelo, as três primeiras PCs foram capazes de explicar 97,17% da variância total (Tabela 4.3). Apesar de não ter ocorrido uma boa separação, uma matriz com os dados dos ESI(-)-MS das amostras de azeite de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-40) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola), foi construída e o dendrograma obtido (Figura 4.16(b)). Note que das 10 amostras do azeite

de oliva puro, quatro (37-40) foram agrupadas com as amostras extra virgem. Como anteriormente observado, as amostras dos azeites de oliva formaram grupos distintos em relação aos óleos vegetais. Na Figura 4.17(b), o gráfico dos escores, construído com o mesmo grupo de amostras anterior, mostrou a mesma tendência. Como uma diferença marcante, duas amostras de azeite de oliva puro (34 e 36) ficaram isoladas dos demais grupos formados. Neste modelo de PCA, as quatro primeiras PCs explicaram 97,74% da variância total (Tabela 4.4). Deste modo, foi possível verificar que não houve uma distinção eficiente entre os dois tipos de azeite de oliva, extra virgem e puro, a partir dos dados dos ESI(-)-MS.

Foram feitas, então, análises com os dados dos ESI(+)-MS das amostras de azeite de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-60). Na Figura 4.18(a), o dendrograma indica a separação nítida entre estes dois grupos (extra virgem e puro), mesmo se tratando de amostras de marcas e procedências diferentes.

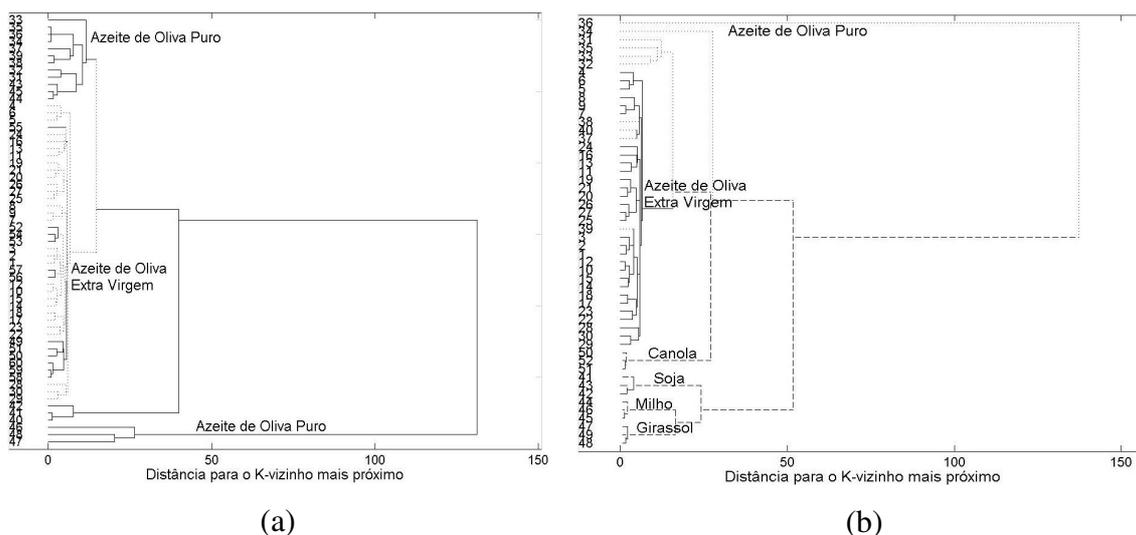


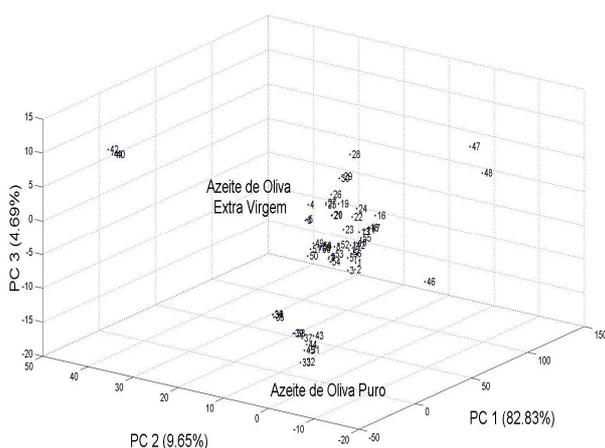
Figura 4.16: Dendrogramas obtidos a partir dos dados de ESI(-)-MS: (a) separação entre os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro(amostras 31-60); (b) separação entre os óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) e os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro (amostras 31-40)

Tabela 4.3: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-60).

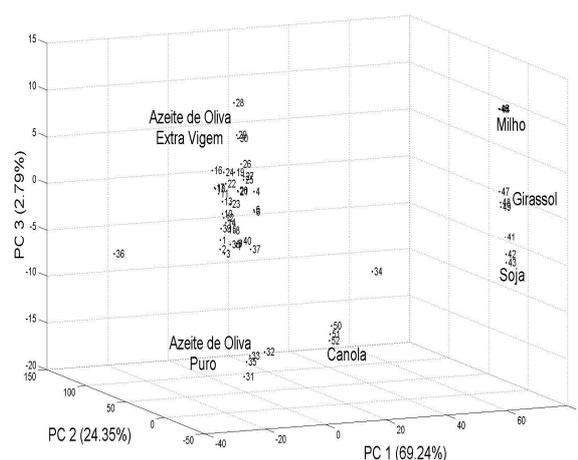
Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de <b>X</b>	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$1,06 \times 10^3$	82,83	82,83
2	$1,23 \times 10^2$	9,65	92,47
3	59,9	4,69	97,17

Tabela 4.4: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-40) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de <b>X</b>	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$1,20 \times 10^3$	69,24	69,24
2	$4,21 \times 10^2$	24,35	93,59
3	48,3	2,79	96,38
4	23,6	1,36	97,74



(a)



(b)

Figura 4.17: Gráficos de escores obtidos a partir dos dados de ESI(-)-MS: (a) separação entre os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro(amostras 31-60); (b) separação entre os óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) e os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro (amostras 31-40)

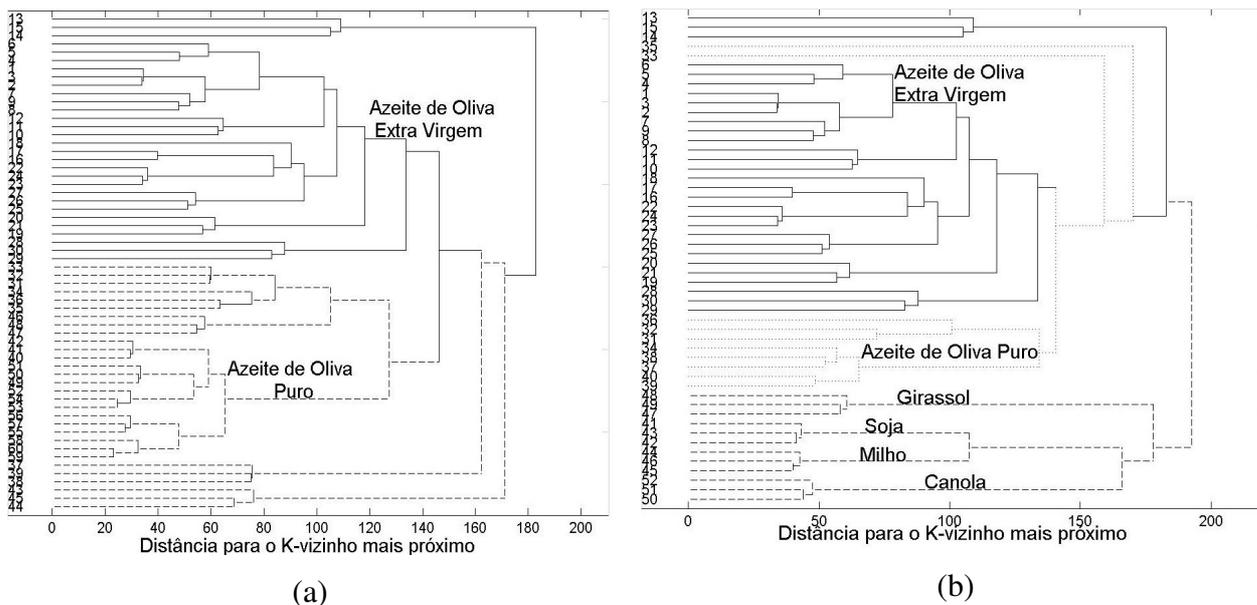


Figura 4.18: Dendrogramas obtidos a partir dos dados de ESI(+)-MS: (a) separação entre os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro(amostras 31-60); (b) separação entre os óleos vegetais (soja, milho,girassol e canola) e os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro (amostras 31-40)

Tabela 4.5: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-60)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de $\mathbf{X}$	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$1,30 \times 10^4$	51,50	51,50
2	$4,07 \times 10^3$	16,12	67,62
3	$3,15 \times 10^3$	12,49	80,11
4	$1,34 \times 10^3$	5,32	85,43
5	$7,93 \times 10^2$	3,14	88,57
6	$3,40 \times 10^2$	1,35	89,92

Tabela 4.6: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-40) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de X	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$1,31 \times 10^4$	42,84	42,84
2	$7,17 \times 10^3$	23,45	66,29
3	$3,46 \times 10^3$	11,30	77,59
4	$1,63 \times 10^3$	5,34	82,93
5	$9,17 \times 10^2$	3,00	85,93
6	$8,69 \times 10^2$	2,84	88,77
7	$6,86 \times 10^2$	2,24	91,01
8	$3,93 \times 10^2$	1,29	92,29

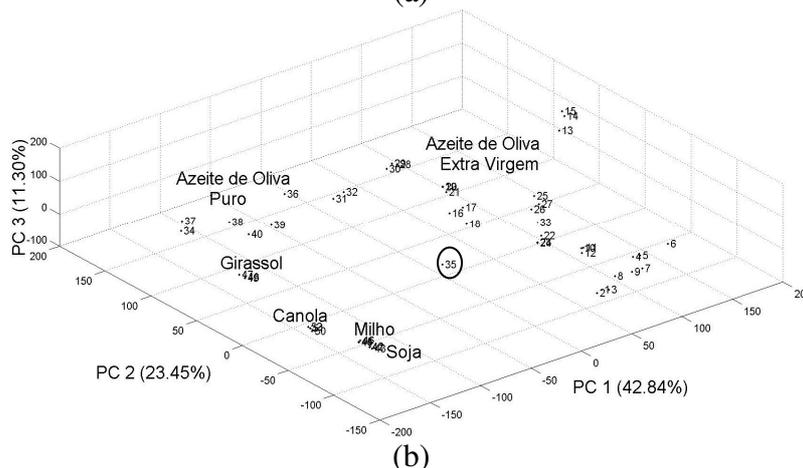
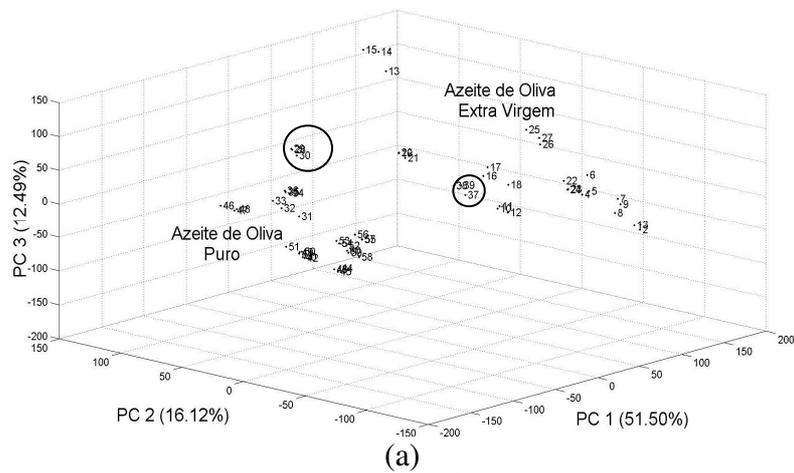


Figura 4.19: Gráficos de escores obtidos a partir dos dados de ESI(+)-MS: (a) separação entre os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro (amostras 31-60); (b) separação entre os óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) e os azeites de oliva extra virgem (amostras 1-30) e puro (amostras 31-40).

Na Figura 4.19(a), o gráfico dos escores (PC1 x PC2 x PC3) para a matriz com os dados dos ESI(+)-MS das amostras de azeite de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-60) apresentou uma tendência diferente em relação ao observado no HCA (Figura 4.18a). Enquanto que as amostras 28-30 (extra virgem) foram agrupadas junto aos azeites de oliva puro, as amostras 37-39 (puro) ficaram juntas ao grupo principal das amostras extra virgem. Neste modelo com seis CPs, 89,92% da variância total foi explicada (Tabela 4.5). Na Figura 4.18(b), é mostrado o dendrograma gerado a partir dos dados de ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-40) e óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola). As amostras se agruparam de acordo com esta classificação, com exceção das amostras 33 e 35 (azeites de oliva puro) que se juntaram ao grupo extra virgem. Na Figura 4.19(b), o gráfico de escores (PC1 x PC2 x PC3), construído com os dados dos ESI(+)-MS das amostras dos óleos vegetais (soja, milho, girassol e canola) e azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (31-40), mostra a formação de grupos distintos. A amostra 33 (azeite de oliva puro) ficou agrupada com o grupo dos extra virgens e a amostra 35 (azeite de oliva puro) ficou um pouco afastada do grupo principal, mas não se juntou a qualquer outro agrupamento. Neste modelo com oito CPs, 92,29% da variância total foi explicada (Tabela 4.6). Tais resultados revelaram, então, que os dados extraídos dos ESI(+)-MS se mostraram mais eficientes na separação entre os dois tipos de azeite de oliva do que aqueles provenientes dos ESI(-)-MS.

#### ***4.5 Conclusões Parciais***

Os dados provenientes dos ESI(-)-MS e ESI(+)-MS de amostras representativas de azeites de oliva (extra virgem e puro) e óleos vegetais (soja, milho, canola e girassol), tratados com técnicas de análise exploratória (PCA e HCA), permitiram a caracterização inequívoca de cada um dos óleos vegetais e azeites de oliva. Esta caracterização se dá devido à diferença de composição dos óleos, principalmente em termos de concentração em ácido graxo. Além disso, a diferenciação entre os azeites de oliva extra virgem e puro também foi realizada de modo rápido e confiável, através da obtenção dos ESI(+)-MS e tratamento dos dados por PCA e HCA, esta separação

também ocorre devido à composição dos azeites, visto que o azeite de oliva extra virgem apresenta uma concentração maior de substâncias antioxidantes. Os modelos oriundos das análises por PCA, normalmente com poucas componentes, foram capazes de explicar acima de 90% da variância total dos dados.

## CAPÍTULO 5

## **5. CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES EM AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM APLICANDO-SE ESI-MS TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS (HCA, PCA E PLS)**

### ***5.1 Adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleo de soja: análises exploratórias (HCA e PCA) aplicadas aos dados de ESI-MS***

Como explicado na Parte Experimental (Capítulo 3), uma única amostra comercial de azeite de oliva extra virgem foi selecionada e adulterada propositalmente com um óleo de soja específico. As amostras adulteradas foram preparadas em concentrações que variaram de 1 a 20% m/m de óleo de soja, com um intervalo de 1% m/m. Com os dados provenientes dos espectros de massas no modo negativo, ESI(-)-MS (a Figura 5.1 mostra três exemplos de tais espectros, azeite adulterado com 0, 10 e 20 % m/m de óleo de soja), de amostras adulteradas e não adulteradas obteve-se um dendrograma, como mostrado na Figura 5.2. Houve formação de dois grupos, o primeiro relacionado ao conjunto das amostras de azeite de oliva originais (1-30), e o segundo com as amostras adulteradas (31-50). Note que, mesmo a amostra adulterada 31, a qual contém apenas 1% m/m de óleo de soja, não se confundiu com as amostras originais (não adulteradas).

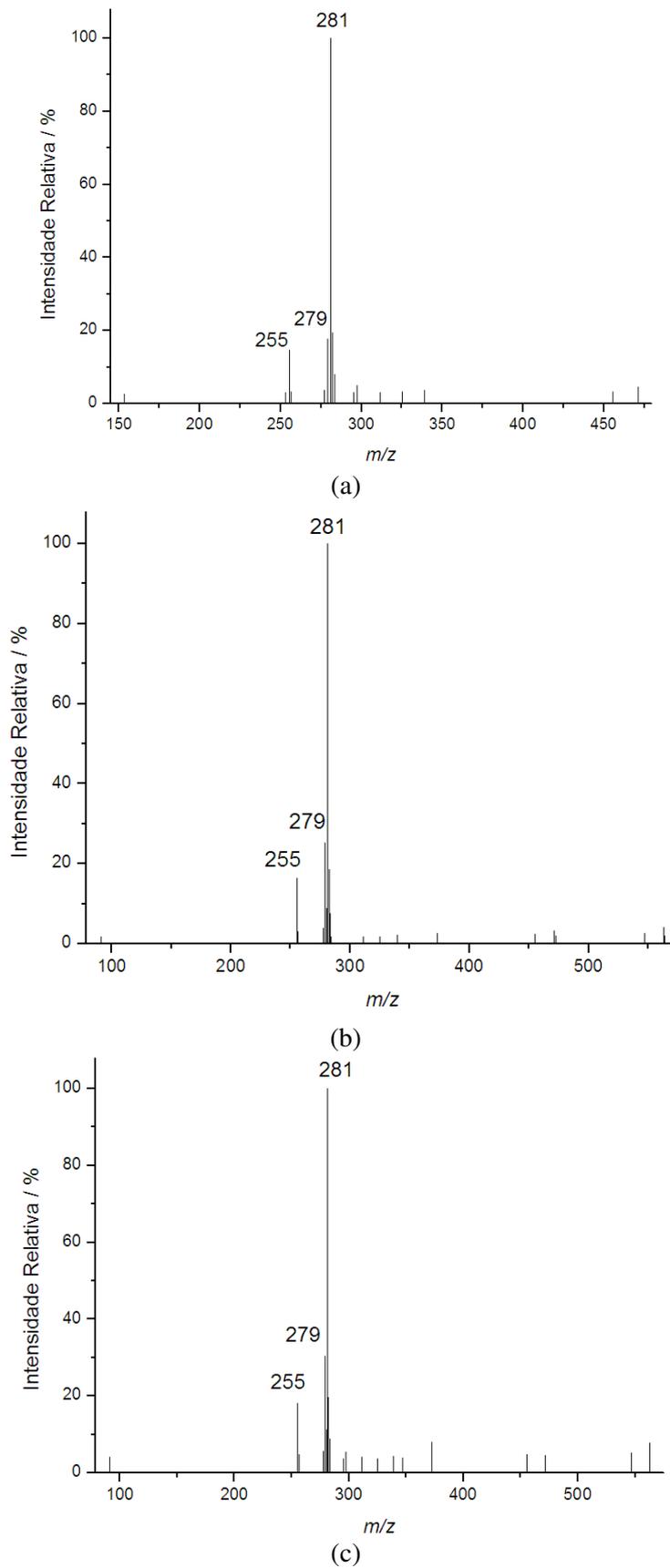


Figura 5.1: ESI(-)-MS de amostras adulteradas de azeite de oliva com as seguintes concentrações de óleo de soja: (a) 0% m/m; (b) 10% m/m e (c) 20% m/m.

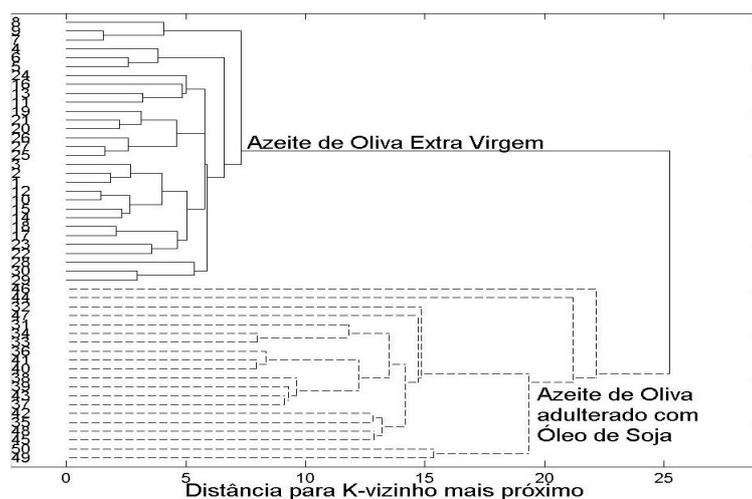


Figura 5.2: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(-)-MS de amostras de azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m).

Tabela 5.1: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de $\mathbf{X}$	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$4,66 \times 10^2$	75,31	75,31
2	61,5	9,94	85,25
3	45,7	7,38	92,63
4	13,8	2,23	94,86
5	8,54	1,38	96,24

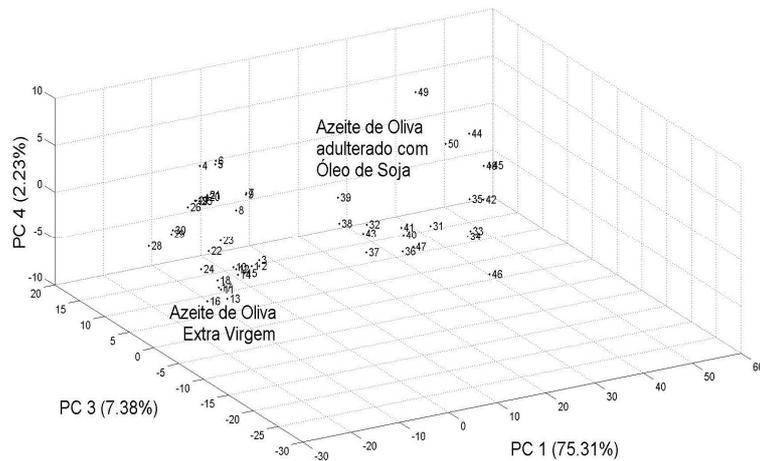
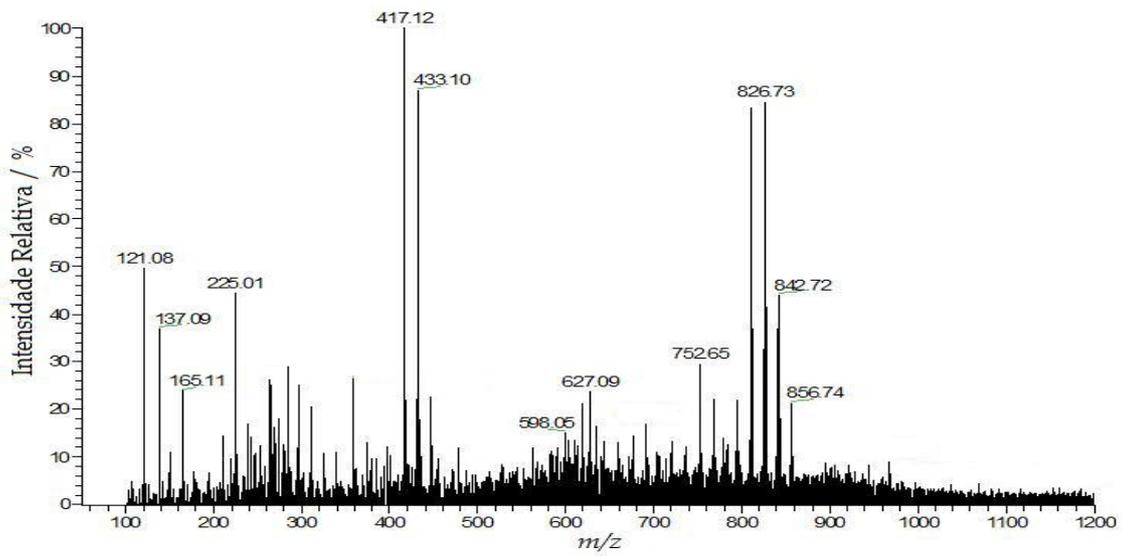


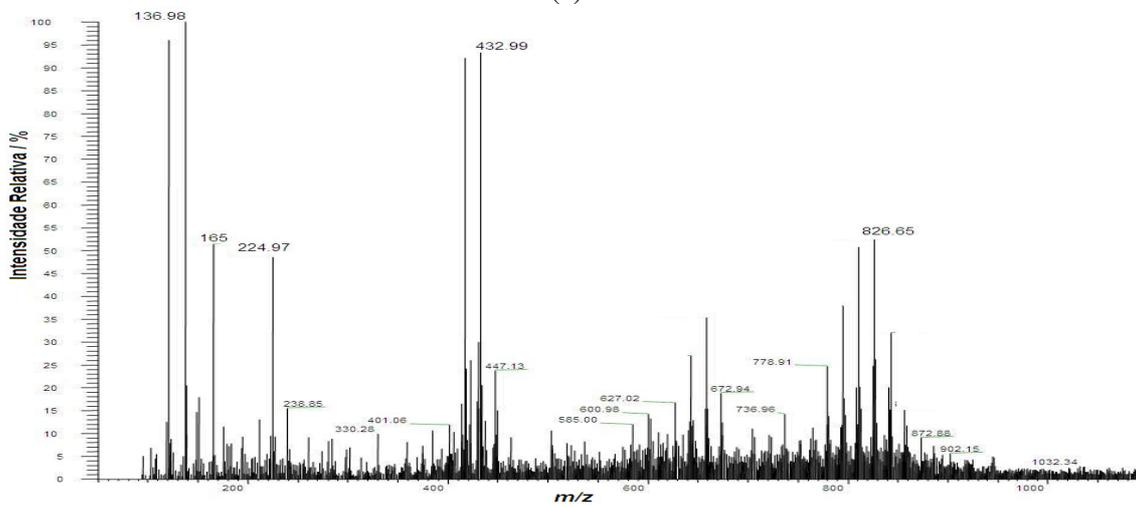
Figura 5.3: Gráfico de escores, construído com a primeira, terceira e quarta componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m).

Na Figura 5.3 está representado o gráfico de escores (PC1 x PC3 x PC4) onde foi possível separar as amostras adulteradas (1-30) das não adulteradas (31-50). Neste modelo, com as cinco primeiras PCs explicou-se 96,24% da variância (Tabela 5.1).

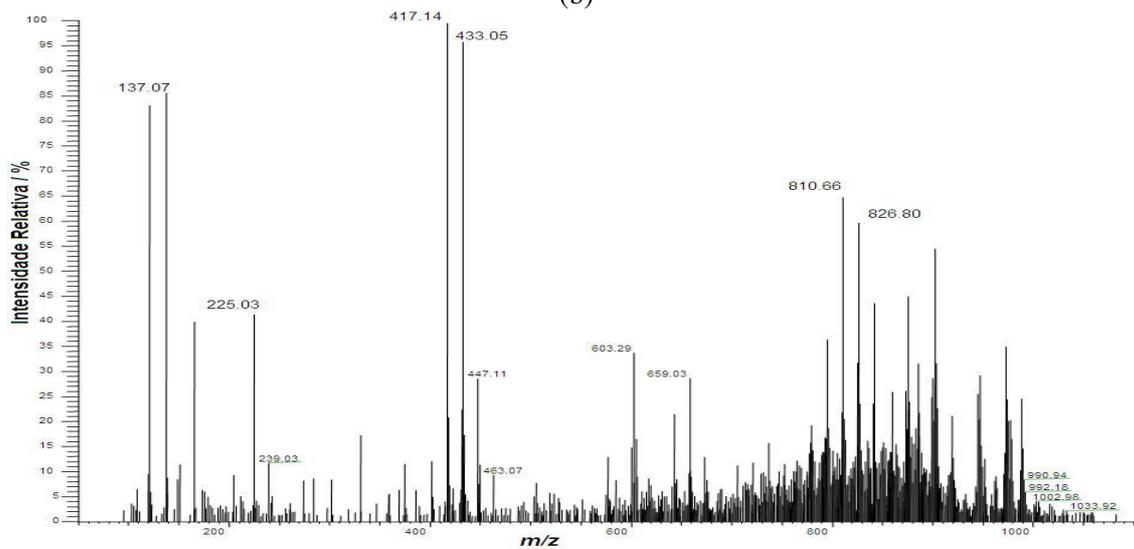
Com os dados dos ESI(+)-MS (a Figura 5.4 mostra três exemplos de tais espectros, azeite de oliva extra virgem adulterado com 0, 10 e 20 % m/m de óleo de soja), gerou-se uma outra matriz e, desta forma, um novo dendrograma foi obtido (Figura 5.5). Note que, também neste caso, as amostras extra virgem originais (1-30) formaram um grupo distinto em relação às amostras adulteradas (31-50).



(a)



(b)



(c)

Figura 5.4: ESI(+)-MS de amostras adulteradas de azeite de oliva com as seguintes concentrações de óleo de soja: (a) 0% m/m; (b) 10% m/m e (c) 20% m/m.

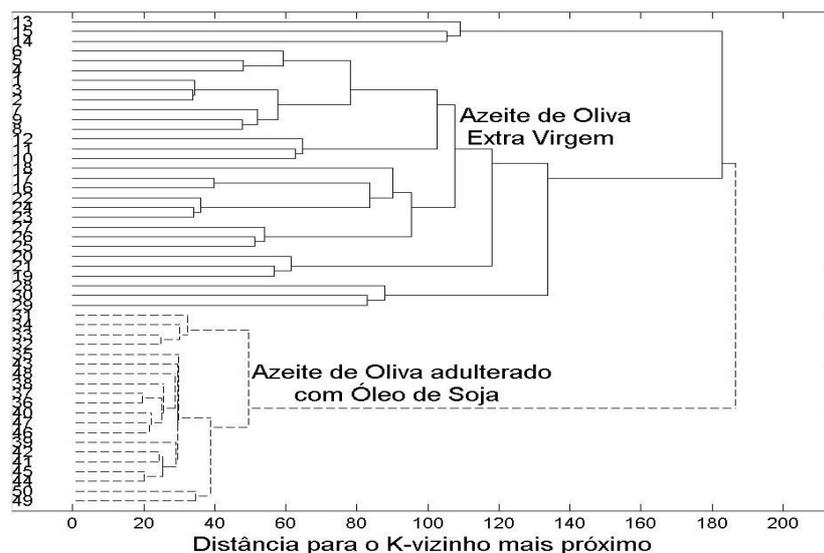


Figura 5.5: Dendrograma obtidos a partir dos dados de ESI(+)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m).

Tabela 5.2: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de $\mathbf{X}$	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$1,36 \times 10^4$	59,56	59,56
2	$3,76 \times 10^3$	16,49	76,05
3	$2,19 \times 10^3$	9,59	85,64
4	$1,08 \times 10^3$	4,74	90,38
5	$2,90 \times 10^2$	1,27	91,65
6	$2,72 \times 10^2$	1,19	92,84
7	$2,20 \times 10^2$	0,96	93,81

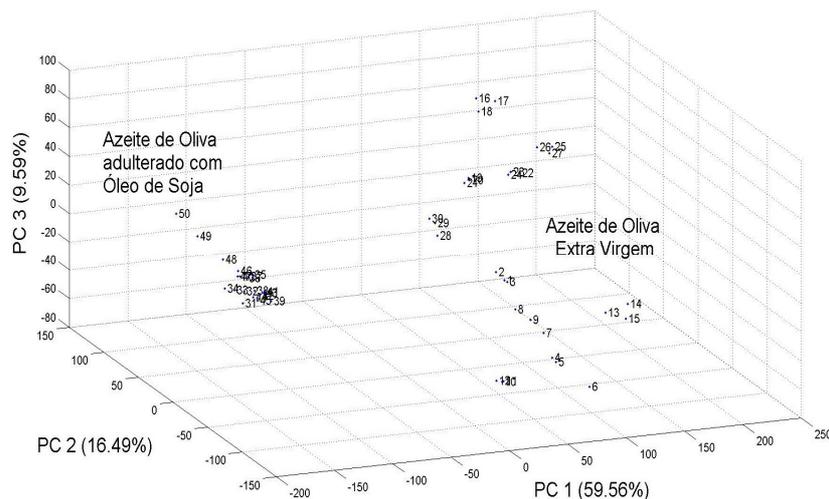


Figura 5.6: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de soja (com 1 a 20% m/m).

O gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, é mostrado na Figura 5.6, onde é possível ver uma separação nítida entre os grupos (amostras originais e adulteradas). Um comportamento interessante é o fato das amostras adulteradas formarem um agrupamento mais homogêneo que as amostras de azeite de oliva extra virgem. Este fato é perfeitamente compreendido, pois foram analisadas 10 marcas diferentes de azeite de oliva extra virgem, sendo algumas engarrafadas no Brasil e outras no país de origem. Com isso, há diferenças entre as amostras, mesmo sendo todas pertencentes à mesma classe de azeite. As amostras adulteradas foram produzidas utilizando-se uma única marca de azeite de oliva, a qual foi adulterada pela adição de um único tipo de óleo de soja. Então, apesar de apresentarem concentrações diferentes de óleo de soja, as amostras adulteradas são mais semelhantes entre si em comparação com as amostras originais de azeite extra virgem. Outro detalhe interessante refere-se ao comportamento das amostras adulteradas 48, 49 e 50, as quais possuem as maiores concentração de óleo de soja (18, 19 e 20 % m/m, respectivamente) e, assim, são as mais distantes do grupo formado pelas amostras originais (1-30). Neste modelo, as sete primeiras CPs explicaram 93,81% da variância total (Tabela 5.2).

## 5.2 Adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleo de milho: análises exploratórias (HCA e PCA) aplicadas aos dados de ESI-MS

A adulteração de azeite de oliva extra virgem pela adição de óleo de milho foi também investigada. Os espectros de massas nos modos negativo e positivo foram obtidos das amostras de azeite extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50). As amostras adulteradas foram preparadas pela adição de proporções crescentes de um óleo de milho (1 a 20 % m/m, com intervalo de 1% m/m) a um azeite de oliva extra virgem selecionado. Na Figura 5.7, o dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(-)-MS das amostras indica a formação de dois agrupamentos distintos relativos aos azeites extra virgem originais (1-30) e adulterados (31-50) pela adição de óleo de milho. Note que a amostra 50, preparada com 20% m/m de óleo de milho, apresenta a menor similaridade com relação às demais amostras adulteradas.

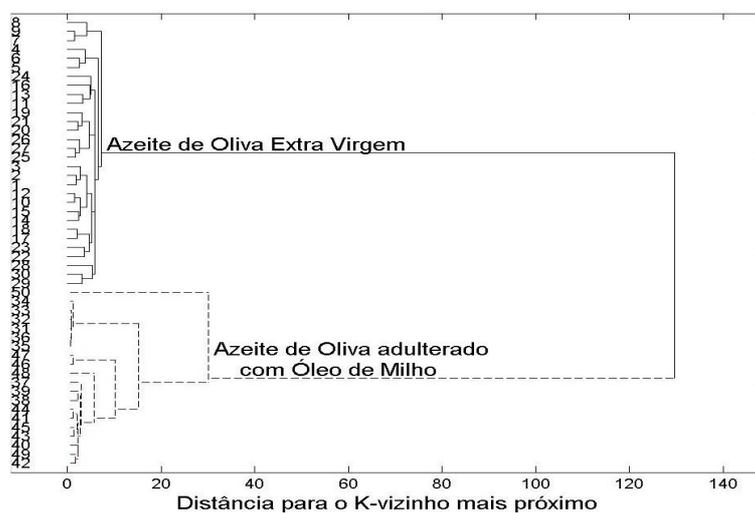


Figura 5.7: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(-)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m).

Tabela 5.3: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de X	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$4,16 \times 10^3$	97,83	97,83
2	49,7	1,17	99,00
3	16,1	0,38	99,38

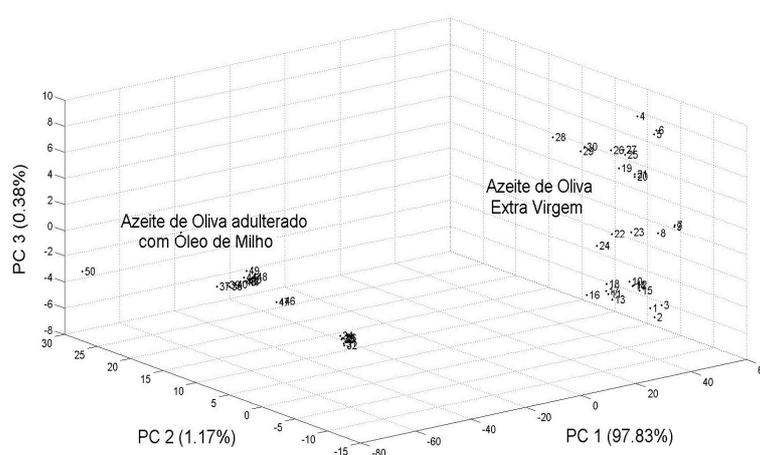


Figura 5.8: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m).

No gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, a separação entre as amostras adulteradas e não adulteradas é claramente visualizada (Figura 5.8). Neste gráfico, as amostras com concentrações maiores do adulterante tendem a se afastar do grupo principal, no sentido positivo de PC2. Este comportamento é nitidamente observado para a amostra 50, a qual possui a maior concentração do adulterante (20% m/m). Neste modelo, com apenas três componentes principais foi possível explicar 99,38% da variância total (Tabela 5.3).

Analogamente, uma matriz com os dados dos ESI(+)-MS foi também construída para a realização das análises PCA e HCA. No dendrograma (Figura 5.9) houve a separação entre as amostras adulteradas e não adulteradas. Uma exceção, no entanto, foi observada: a amostra 37, contendo 7% m/m de óleo de milho, ficou agrupada com as amostras originais. As razões para este comportamento anômalo da amostra 37, embora

não totalmente compreendido, parece estar relacionadas a um erro de preparação desta amostra.

No modelo construído para análise de PCA, com oito PCs, foi possível explicar 90,13% da variância total (Tabela 5.4). O gráfico de escores, construído com PC1, PC2 e PC3, está representado na Figura 5.10. Na análise de PCA, não se observou um comportamento anômalo para a amostra 37, desde que a mesma ficou agrupada com as demais amostras adulteradas.

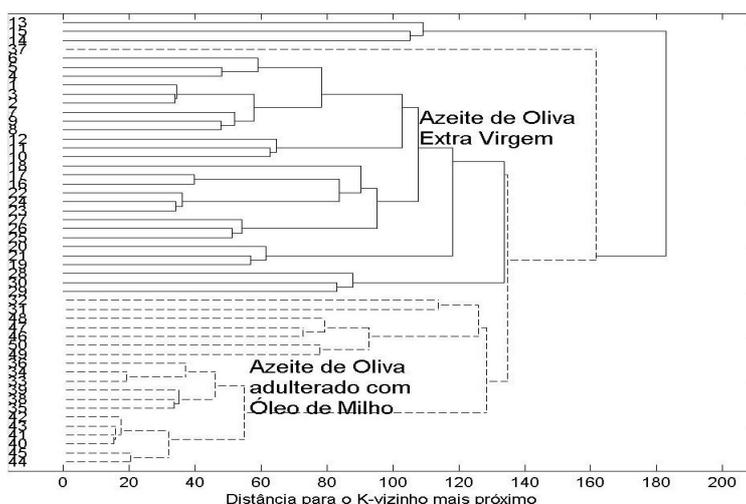


Figura 5.9: Dendrograma obtidos a partir dos dados de ESI(+)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m).

Tabela 5.4: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de $\mathbf{X}$	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$7,71 \times 10^3$	40,54	40,54
2	$2,71 \times 10^3$	14,26	54,81
3	$2,56 \times 10^3$	13,44	68,24
4	$1,77 \times 10^3$	9,29	77,24
5	$1,38 \times 10^3$	7,24	84,78
6	$4,37 \times 10^2$	2,30	87,08
7	$2,99 \times 10^2$	1,57	88,65
8	$2,81 \times 10^2$	1,48	90,13

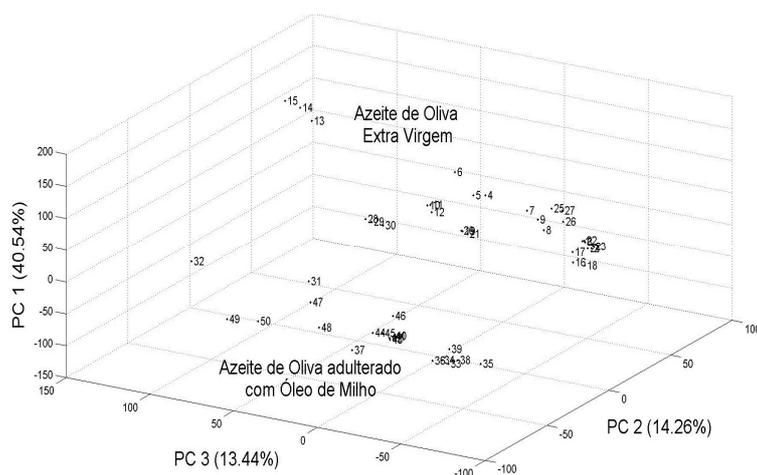


Figura 5.10: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de milho (com 1 a 20% m/m).

### 5.3 Adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleo de girassol: análises exploratórias (HCA e PCA) aplicadas aos dados de ESI-MS

Investigações envolvendo a adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleo de girassol também foram conduzidas neste trabalho. Como nos exemplos anteriores, um azeite de oliva extra virgem foi selecionado e adulterado pela adição de quantidades crescentes (1 a 20% m/m, com intervalos de 1% m/m) de um óleo de girassol específico. As amostras originais (1-30) e adulteradas (31-50) foram analisadas por ESI(-)-MS e ESI(+)-MS. Na Figura 5.11, o dendrograma, construído com os dados de ESI(-)-MS, indicou que as amostras adulteradas não formaram um único grupo. A amostra 35, contaminada com 5% m/m de óleo girassol, ficou agrupada com as amostras não adulteradas; as amostras 34, 36, 41 e 48, contaminadas, respectivamente, com 4, 6, 11 e 18% m/m de óleo de girassol, formaram um grupo que se mostrou mais semelhante ao grupo das amostras não adulteradas.

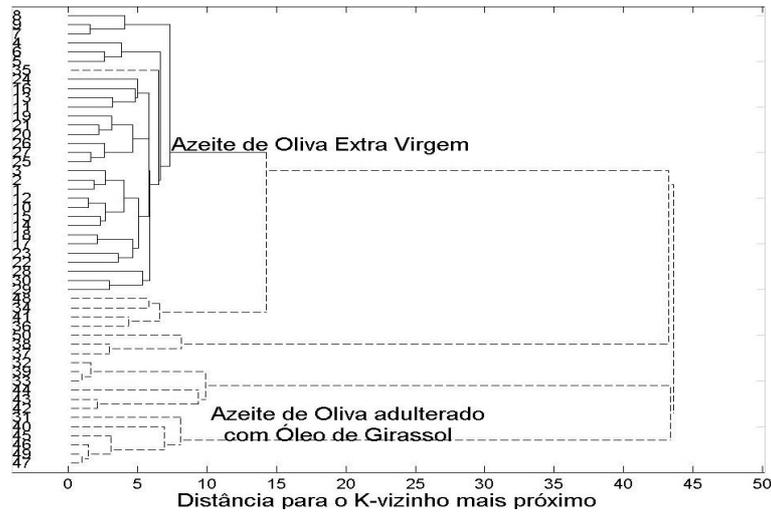


Figura 5.11: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(-)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de girassol (com 1 a 20% m/m).

Tabela 5.5: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de girassol (com 1 a 20% m/m)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de $\mathbf{X}$	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$2,31 \times 10^3$	96,23	96,23
2	59,7	2,49	98,72
3	16,2	0,68	99,60

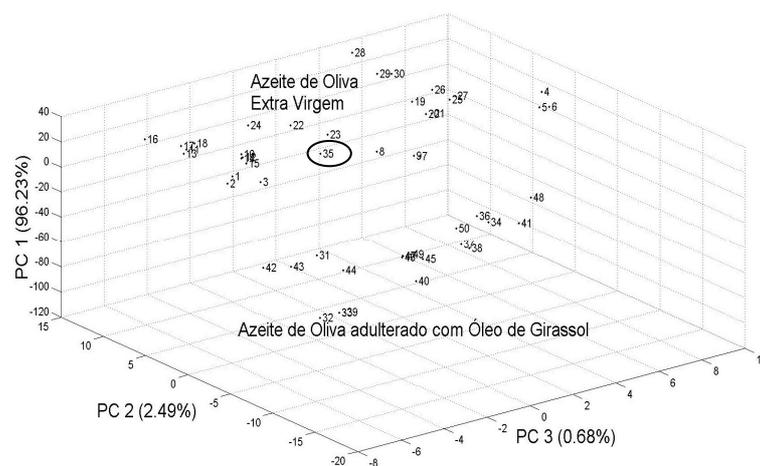


Figura 5.12: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de girassol (com 1 a 20% m/m).

A Figura 5.12 mostra o gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, onde se verifica a formação de dois grupos: amostras adulteradas (31-50) e não adulteradas (1-30). Note que a amostra 35, contaminada com 5% m/m de óleo de girassol (indicada no gráfico), se confundiu com as amostras de azeite de oliva extra virgem originais, num resultado semelhante ao observado na análise por HCA (Figura 5.11). Neste modelo, as três primeiras PCs explicaram 99,40% da variância total (Tabela 5.5).

Os modelos de adulteração com óleo de girassol (HCA e PCA), construído com os dados dos ESI(+)-MS não apresentaram uma boa separação entre os dois tipos de amostras (originais e adulteradas) e, por isso, não foram incluídos neste trabalho.

#### **5.4 Adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleo de canola: análises exploratórias (HCA e PCA) aplicadas aos dados de ESI-MS**

Foi feito também um estudo sobre a adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleo de canola, sendo que as adulterações foram feitas da mesma maneira que nos exemplos anteriores. Na Figura 5.13, que mostra o dendrograma obtido da análise de HCA com os dados dos ESI(-)-MS, pode-se ver que nenhuma amostra ficou agrupada de modo inconsistente; no entanto, algumas amostras adulteradas (31-50) ficaram mais próximas do grupo das não adulteradas (1-30).



Figura 5.13: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(-)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m).

Tabela 5.6: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de X	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$1,04 \times 10^3$	71,30	71,30
2	$2,88 \times 10^2$	19,84	91,14
3	46,9	3,23	94,37
4	28,0	1,93	96,30
5	14,4	0,99	97,29

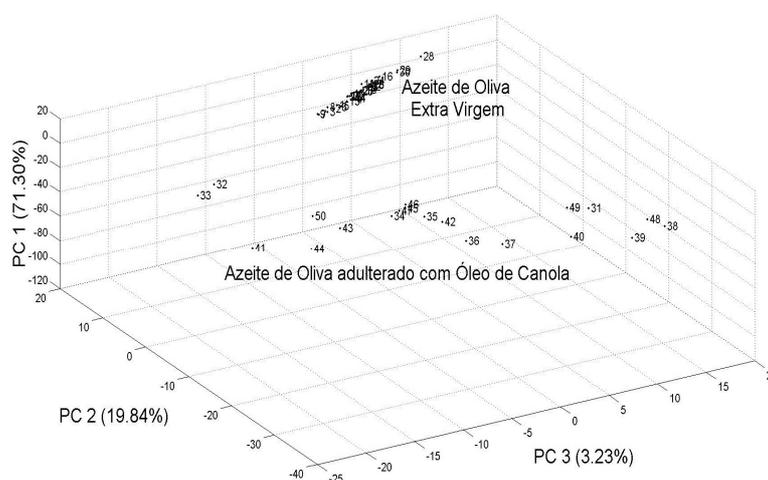


Figura 5.14: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(-)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m).

O gráfico de escores (Figura 5.14), construído com as três primeiras componentes principais, mostra que a PC1 foi responsável pela separação entre as amostras adulteradas e não adulteradas. Além disso, note que as amostras adulteradas ficaram mais dispersas no espaço em relação às não adulteradas. Neste modelo de PCA, as cinco primeiras PCs explicaram 97,29% da variância total (Tabela 5.6).

As análises com os dados dos ESI(+)-MS também foram realizadas e o dendrograma obtido (Figura 5.15) indica a formação de dois grupos bem definidos, amostras adulteradas (31-50) e não adulteradas (1-30). Conclusões semelhantes podem ser obtidas a partir da análise do gráfico de escores (Figura 5.16). A primeira

componente foi a principal responsável pela separação dos grupos. Neste modelo de PCA com sete PCs, 93,75% da variância total foi explicada (Tabela 5.7).

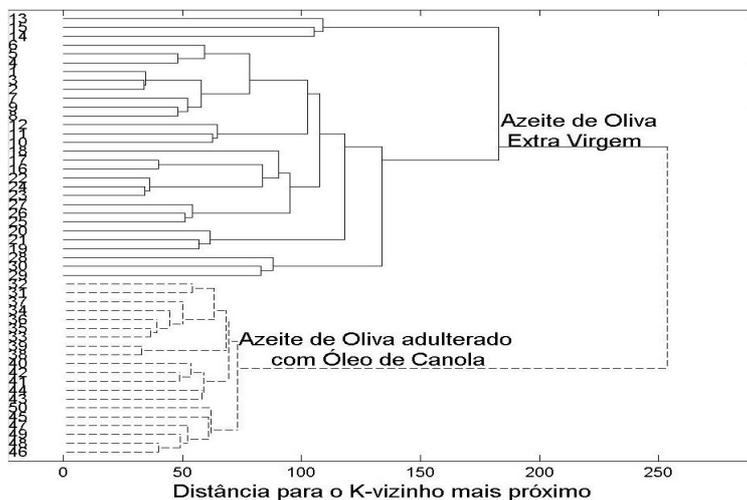


Figura 5.15: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(+)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m).

Tabela 5.7: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de $\mathbf{X}$	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$1,97 \times 10^4$	64,81	64,81
2	$4,14 \times 10^3$	13,59	78,40
3	$2,17 \times 10^3$	7,13	85,53
4	$9,15 \times 10^2$	3,00	88,53
5	$7,61 \times 10^2$	2,50	91,03
6	$5,25 \times 10^2$	1,72	92,76
7	$3,03 \times 10^2$	0,99	93,75

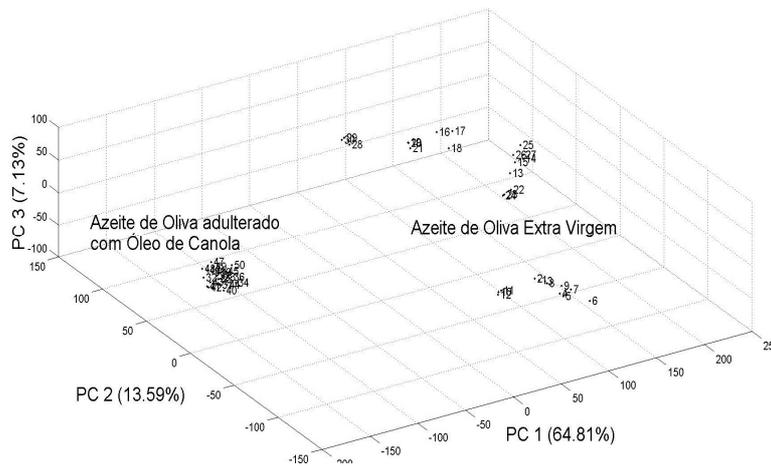


Figura 5.16: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de óleo de canola (com 1 a 20% m/m).

### ***5.5 Adulteração de azeite de oliva extra virgem com azeite de oliva puro: análises exploratórias (HCA e PCA) aplicadas aos dados de ESI-MS***

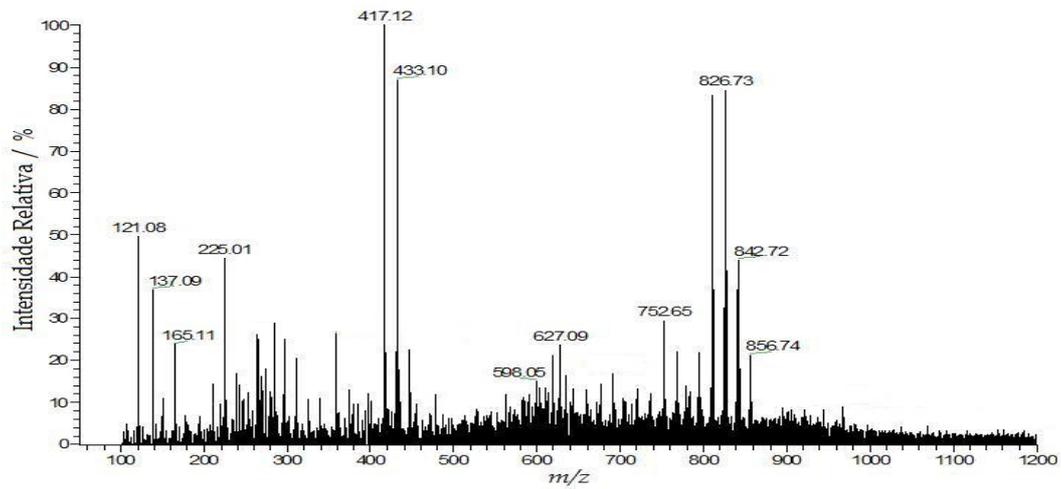
Neste trabalho, investigou-se, também, a adulteração de azeite de oliva extra virgem com azeite de oliva puro. Dentre todas as adulterações estudadas até o momento, é a fraude mais difícil de ser detectada. Com isso, esta é uma das partes mais importantes do trabalho. Como já mencionado no Capítulo 4, os ESI(-)-MS não permitiram a caracterização inequívoca destes dois tipos de azeite. Portanto, para o estudo de adulteração, somente os dados dos ESI(+)-MS (a Figura 5.17 mostra três exemplos de tais espectros, azeite de oliva extra virgem adulterado com 0, 10 e 20 % m/m azeite de oliva puro), foram levados em consideração. As amostras adulteradas foram preparadas através da seleção de um único azeite de oliva extra virgem, ao qual foi adicionado proporções crescentes de um azeite de oliva puro (1 a 20 % m/m, com intervalos de 1% m/m).

Na Figura 5.18, o dendrograma resultante da análise de HCA mostra a separação nítida entre os grupos das amostras adulteradas (41-50) e não adulteradas (1-30), apesar da grande semelhança entre ambos os tipos de amostra. No gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais (Figura 5.19), pode-se perceber a formação de dois grupos bem definidos: amostras de azeite de oliva extra

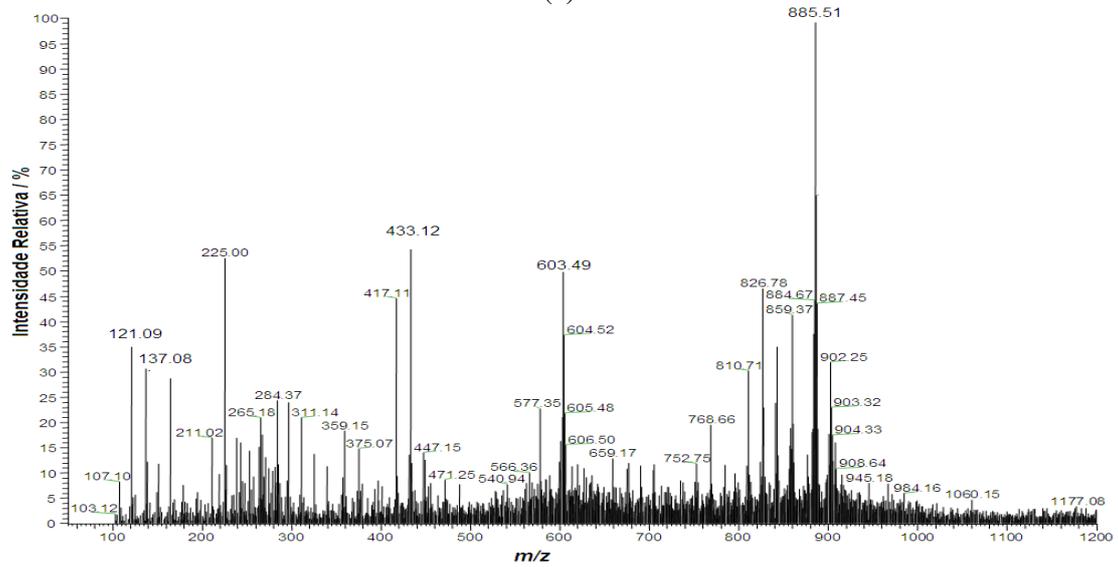
virgem (1-30) e adulteradas pela adição de azeite de oliva puro (31-50). Note que as amostras adulteradas tenderam a formar um agrupamento mais coeso; isso acontece porque utilizou-se 10 marcas diferentes de azeites de oliva extra virgem. Neste modelo, com quatro PCs foi possível explicar 93,94% da variância total (Tabela 5.8).

Para uma melhor visualização da separação entre os agrupamentos formados pelos azeites (extra virgem e puro) e pelas amostras adulteradas, uma matriz com os dados ESI(+)-MS das amostras de azeite de oliva extra virgem (1-30), azeite de oliva extra virgem adulterado com oliva puro (31-50) e azeite de oliva puro (51-60) foi construída e usada para as análises de HCA e PCA. No dendrograma da Figura 5.20 é possível observar que os grupos se separaram de acordo com a classificação esperada, com exceção das amostras 53 e 55 (azeite de oliva puro), as quais se confundiram com as amostras extra virgem.

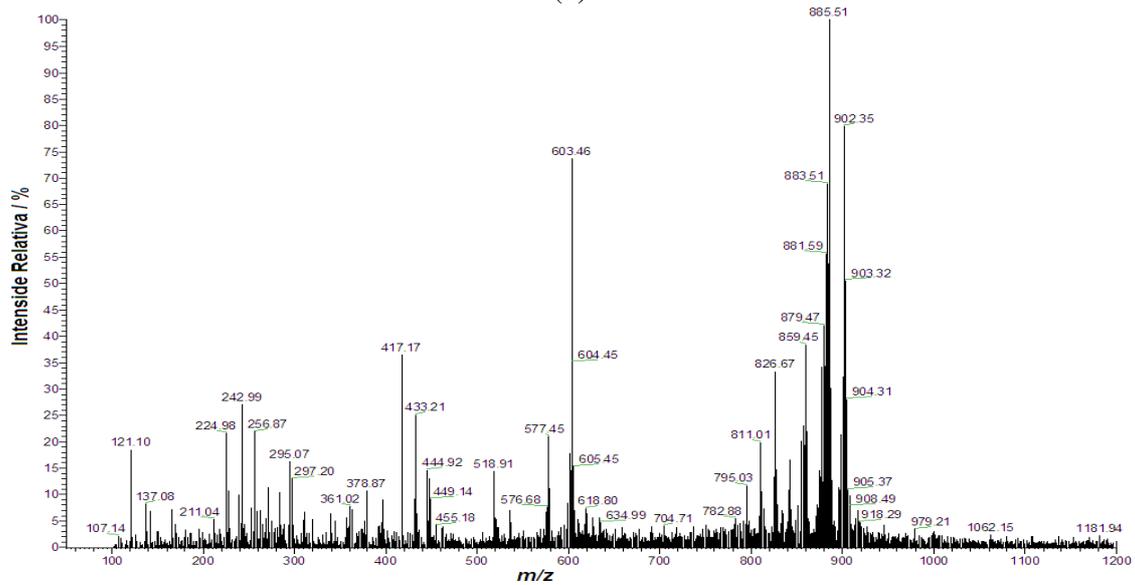
Pelo gráfico de escores (Figura 5.21), construído com as componentes 1, 2 e 4, houve uma nítida separação dos grupos de acordo com a origem dos azeites de oliva (extra virgem e puro) e amostras adulteradas. Neste modelo, a quarta componente foi a principal responsável pela separação dos grupos. Além disso, com seis PCs explicou-se 94,03% da variância total (Tabela 5.9).



(a)



(b)



(c)

Figura 5.17: ESI(+)-MS de amostras adulteradas de azeite de oliva extra virgem com as seguintes concentrações de azeite de oliva puro: (a) 0% m/m; (b) 10% m/m e (c) 20% m/m.

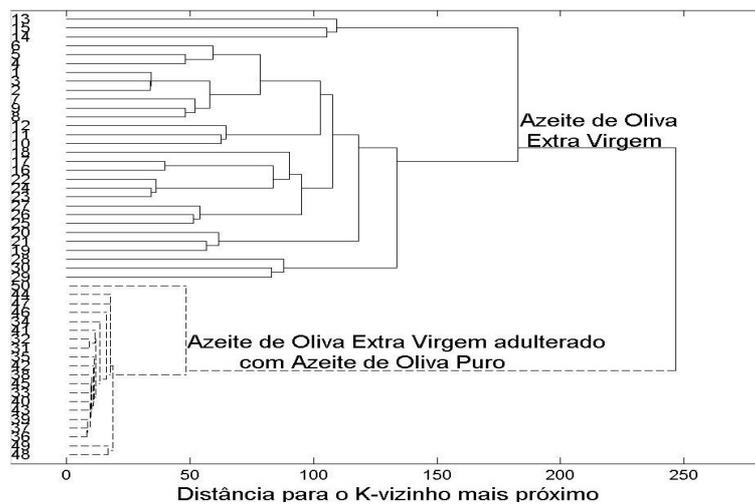


Figura 5.18: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(+)-MS de amostras azeite de oliva extra virgem originais (amostras 1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de azeite de oliva puro (com 1 a 20% m/m).

Tabela 5.8: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras dos azeites de oliva extra virgem originais (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de azeite de oliva puro (com 1 a 20% m/m)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de X	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$2,26 \times 10^4$	72,89	72,89
2	$3,91 \times 10^3$	12,60	85,49
3	$1,98 \times 10^3$	6,38	91,87
4	$6,43 \times 10^2$	2,07	93,95

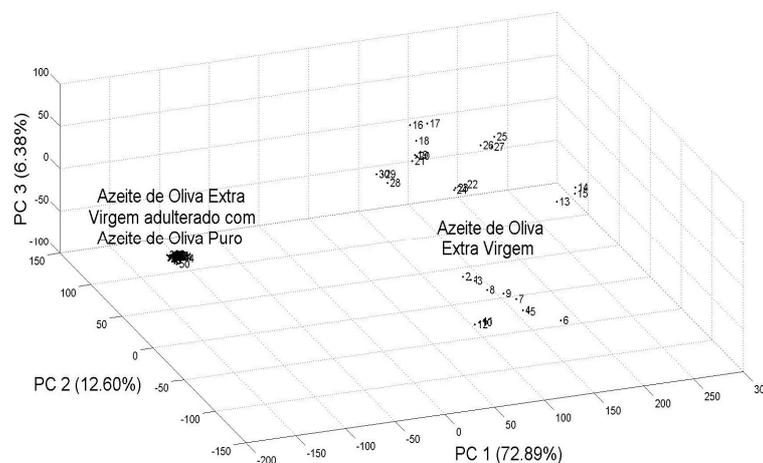


Figura 5.19: Gráfico de escores, construído com as três primeiras componentes principais, obtido a partir dos dados dos ESI(+)-MS das amostras originais dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e adulteradas (31-50) pela adição de azeite de oliva puro (com 1 a 20% m/m).

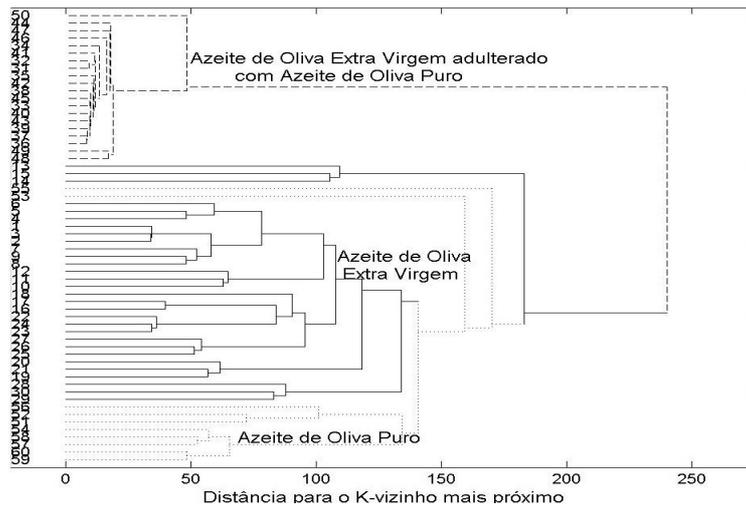


Figura 5.20: Dendrograma obtido a partir dos dados de ESI(+)-MS de azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (51-60) e amostras adulteradas (31-50, preparadas pela seleção de um azeite de oliva extra virgem, ao qual foram adicionadas quantidades crescentes (1 a 20% m/m) de um azeite de oliva puro específico).

Tabela 5.9: Autovalores, variância explicada para cada componente principal e variância acumulada calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS dos azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (51-60) e amostras adulteradas (31-50, preparadas pela seleção de um azeite de oliva extra virgem, ao qual foram adicionadas quantidades crescentes (1 a 20% m/m) de um azeite de oliva puro específico)

Componente Principal	Autovalor para a matriz de covariância de $X$	% de variância explicada para cada CP	Variância acumulada
1	$1,95 \times 10^4$	60,18	60,18
2	$6,50 \times 10^3$	20,10	80,28
3	$2,23 \times 10^3$	6,90	87,18
4	$1,22 \times 10^3$	3,76	90,94
5	$5,19 \times 10^2$	1,61	92,55
6	$4,80 \times 10^2$	1,48	94,03

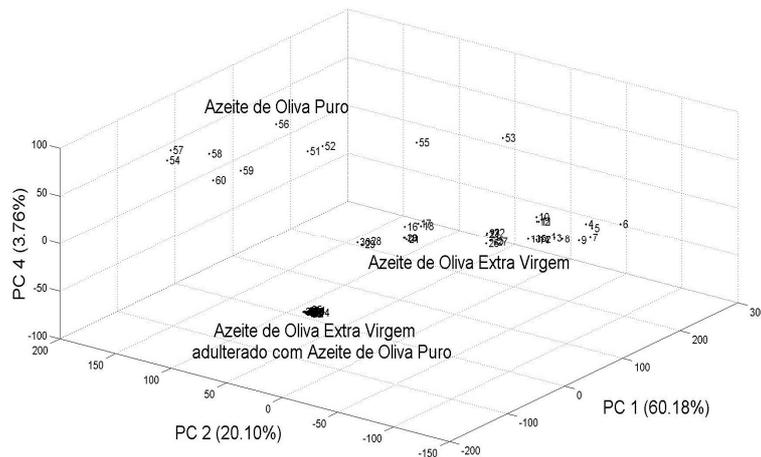


Figura 5.21: Gráfico de escores, construído com PC1, PC2 e PC4, de azeites de oliva extra virgem (1-30) e puro (51-60) e amostras adulteradas (31-50, preparadas pela seleção de um azeite de oliva extra virgem, ao qual foram adicionadas quantidades crescentes (1 a 20% m/m) de um azeite de oliva puro específico).

### 5.6 Quantificação do teor óleo de soja em amostras de azeite de oliva extra virgem adulteradas: calibração multivariada(PLS) aplicada aos dados de ESI-MS

Para quantificar o teor de óleo de soja presente em amostras adulteradas de azeite de oliva extra virgem, foi preparado uma série de padrões. Quarenta amostras foram adulteradas propositalmente pela adição de um óleo de soja a um azeite de oliva extra virgem específico. As concentrações de óleo de soja variaram de 0,5 a 20,0% (m/m), com um intervalo de 0,5% m/m. As extrações foram feitas em triplicata e o valor médio das intensidades relativas dos sinais nos espectros de massas foi utilizado na construção da matriz. Foram construídos modelos para os dados dos espectros adquiridos nos modos negativo e positivo.

#### 5.6.1 Calibração multivariada com os dados dos ESI(-)-MS

Na construção do modelo de calibração (Tabela 5.10) e conjunto de previsão (Tabela 5.11) utilizou-se 30 e 10 amostras, respectivamente.

Tabela 5.10: Concentração das amostras utilizadas na construção do modelo de calibração com o valor real, o valor calculado pelo modelo e o erro de cada previsão. Tais resultados foram calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS

Amostra	Valor real Concentração % m/m	Valor previsto Concentração % m/m	Erro %
1	0,4434	0,3672	17,1809
2	1,0498	0,8851	15,6916
3	1,6556	1,7586	6,2213
4	2,1480	2,2550	4,9814
5	2,5008	2,4642	1,4635
6	3,2282	3,1776	1,5674
7	3,7319	3,7634	0,8441
8	4,6945	4,8893	4,1495
9	5,2021	5,0607	2,7181
10	5,5381	5,5585	0,3684
11	8,0695	8,1098	0,4994
12	8,6725	8,8922	2,5333
13	10,5970	10,4050	1,8118
14	11,2070	11,2360	0,2588
15	12,1090	12,2350	1,0405
16	12,5450	12,6520	0,8529
17	13,2220	12,9580	1,9967
18	13,5400	13,6220	0,6056
19	14,0700	13,8840	1,3220
20	14,4590	14,5430	0,5810
21	15,4600	15,3230	0,8862
22	16,1120	15,9620	0,9310
23	16,6750	16,7240	0,2939
24	16,9800	17,2050	1,3251
25	17,4450	17,4610	0,0917
26	18,0100	18,0390	0,1610
27	18,5240	18,5660	0,2267
28	19,1170	19,0940	0,1203
29	19,5900	19,5240	0,3369
30	20,0810	20,0630	0,0896

Este primeiro modelo apresentou valores de erro bem satisfatórios, como visto nos resultados apresentados na Tabela 5.10, sendo que os maiores erros observados são os referentes às amostras com aproximadamente 0,5% e 1,0% de adulterante, isso é perfeitamente aceitável, visto que a concentração do adulterante é muito pequena. A Figura 5.22 mostra o gráfico dos valores previsto *versus* real para os teores de óleo de soja nas amostras adulteradas de azeite de oliva extra virgem. Nesta curva estão representadas as 30 amostras do conjunto de calibração (com as concentrações real e prevista mostradas na Tabela 5.10) com um coeficiente de correlação (R) excelente, calculado como sendo 0,99981. Pode-se observar pelo gráfico que a inclinação da reta é muito próxima de 1 e o intercepto é praticamente zero, esse dois parâmetros indicam a boa qualidade do modelo e a ausência de erros sistemáticos na previsão.

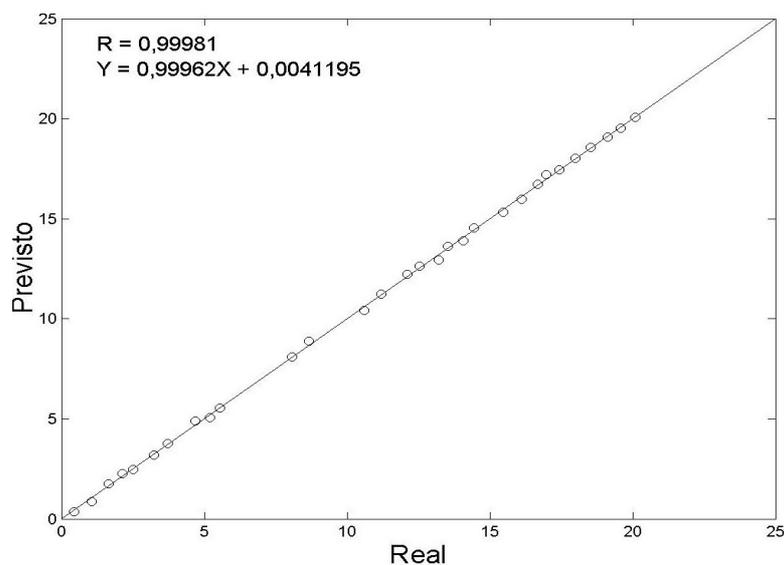


Figura 5.22: Curva dos valores previsto *versus* real para os teores de óleo de soja nas 30 amostras (conjunto de calibração) adulteradas de azeite de oliva extra virgem. Tal gráfico foi obtido com base nos dados dos ESI(-)-MS.

As 10 amostras utilizadas para a validação externa (o conjunto de previsão), foram escolhidas de forma aleatória por um comando no programa Matlab chamado *Kenston*. Tais 10 amostras foram retiradas da matriz inicial (composta pelas 40 amostras adulteradas) e as 30 amostras restantes foram utilizadas na construção do modelo de calibração. Em sequência, a qualidade de tal modelo foi aferida através da determinação da concentração de cada uma das 10 amostras retiradas. Os erros de

previsão observados são mostrados na Tabela 5.11. Conforme esperado [38], os erros do conjunto de previsão (Tabela 5.11) foram maiores que os erros do conjunto de calibração (Tabela 5.10). Na Figura 5.23, a curva dos valores previsto *versus* real para os teores de óleo de soja nas 10 amostras do conjunto de previsão mostra um ajuste inferior ( $R = 0,98572$ ) ao observado para o conjunto de calibração ( $R = 0,99981$ ). Como foi discutido no modelo anterior, não se pode deixar de comentar a inclinação da reta próxima de 1 e o intercepto praticamente zero, dois parâmetros que provam a ausência de erros sistemáticos.

Tabela 5.11: Concentração das amostras utilizadas na validação do modelo de calibração com o valor real, o valor calculado pelo modelo e o erro de cada previsão. Tais resultados foram calculados a partir dos dados dos ESI(-)-MS

Amostra	Valor real Concentração % m/m	Valor previsto Concentração % m/m	Erro %
1	4,1375	4,6633	12,70816
2	6,0476	5,3316	11,83941
3	6,7426	7,1028	5,342153
4	7,0167	7,5257	7,254122
5	7,6407	7,5729	0,887353
6	9,0492	8,1106	10,37219
7	9,4226	9,3399	0,877677
8	10,184	9,7205	4,551257
9	11,615	11,2170	3,426604
10	15,171	15,5720	2,643201

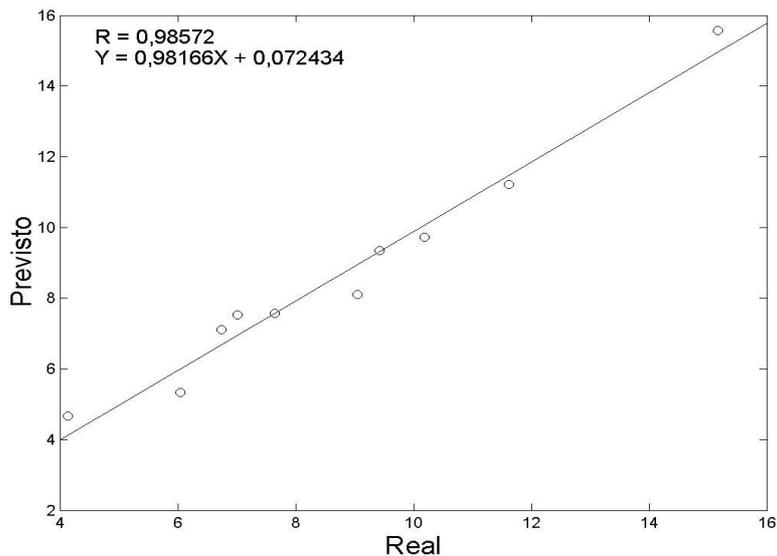


Figura 5.23: Curva dos valores previsto *versus* real para os teores de óleo de soja nas 10 amostras (conjunto de previsão) adulteradas de azeite de oliva extra virgem. Tais resultados, utilizados na validação do modelo de calibração, foram obtidos a partir dos dados dos ESI(-)-MS.

Para avaliar a eficiência do modelo foram calculados os valores dos erros quadráticos para o conjunto de calibração (RMSEC) e previsão (RMSEP) foram 0,1229 % m/m e 0,5103 % m/m, respectivamente. Esse valores são muito bons, pois adulterou-se o azeite com concentrações de 0,5 até 20% de óleo de soja e o erro foi em torno de 0,5%.

### 5.6.2 Calibração multivariada com os dados dos ESI(+)-MS

A mesma metodologia descrita no ítem anterior foi empregada para o conjunto de dados advindos dos ESI(+)-MS. Das 40 amostras iniciais, uma (contendo 0,5% m/m de óleo de soja) foi retirada do conjunto de dados porque apresentou erros muito elevados e estava causando distorções no modelo de calibração. Deste modo, das 39 amostras aceitáveis, 30 foram utilizadas para construção do modelo de calibração (Tabela 5.12) e nove escolhidas aleatoriamente (pelo comando *Kenston* da programa Matlab) para validação externa (Tabela 5.13).

Os erros para o modelo de calibração apresentaram valores satisfatórios (Tabela 5.12). Na Figura 5.24 pode-se ver o gráfico do valor previsto em função do valor real

para o teor de óleo de soja das amostras do conjunto de calibração. Tal curva apresentou um ótimo ajuste, com um coeficiente de correlação (R) igual a 0,99984. O gráfico de valor previsto *versus* valor real para as amostras do conjunto de validação externa (Figura 5.25) também apresentou um bom ajuste com  $R = 0,99117$ . E ambos os gráficos (Figura 5.24 e 5.25) apresentaram inclinação da reta muito próxima de 1 e o intercepto praticamente zero, esse dois parâmetros indicam a boa qualidade do modelo e a ausência de erros sistemáticos na previsão.

Para este conjunto de dados, também foram calculados os valores dos erros quadrático de calibração (RMSEC) e validação externa (RMSEP). Os valores obtidos foram 0,1008 % m/m e 0,6892 % m/m, respectivamente, similares aos obtidos com os dados provenientes dos ESI(-)-MS (0,1229 e 0,5103, respectivamente). Estes valores mostram-se satisfatórios, uma vez que foi estudada a adulteração de azeite de oliva com óleo de soja até 20% e o erro máximo foi de aproximadamente 0,7% e isso é muito baixo em termos de adulteração.

Outros autores fizeram estudos de adulteração em azeite de oliva por óleo de soja [49] em análises semelhantes utilizando-se a técnica IV e apresentam valores de erros maiores que os calculados no presente trabalho.

O presente trabalho foi o primeiro a realizar quantificações de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem, utilizando ESI-MS e calibração multivariada.

Tabela 5.12: Concentração das amostras utilizadas na construção do modelo de calibração com o valor real, o valor calculado pelo modelo e o erro de cada previsão. Tais resultados foram calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS

Amostra	Valor real Concentração % m/m	Valor previsto Concentração % m/m	Erro %
1	1,0498	1,0471	0,2572
2	1,6556	1,8191	9,8756
3	2,1480	2,0736	3,4637
4	2,5008	2,5359	1,4036
5	3,2282	3,3006	2,2427
6	3,7319	3,6872	1,1978
7	4,1375	3,9626	4,2272
8	5,2021	5,2877	1,6455
9	5,5381	5,5714	0,6013
10	6,0476	6,0068	0,6746
11	6,7426	6,6898	0,7831
12	7,0167	7,1125	1,3653
13	8,0695	8,0808	0,1400
14	9,0492	8,9200	1,4278
15	9,4226	9,3138	1,1547
16	10,184	10,1300	0,5302
17	10,5970	10,5490	0,4530
18	11,2070	11,4400	2,0791
19	11,615	11,5810	0,2927
20	12,1090	12,0370	0,5946
21	12,5450	12,6490	0,8290
22	14,0700	14,0450	0,1777
23	14,4590	14,4840	0,1729
24	15,171	15,2890	0,7778
25	15,4600	15,4790	0,1229
26	16,6750	16,4940	1,0855
27	17,4450	17,5640	0,6821
28	18,5240	18,3440	0,9717
29	19,1170	19,1200	0,0157
30	20,0810	20,1860	0,5229

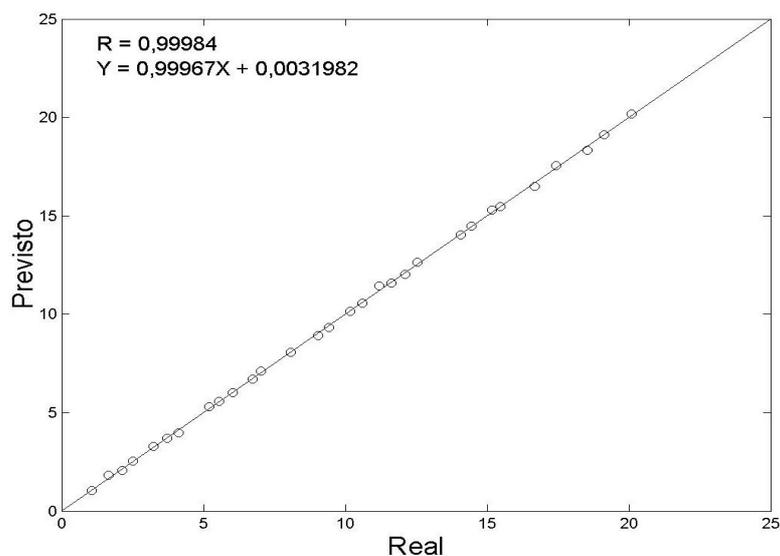


Figura 5.24: Curva dos valores previsto *versus* real para os teores de óleo de soja nas 30 amostras (conjunto de calibração) adulteradas de azeite de oliva extra virgem. Tal gráfico foi obtido com base nos dados dos ESI(+)-MS.

Tabela 5.13: Concentração das amostras utilizadas na validação do modelo de calibração com o valor real, o valor calculado pelo modelo e o erro de cada previsão. Tais resultados foram calculados a partir dos dados dos ESI(+)-MS

Amostra	Valor real Concentração % m/m	Valor previsto Concentração % m/m	Erro %
1	4,6945	4,3635	7,050804
2	7,6407	8,3521	9,310665
3	8,6725	9,9403	14,61862
4	13,222	14,245	7,737105
5	13,54	13,707	1,233383
6	16,112	15,327	4,872145
7	16,98	17,2000	1,295642
8	18,01	17,467	3,014992
9	19,59	19,725	0,689127

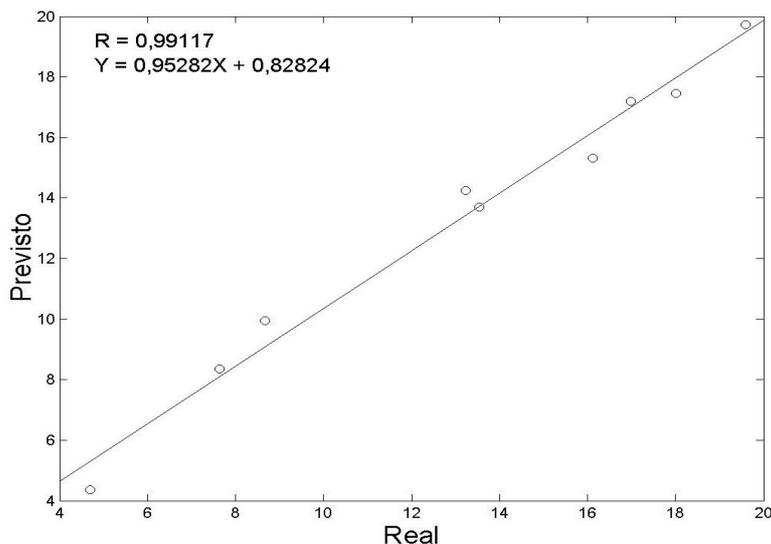


Figura 5.25: Curva dos valores previsto *versus* real para os teores de óleo de soja nas 9 amostras (conjunto de previsão) adulteradas de azeite de oliva extra virgem. Tais resultados, utilizados na validação do modelo de calibração, foram obtidos a partir dos dados dos ESI(+)-MS.

### 5.7 Conclusões Parciais

A espectrometria de massas com ionização *electrospray* mostrou ser eficiente na detecção de adulteração em amostras de azeite de oliva extra virgem pela adição de óleos vegetais (soja, milho, canola, girassol), ou mesmo de azeite de oliva puro. Os dados dos ESI(-)-MS e ESI(+)-MS, tratados por PCA e HCA, permitiram, a detecção de tais fraudes em níveis tão baixos quanto 1,0% m/m. Os modelos de PCA, obtidos para o estudo dos cinco óleos adulterantes, explicaram acima de 90% da variância total dos dados, mesmo quando um número relativamente pequeno de componentes principais foi empregado.

A aplicação de calibração multivariada (através da regressão por mínimos quadrados parciais, PLS) aos dados dos ESI(-)-MS e ESI(+)-MS de amostras de óleo de oliva extra virgem adulteradas com óleo de soja permitiu a construção de modelos que apresentaram excelente concordância entre os valores reais e previstos para o teor de óleo de soja e com erros quadráticos médios de calibração (RMSEC) e previsão (RMSEP) inferiores a metodologias similares descritas na literatura.

## CAPÍTULO 6

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

A espectrometria de massas com ionização *electrospray* (ESI-MS) mostrou ser uma técnica valiosa para a caracterização de vários tipos de insumos vegetais (azeites de oliva extra virgem e puro e óleos de soja, milho, girassol e canola). A metodologia desenvolvida apresentou um mínimo preparo de amostras e a técnica utilizada permite uma rápida aquisição de dados. Quando estes dados dos foram tratados por técnicas quimiométricas de análise exploratória (PCA e HCA), uma clara distinção entre tais óleos vegetais e azeites de oliva (incluindo a diferenciação dos azeites extra virgem e puro) foi inequivocamente visualizada. Igualmente, adulterações em amostras de azeite de oliva extra virgem pela adição de azeite de oliva puro e demais óleos vegetais puderam ser facilmente detectadas em níveis tão baixos quanto 1% m/m. Uma nova metodologia, baseada no tratamento dos dados dos ESI-MS por métodos de calibração multivariada (PLS), foi desenvolvida no presente trabalho. Tal metodologia permitiu a detecção dos teores de óleo de soja, em amostras adulteradas de azeite de oliva extra virgem, com erros de previsão muito pequenos. Em conclusão, acreditamos que os resultados descritos nesta dissertação poderão ser utilizados pelos consumidores e órgão de controle azeite de oliva, visando um melhor controle de qualidade e, conseqüentemente, uma maior valorização deste produto.

## CAPÍTULO 7

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baccouri, O., et al., *Comparative study on volatile compounds from Tunisian and Sicilian monovarietal virgin olive oils*. Food Chemistry, 2008. **111**: p. 322–328.
2. Cardoso, L.G.V., *Características físico-químicas e avaliação do perfil de ácidos graxos de azeite obtidos de diferentes variedades de oliveira introduzidas em Minas Gerais - Brasil.*, in *Alimentos*. 2006, Universidade Federal de Lavras: Lavras. p. 89.
3. Aued-Pimentel, S., et al., *Calculation of the difference between the actual and theoretical ECN 42 triacylglyceride content to detect adulteration in olive oil samples commercialized in Brazil*. Quimica Nova, 2008. **31**(1): p. 31-34.
4. Guimet, F., J. Ferre, and R. Boque, *Rapid detection of olive-pomace oil adulteration in extra virgin olive oils from the protected denomination of origin "Siurana" using excitation-emission fluorescence spectroscopy and three-way methods of analysis*. Analytica Chimica Acta, 2005. **544**(1-2): p. 143-152.
5. Pio, R., et al., *Rooting of different types of olive (olea europaea L.) tree cutting using indol butyric acid*. Ciênc. agrotec, 2005. **29**(3): p. 6.
6. Oi-Kano, Y., et al., *Extra virgin olive oil increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007. **18**: p. 685–692.
7. Pereira, M.C.D.A. and M.d.F.P. Barcelos, *Technological and nutritinal aspects of olive oil* Hig. aliment, 2003. **17**(106): p. 8.
8. *Breve em sua casa: Azeite de oliva 'Made in Minas Gerais'!* Estado de Minas - 20 de janeiro 2008.
9. Aued-Pimentel, S., et al., *Azeite de Oliva: Incidência de Adulterações entre os Anos de 1993 a 2000*. Inst. Adolfo Lutz, 2002. **61**: p. 69.
10. Christopoulou, E., et al., *Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils*. Food Chemistry, 2004. **84**: p. 463–474.
11. Vaclavik, L., et al., *Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment*. Analytica Chimica Acta, 2009. **645**(1-2): p. 56-63.
12. Catharino, R.R., et al., *Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: Classification, quality, adulteration, and aging*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(22): p. 7429-7433.
13. Solomons, G. and G. Fryhle, *Química Orgânica*, LTC, Editor. 2002: Rio de Janeiro.
14. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Bioquímica*, G. Koogan, Editor. 2004: Rio de Janeiro.
15. Kachouri, F. and M. Hamdi, *Enhancement of polyphenols in olive oil by contact with fermented olive mill wastewater by Lactobacillus plantarum*. Process Biochemistry 2004. **39**: p. 841–845.
16. <http://www.asae.pt/>. Acesso 04/02/2009 às 11:30h.
17. Lerma-Garcia, M.J., et al., *Evaluation of the quality of olive oil using fatty acid profiles by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry*. Food Chemistry, 2008. **107**(3): p. 1307-1313.
18. <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18829&word=>. Acesso 07/12/2009 às 9:30h.

19. Silverstein, R.M. and F.X. Webster, *Identificação Espectrométrica de compostos Orgânicos*, LTC, Editor. 2000: Rio de Janeiro.
20. Fenn, J.B., et al., *Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
21. Crotti, A.E.M., et al., *Electrospray ionization mass spectrometry: Chemical processes involved in the ion formation from low molecular weight organic compounds*. Quimica Nova, 2006. **29**(2): p. 287-292.
22. Gaskell, S.J., *Electrospray: principles and practice*. J. Mass Spectrom., 1997. **32**(7): p. 677-688.
23. Mauri, P. and P. Pietta, *Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts*. J. Pharm. Biom. Anal., 2000. **23**(1): p. 61-68.
24. Cooper, H.J. and A.G. Marshall, *Electrospray ionization Fourier transform mass spectrometric analysis of wine*. J. Agric. Food Chem., 2001. **49**(12): p. 5710-5718.
25. Araujo, A.S., et al., *Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer*. Analyst, 2005. **130**(6): p. 884-889.
26. Moller, J.K.S., R.R. Catharino, and M.N. Eberlin, *Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity*. Analyst, 2005. **130**(6): p. 890-897.
27. Wu, Z.G., R.P. Rodgers, and A.G. Marshall, *Characterization of vegetable oils: Detailed compositional fingerprints derived from electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(17): p. 5322-5328.
28. Neto, W.B., *Parâmetro de qualidade de lubrificantes e óleo de oliva através de espectroscopia vibracional, calibração multivariada e seleção de variáveis*, in *Química Analítica*. 2005, Universidade Estadual de Campinas Campinas
29. Bruns, R.E. and J.F.G. Faigle, *Quimiometria*. Quimica Nova, 1985: p. 84-99.
30. Hotelling, H., *Analysis of a complex of statistical variables into Principal Components*. The Journal of Education Psychology, 1933.
31. Neto, B.D.B., I.S. Scarminio, and R.E. Bruns, *25 years of chemometrics in Brazil*. Quimica Nova, 2006. **29**(6): p. 1401-1406.
32. Vandeginste, B.G.M., et al., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Parte B*, Elsevier, Editor. 1998: Amsterdam.
33. Mingoti, S.A., *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: Uma abordagem aplicada*, UFMG, Editor. 2007: Belo Horizonte.
34. Borges, E.C.L., et al., *Study of complexation capacity and its relationship with some environmental variables in five reservoirs of the Tiete river system*. Quimica Nova, 2007. **30**(7): p. 1505-1511.
35. Johnson, M., *Waveform based clustering and classification of AE transients in composite laminates using principal component analysis*. NDT&E International, 2001. **35**: p. 367-376.
36. Santos, R.J., *Um curso de geometria analítica e álgebra linear* I.U.d. UFMG, Editor. 2003: Belo Horizonte.
37. Reid, M.K. and K.L. Spencer, *Use of principal components analysis (PCA) on estuarine sediment datasets: The effect of data pre-treatment*. Environmental Pollution, 2009. **157**(8-9): p. 2275-2281.
38. Gemperline, P., *Practical Guide to chemometrics* T.F. Group, Editor. 2006: New York.

39. de Souza, P.P., et al., *Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of Brazilian artisan cachaca aged in different wood casks*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(6): p. 2094-2102.
40. Sarmiento, S.B.S., et al., *Physical, physicochemical and functional properties of cassava starch chemometric analysis*. Brazilian Journal of food technology, 1999. **2**: p. 131-137.
41. Torres, E.A.F.D., M.L. Garbelotti, and J.M.M. Neto, *The application of hierarchical clusters analysis to the study of the composition of foods*. Food Chemistry, 2006. **99**(3): p. 622-629.
42. Prates, R.G.D., *Utilização da técnica ESI-MS aliada a ferramentas quimiométricas para discriminação e quantificação de biodiesel de diferentes matérias - primas e suas misturas com diesel.*, in *Química Analítica*. 2009, Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte. p. 99.
43. Ragno, G., M.D. Luca, and G. Ioele, *An application of cluster analysis and multivariate classification methods to spring water monitoring data*. Microchemical Journal, 2007. **87**: p. 119-127.
44. Silva, F.V., M.Y. Kamogawa, and M.M.C. Ferreira, *Discriminação geográfica de águas minerais do estado de São Paulo através da análise exploratória* Eclética Química, 2002. **27**: p. 8.
45. Morgano, M.A., S.C.d.N.d. Queiroz, and M.M.C. Ferreira, *Application of Exploratory Analysis to the Differentiation of vegetables*. Brazilian Journal of food technology, 1999. **2**: p. 73-79.
46. Lee, Y., H. Chung, and M.A. Arnold, *Improving the robustness of a partial least squares (PLS) model based on pure component selectivity analysis and range optimization: Case study for the analysis of an etching solution containing hydrogen peroxide*. Analytica Chimica Acta 2006. **572**: p. 93–101.
47. Barthus, R.C., L.H. Manzo, and R.J. Poppi, *Aplicação de métodos de calibração multivariada para determinação simultânea de Riboflavina (VB2), Tiamina (VB1), Piridoxina (VB6), e Nicotinamida (VPP)*. Quimica Nova, 2007. **30**: p. 1638-1643.
48. Ozen, B.F., I. Weiss, and L.J. Mauer, *Dietary supplement oil classification and detection of adulteration using Fourier transform infrared spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(20): p. 5871-5876.
49. Christy, A.A., et al., *The detection and quantification of adulteration in olive oil by near-infrared spectroscopy and chemometrics*. Analytical Sciences, 2004. **20**(6): p. 935-940.
50. BIESALSKI, H.K., *Vitamin E Requirements in Parenteral Nutrition*. GASTROENTEROLOGY, 2009. **137**: p. S92–S104.