

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Júnia de Oliveira Alves

**Controle de qualidade de azeite de oliva extra virgem e
misturas diesel/biodiesel utilizando espectrometria de massas
e validação multivariada**

BELO HORIZONTE

2014

UFMG/ICE_x/DQ. 1043^a

T. 472^a

Júnia de Oliveira Alves

**Controle de qualidade de azeite de oliva extra virgem e misturas diesel/biodiesel
utilizando espectrometria de massas e validação multivariada**

**Tese apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas
da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor – Ciências
Química.**

BELO HORIZONTE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A474c Alves, Júnia de Oliveira.
Controle de Qualidade de Azeite de Oliva Extra Virgem e Misturas Diesel/Biodiesel Utilizando Espectrometria de Massas e Validação Multivariada. / Júnia de Oliveira Alves
124p. : il. color.

Orientador: Prof. Rodinei Augusti
Coorientador: Prof. Marcelo Martins de Sena

Tese de doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais.
Inclui bibliografia.

1. Azeite de Oliva 2. Diesel b 3. Espectrometria de massas
4. Quimiometria I. Augusti, Rodinei, Orientador II. Sena, Marcelo Martins de. III Título

CDU 043



"Controle de Qualidade de Azeite de Oliva Extra Virgem e Misturas Diesel/Biodiesel Utilizando Espectrometria de Massas e Validação Multivariada"

Júnia de Oliveira Alves

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG

Prof. Marcelo Martins de Sena - Coorientador
UFMG

Profa. Rosineide Costa Simas
UNICAMP

Prof. Cleiton Antônio Nunes
UFLA

Profa. Leticia Malta Costa
UFMG

Prof. Helvécio Costa Menezes
UFMG

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais, Jorge e Lurdinha, em especial à minha mãe que sempre me incentivou e mesmo nos momentos mais delicados da sua vida sempre esteve firme e de cabeça erguida, um exemplo para mim...

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força e fé, pois nada disso seria possível se ele não estivesse cuidando de mim durante a caminhada.

Aos meus pais pelo amor que não tem medida, por serem exemplo de vida e por sempre me guiarem pelo caminho do bem. Infelizmente minha querida mãe se transformou em um anjo e hoje não está presente de corpo para comemorar comigo a conclusão do trabalho, mas sempre estará presente no meu coração.

Ao meu marido, amor da minha vida, por ter sido meu porto seguro no momento mais triste da minha vida e por ter me ajudado a levantar a cabeça quando achei que não daria conta de continuar. A ele também agradeço pelos fins de semana trabalhando juntos, chegando até às 2:00 da manhã operando o fleet.

Aos meus filhos Augusto e Beatriz por encherem nossa casa de alegria impulsionando a vida para frente de maneira milagrosa.

Aos meus irmãos pela amizade e companheirismo.

Ao prof. Rodinei pelos valiosos ensinamentos, por todo o carinho, pelo exemplo de vida, dedicação ao trabalho e por ser tão presente e paciente.

Ao prof. Marcelo por ter aceitado fazer parte do trabalho, pelos ensinamentos e principalmente pela confiança.

À fapemig EDT PRONEX 479/07 pela compra do equipamento LCQ-Fleet.

Ao prof. Marcos Erbelin e ao Jandyson pela ajuda nas análises com EASI-MS.

Ao Júlio pela ajuda nas análises com IT-TOF-MS e pela convivência maravilhosa por três anos e meio.

Aos meus amigos Bruno e Cristina pelas valiosas discussões sobre quimiometria.

Aos amigos Karla, Vanessa, Renata, Isabela, Amauri, Helvécio, Miriany, Bulé, Janaina, Bruna e Alberto pela ótima convivência no laboratório.

Aos amigos do DQ: Frank, Liliane, Patrícia, Elisangela, Meiriane, Ana Paula, Bruno, Leonel, Jaqueline, Rose, Silvéria, Camila, Keila, Leandro e Roberta pelo carinho.

Aos colegas que conheci no DQ e que se tornaram grandes amigos: Raquel, Luis, Taiane, Beatriz, Núbia e Poly, eu agradeço pela força!

Às meninas da secretaria, em especial a Paulete e Liliam por toda a paciência durante os anos.

Ao CNPq e CAPES pela bolsa de doutorado.

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

O que conduz o mundo é o espírito e não a inteligência.

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
CAPITULO 1 – RELEVÂNCIA DO TRABALHO	12
1.1 UNIÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS E VALIDAÇÃO MULTIVARIADA	13
CAPITULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	15
2.1.1 Ionização por Electrospray - ESI	16
2.1.2 Ionização por Easy Ambient Sonic-Spray - EASI	18
2.1.3 Analisadores de massas	20
2.2 QUIMIOMETRIA	21
2.2.1 Calibração Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais - PLS.....	22
2.2.1.1 Correção do sinal ortogonal - OSC	23
2.2.1.2 Detecção de amostras anômalas.....	24
2.2.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais PLS-DA.....	24
2.2.3 Validação Analítica Multivariada	25
2.2.3.1 Sinal analítico líquido – NAS	25
2.2.3.1 Figuras de Mérito.....	26
CAPITULO 3 - OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	33
3.1 OBJETIVOS GERAIS	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
CAPITULO 4 -IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÓLEOS ADULTERANTES EM AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM	35
4.1 INTRODUÇÃO	36
4.2 DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PLS2-DA E MODELOS PLS A PARTIR DE DADOS DE ESI-MS OBTIDOS NUM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DE BAIXA RESOLUÇÃO	39
4.2.1 <i>Objetivos</i>	39
4.2.2 <i>Parte experimental</i>	39
4.2.2.1 Amostras.....	39
4.2.2.2 Preparo de amostras	40
4.2.2.3 Obtenção dos Espectros de Massas.....	41
4.2.2.4 Tratamento dos dados.....	41
4.2.3 <i>Resultados</i>	42
4.2.3.1 Análise dos espectros de massas nos modos positivo e negativo	42
4.2.3.1 Classificação das amostras de azeite	46

4.2.3.2	Quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem	54
4.3	DESENVOLVIMENTO DE MODELOS PLS COM DADOS DE ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO – ESI-HRMS	76
4.3.1	<i>Objetivo</i>	76
4.3.2	<i>Parte experimental</i>	76
4.3.2.1	Amostras.....	76
4.3.2.2	Preparo de amostras	77
4.3.2.3	Obtenção dos espectros de massas.....	77
4.3.2.4	Tratamento dos dados.....	78
4.3.3	<i>Resultados</i>	78
4.3.3.1	Análise dos espectros de massas nos modos positivo e negativo	78
4.3.3.2	Quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem	82
4.4	DESENVOLVIMENTO DE MODELOS PLS COM DADOS DE EASI-MS	90
4.4.1	<i>Objetivo</i>	90
4.4.2	<i>Parte experimental</i>	90
4.4.2.1	Amostras.....	90
4.4.2.2	Obtenção dos Espectros de Massas.....	90
4.4.2.3	Tratamento dos dados.....	91
4.4.3	<i>Resultados</i>	91
4.4.3.1	Análise dos espectros de massas nos modos positivo e negativo	91
4.4.3.2	Quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem	93
4.5	CONCLUSÕES PARCIAIS	98
CAPITULO 5 - QUANTIFICAÇÃO DE BIODIESEL EM DIESEL.....		100
5.1	INTRODUÇÃO.....	101
5.2	OBJETIVO	103
5.3	PARTE EXPERIMENTAL	104
5.3.1	<i>Amostras</i>	104
5.3.2	<i>Preparo de amostras</i>	104
5.3.3	<i>Obtenção dos espectros de massas</i>	105
5.3.4	<i>Tratamento dos dados</i>	105
5.4	RESULTADOS	105
5.4.1	<i>Quantificação de biodiesel em diesel</i>	107
5.5	CONCLUSÕES PARCIAIS	111
CAPITULO 6 - CONCLUSÃO FINAL		112
CAPITULO 7 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		113

RESUMO

Visando a possibilidade de união de técnicas modernas de espectrometria de massas, (espectrometria de massas com ionização *eletrospray*-ESI-MS e espectrometria de massas com ionização *easy ambiente sonic spray*-EASI-MS), com ferramentas quimiométricas, (PLS regressão por mínimos quadrados parciais do inglês, *Partial Least Squares*) e PLS-DA (análise discriminante por mínimos quadrados parciais, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*), o presente trabalho foi desenvolvido para análise de azeite de oliva extra virgem e diesel b (misturas diesel/biodiesel). Os resultados foram organizados em dois capítulos, um destinado ao controle de qualidade do azeite de oliva extra virgem, capítulo 4, e o outro voltado ao controle de qualidade do diesel b, capítulo 5.

Um modelo PLS2-DA foi desenvolvido, com dados de ESI-MS, para a classificação de sete classes de azeite de oliva (extra virgem, puro e adulterado com cinco tipos de óleos adulterantes). O melhor modelo foi construído com oito variáveis latentes e apresentou bons valores de sensibilidade qualitativa (1,000) e especificidade (0,967-1,000) para os conjuntos de treinamento e teste. Foi desenvolvido também 10 modelos PLS para quantificação de óleos adulterantes (soja, milho, girassol e canola) sendo dois deles construídos com dados obtidos de um espectrômetro de massas de alta resolução ESI-HRMS e um modelo construído a partir de dados de EASI(+)-MS. Os modelos foram validados por meio de algumas figuras de mérito e todos os modelos têm comportamento linear e não apresentaram erros sistemáticos. Calcularam-se os erro médio quadrático de calibração e previsão (RMSEC e RMSEP) dos modelos que variaram de 0,55 a 1,47 % m/m e 1,01 a 1,98 % m/m, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação variaram de 0,1 a 0,7 %m/m e 0,3 a 1,39 % m/m, respectivamente. A relação de desempenho do desvio (RPD) para os conjuntos de calibração e validação também foram avaliados, figura de mérito que representa a capacidade preditiva do modelo e variaram de 1,4 a 5,6 e 2,94 a 5,5, sendo que apenas um modelo ficou com o RDP abaixo de 2,5.

Um modelo foi construído com dados de ESI-MS para quantificação de biodiesel em diesel e também foi validado da mesma maneira como descrito acima, apresentando desempenho semelhante aos modelos de quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva.

As metodologias proposta se mostraram bastante promissoras, por serem simples e rápidas. Todos os modelos apresentaram alta eficiência podendo ser usados no controle de qualidade de amostras de azeite de oliva extra virgem e diesel b.

Palavras-chave: Controle de Qualidade, Azeite de Oliva extra virgem, adulteração, Diesel b, ESI-MS, EASI-MS, PLS, PLS-DA, Validação Multivariada.

ABSTRACT

Title: Quality control of olive oil extra virgin and diesel / biodiesel blends using modern techniques of mass spectrometry and multivariate validation

Aiming at merging modern mass spectrometry techniques (electrospray ionization mass spectrometry - ESI-MS and easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry -EASI-MS) with chemometric methods (partial least squares -PLS and partial least squares discriminant analysis PLS-DA) the present work was developed for quality control of extra virgin olive oil and diesel b (blends diesel/biodiesel). The chapters were organized as following indicated:

Chapter 4 was designed for quality control of extra virgin olive oil. A PLS2-DA model was developed based on ESI-MS data, for classification of seven classes of olive oil (ordinary olive oil, extra virgin olive oil and adulterated with five adulterants oils). The best model was built with eight latent variables and showing good sensitivity (1.000) and specificity (0.967 – 1.000) values for the training and test sets. PLS models were also built, with seven models built with ESI-MS data, two models with data from a mass spectrometer for high resolution ESI-HRMS and a model constructed from data EASI (+)-MS. The 10 models were constructed for the quantification of adulterants oils (soybean, corn, sunflower and canola) in extra virgin olive oil. The models were validated by means of some figures of merit, was evaluated in models linearity, bias, accuracy, precision, selectivity, sensitivity and analytical sensitivity, limits of detection and quantification and Residual Prediction Deviation (RPD).

Chapter 5 was intended for diesel b quality control ESI-MS data was used to construct a model for quantification of biodiesel in diesel. This model was also validated similarly as above mentioned.

The proposed methods are promising because they are simple and fast. All models showed high efficiency and can be used in quality control of samples of extra virgin olive oil and diesel b.

Keywords: Quality Control, Extra Virgin olive oil, Adulteration, Diesel b, ESI-MS, EASI-MS, PLS, PLS-DA, Multivariate Validation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
B0	Diesel puro
B100	Biodiesel puro
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
COI	Conselho Oleícola Internacional
DESI	Ionização e dessorção por electrospray, <i>Desorption Electrospray Ionization</i>
EASI	Ionização por <i>Easy Ambient Sonic-Spray</i> , <i>Easy Ambient Sonic-Spray Ionization</i>
ER	Erro Relativo
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i> , <i>Electrospray Ionization</i>
HRMS	Espectrometria massas de alta resolução, <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
ICS	<i>International Chemometrics Society</i>
LD	Limite de detecção
LEC	Laboratório de ensaios de combustíveis
LQ	Limite de quantificação
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz, <i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MRL	Regressão linear múltipla, <i>Multiple Linear Regression</i>
NAS	Sinal analítico líquido, <i>Net Analyte Signal</i>
OSC	Correção do sinal ortogonal, <i>Orthogonal Signal Correction</i>
PCR	Regressão por componentes principais, <i>Principal Component Regression</i>
PLS	Mínimos quadrados parciais, <i>Partial least squares</i>
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais, <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
REGAP	Refinaria Gabriel Passos - Betim/MG
RMSEC	Raiz quadrada dos erros médios quadrados da calibração, <i>Root Mean Square Error of Calibration</i>
RMSECV	Raiz quadrada dos erros médios quadrados da validação cruzada, <i>Root Mean</i>

Square Error of Cross Validation

RMSEP Raiz quadrada dos erros médios quadrados de previsão, *Root Mean Square Error of Prediction*

RPD Relação de desempenho do desvio, *Residual Prediction Deviation*

VL Variável Latente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema dos Constituintes básicos de um espectrômetro de massas	15
Figura 2: Representação do processo de ionização por <i>electrospray</i> e formação do cone de Taylor. [16]-adaptada.....	17
Figura 3: Representação do processo de ionização EASI [12].....	19
Figura 4: Representação vetorial do NAS [42].	26
Figura 5: Construção da matriz X a partir de dados coletados nos espectros de massas.	41
Figura 6: ESI(+)-MS referentes às amostras de azeite de oliva extra virgem (a), azeite de oliva puro (b), óleo de soja (c), óleo de milho (d), óleo de girassol (e) e óleo de canola (f).....	43
Figura 7: ESI(-)-MS referente às amostras de azeite de oliva (a), óleo de soja (b), óleo de milho (c), óleo de girassol (d) e óleo de canola (e).	45
Figura 8: Representação esquemática indicando as classes utilizadas no modelo de classificação PLS-DA.....	46
Figura 9: Gráficos de classificação para as sete classes: OEV (●); OP (▲); OEV/SO (◆); OEV/MI (▼); OEV/GI (■); OEV/CA (►); OEV/OP (*).	48
Figura 10: Vetores dos coeficientes de regressão do modelo PLS2-DA: (a) OEV, (b) OP, (c) OEV/SO, (d) OEV/MI, (e) OEV/GI, (f) OEV/CA e (g) OEV/OP.....	51
Figura 11: Estratégia quimiométrica utilizada para a identificação e a quantificação de adulterantes em azeite de OEV.	54
Figura 12: Coeficientes de regressão dos modelos de quantificação de óleo de a) SO, b) MI, c) GI e d) CA em azeite de OEV.....	57
Figura 13: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo de SO em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	58
Figura 14: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo MI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	59
Figura 15: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	60
Figura 16: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo de CA em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	62

Figura 17: Coeficientes de regressão dos modelos de quantificação de óleo de SO (a), MI (b) e GI (c) em azeite de OEV para os modelos construídos a partir de dados de ESI(-)-MS.	68
Figura 18: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo de SO em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS.....	69
Figura 19: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo de MI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS.....	70
Figura 20 Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS.....	71
Figura 21: ESI(+)-HRMS referente à amostra de azeite de oliva extra virgem.	79
Figura 22: ESI(+)-HRMS referente à amostra de óleo de girassol.	79
Figura 23: ESI(-)-HRMS referente à amostra de azeite de oliva extra virgem.	79
Figura 24: ESI(-)-HRMS referente à amostra de óleo de girassol.	80
Figura 25: Coeficiente de regressão dos modelos de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV obtido do modelo construído com dados ESI(+)-HRMS.....	83
Figura 26: Coeficiente de regressão dos modelos de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV - obtido do modelo construído com dados ESI(-)-HRMS.	84
Figura 27: Ajuste dos valores preditos vs valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-HRMS.	85
Figura 28: Ajuste dos valores preditos vs valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-HRMS.	86
Figura 29: EASI(+)-MS referente à amostra de azeite de OEV: (a) Toda a faixa estudada e (b) ampliação na região dos TAGs.	92
Figura 30: EASI(+)-MS referente à amostra de óleo de GI: (a) Toda a faixa estudada e (b) ampliação na região dos TAGs.	92
Figura 31: EASI(-)-MS referente à amostra de azeite de OEV.....	93
Figura 32: EASI(-)-MS referente à amostra de óleo de GI.	93
Figura 33: Ajuste dos valores preditos vs valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo GI em OEV construído a partir de dados de EASI(+)-MS.....	94

Figura 34: Coeficiente de regressão do modelo de quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem obtido dos dados de EASI(+)-MS.....	95
Figura 35: Distribuição da não conformidade por item especificado para o diesel (Fonte: ANP, dados de Maio de 2014).	103
Figura 36: ESI(+)-MS referente à amostra de diesel.....	106
Figura 37: ESI(+)-MS referente à amostra de biodiesel.....	106
Figura 38: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de biodiesel em diesel construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição em ácido graxo do azeite de oliva	37
Tabela 2: Resultados obtidos para sensibilidade qualitativa, especificidade e <i>gap</i> dos conjuntos de treinamento e teste para o modelo de classificação das sete classes estudadas	50
Tabela 3: Íons mais importantes para a classificação de cada grupo de amostras e uma possível identificação para eles com base na literatura.	53
Tabela 4: Número de amostras de validação e calibração e número de variáveis latentes para cada modelo construído a partir de dados de ESI(+)-MS	56
Tabela 5: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de SO em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	58
Tabela 6: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de MI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	60
Tabela 7: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	61
Tabela 8: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de CA em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	62
Tabela 9: Figuras de mérito dos quatro modelos PLS construídos com os dados ESI(+)-MS (os testes foram realizados a 95% de confiança).....	66
Tabela 10: Número de amostras de validação e calibração e número de variáveis latentes para cada modelo construído a partir de dados de ESI(-)-MS	67
Tabela 11: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de SO em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS.....	69
Tabela 12: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de MI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS.....	70
Tabela 13: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS.....	72
Tabela 14: Figuras de mérito dos quatros modelos PLS construídos com dados ESI(-)-MS (os testes foram realizados a 95% de confiança).....	75

Tabela 15: Fórmula molecular, massa experimental e teórica, erro e DBE dos compostos identificados por HRMS.....	80
Tabela 16: Fórmulas molecular e estrutural dos compostos identificados por HRMS	81
Tabela 17: Número de amostras de validação e calibração e número de variáveis latentes para os modelos de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV	82
Tabela 18: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-HRMS	85
Tabela 19: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-HRMS	87
Tabela 20: Figuras de mérito para validação dos modelos de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construídos a partir de dados de ESI-RHMS	89
Tabela 21: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de EASI(+)-MS.....	95
Tabela 22: Figuras de mérito para validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de EASI(+)-MS.....	98
Tabela 23: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de biodiesel em diesel construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	108
Tabela 24: Figuras de mérito para validação do modelo de quantificação de biodiesel em diesel construído a partir de dados de ESI(+)-MS.....	111

Capítulo 1 – Relevância do trabalho

1.1 União da espectrometria de massas e validação multivariada

O presente trabalho traz uma proposta inovadora de unir técnicas modernas de espectrometria de massas, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS) e espectrometria de massas com ionização ambiente por *sonic-spray* (EASI-MS), a tratamentos quimiométricos avançados para o controle de qualidade de dois produtos, azeite de oliva extra virgem e misturas diesel/biodiesel (diesel B).

As técnicas ESI-MS e EASI-MS foram escolhidas por serem extremamente sensíveis e fornecerem respostas rápidas. Por exemplo, com as técnicas ESI-MS e EASI-MS foi possível analisar 120 e 240 amostras num único dia, respectivamente, sem a necessidade de manipulações complexas.

Em química analítica, a rapidez na aquisição de dados espectrais, prontamente é associada a métodos capazes de processar grande quantidade de dados e por isso surge a ideia de se aplicar métodos quimiométricos aos dados de ESI-MS e EASI-MS. Não é a primeira vez que a espectrometria de massas é utilizada para construir modelos de classificação e calibração multivariada, mas, pela primeira vez um estudo de validação multivariada é realizado. Para que fosse possível validar os métodos, o presente estudo baseou-se em aspectos de validação univariada e, também, de validação de métodos multivariados construídos com dados de espectrometria no infravermelho, técnica para a qual o uso de calibração multivariada e validação multivariada são muito difundidos.

No presente trabalho foram validados modelos quantitativos e um modelo qualitativo, construídos a partir de dados de espectrometria de massas. Os modelos PLS e PLS-DA foram construídos para a análise de dois tipos de amostras, azeite de oliva extra virgem adulterados com outros óleos vegetais e misturas diesel/biodiesel (diesel B).

Capitulo 2 – Revisão bibliográfica

2.1 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica de grande importância e durante muitos anos foi empregada exclusivamente na elucidação de estruturas orgânicas [1]. Mais recentemente, seu uso se difundiu e, juntamente com técnicas de separação, ela tem sido utilizada para quantificação de moléculas conhecidas em misturas complexas [2-5]. Recentemente, a espectrometria de massas ganhou novo destaque, sendo utilizada em conjunto com métodos quimiométricos de análise exploratória [6], classificação supervisionada [7] e calibração multivariada [8].

Os espectrômetros de massas são constituídos basicamente pelos seguintes compartimentos (Figura 1):

- Fonte de íons: onde as moléculas são ionizadas;
- Analisador de massas: responsável pela medição das massas dos íons formados;
- Detector: normalmente uma multiplicadora de elétrons, responsável pela transformação dos íons em sinal elétrico (fluxo de elétrons) para posterior envio ao sistema de dados [1].

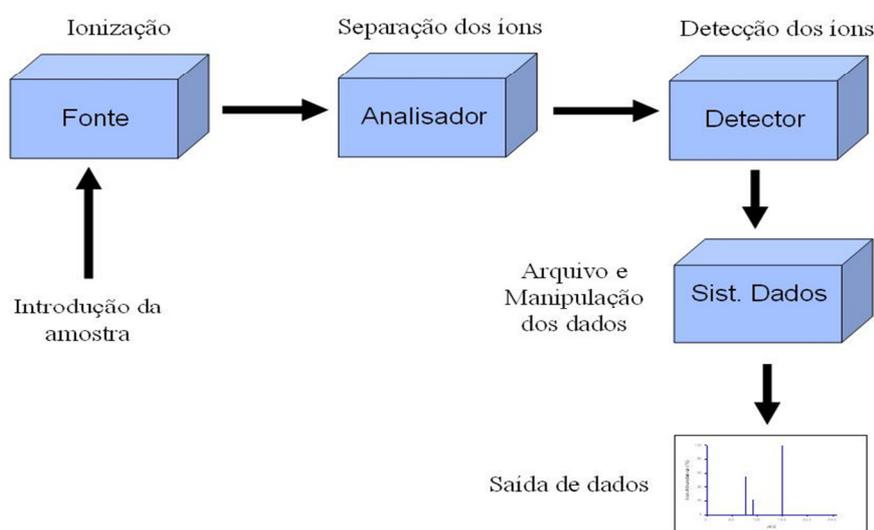


Figura 1: Esquema dos Constituintes básicos de um espectrômetro de massas

Vários tipos de moléculas podem ser analisadas por espectrometria de massas, visto que existem diversos tipos de fontes de ionização. Na ionização por elétrons (EI, *Electron Ionization*), uma molécula na fase gasosa é bombardeada com um feixe de elétrons de alta energia; há remoção de um elétron e a espécie iônica gerada

(denominada íon molecular, um cátion-radical) é instável e pode se fragmentar (processo unimolecular). O resultado é registrado quantitativamente na forma de um espectro de massas com a razão massa-carga de cada fragmento iônico e suas respectivas intensidades relativas [9].

Em outra forma de ionização, a ionização química (CI, *Chemical Ionization*), a amostra vaporizada é introduzida no espectrômetro de massas com um excesso de gás reagente (normalmente metano); este gás é ionizado por colisão com elétrons de alta energia e os íons gerados deste gás reagem com o analito. Normalmente, observa-se a formação de espécies protonadas (modo positivo) ou desprotonadas (modo negativo). Os íons gerados por CI são menos energéticos que os íons gerados por EI [9].

Outras formas de ionização, mais recentes, também são descritas na literatura, por exemplo, MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) [10], ESI (*Electrospray Ionization*), DESI (*Desorption Electrospray Ionization*) [11], EASI (*Easy Ambient Sonic-spray Ionization*) [12], dentre outras. Neste trabalho as técnicas de ionização utilizadas foram ESI e EASI.

2.1.1 Ionização por *Electrospray* - ESI

A ionização ESI foi citada pela primeira vez por Dole, em 1968, o qual sugeriu o *electrospray* como um possível modo de ionização para espectrometria de massas, mas, infelizmente, seus experimentos não foram convincentes. Mais tarde, Yamashita e Fenn [13] demonstraram a aplicabilidade da técnica *electrospray* como um método de ionização branda. Em 2002, John Fenn recebeu o prêmio Nobel em Química devido aos avanços proporcionados pela técnica, como o sequenciamento de peptídeos [14].

A ESI é considerada uma técnica branda de ionização, pois os íons analisados não possuem, normalmente, uma grande quantidade de energia interna. Devido ao fato de não possuir muita energia, a espécie iônica não se fragmenta e, por isso, nos espectros de massas gerados por este tipo de ionização é observado, geralmente, um único íon referente à molécula de interesse. Na ionização por *electrospray* a formação dos íons está relacionada às propriedades químicas dos compostos: reações ácido-base, complexação com cátions ou ânions e/ou reações redox [15].

Pela técnica ESI, uma solução é submetida a um *spray* eletrolítico sob pressão atmosférica. Um fino *spray* se forma na presença de um alto campo elétrico e gotas com excesso de carga (positiva ou negativa) são produzidas. 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 2). Eventualmente, gotas contendo apenas um íon são formadas e após toda a evaporação do solvente, o íon é transferido para a fase gasosa. Podem também ser formadas gotas com vários íons e estes são expelidos para a fase gasosa devido à alta repulsão entre íons de mesma carga.

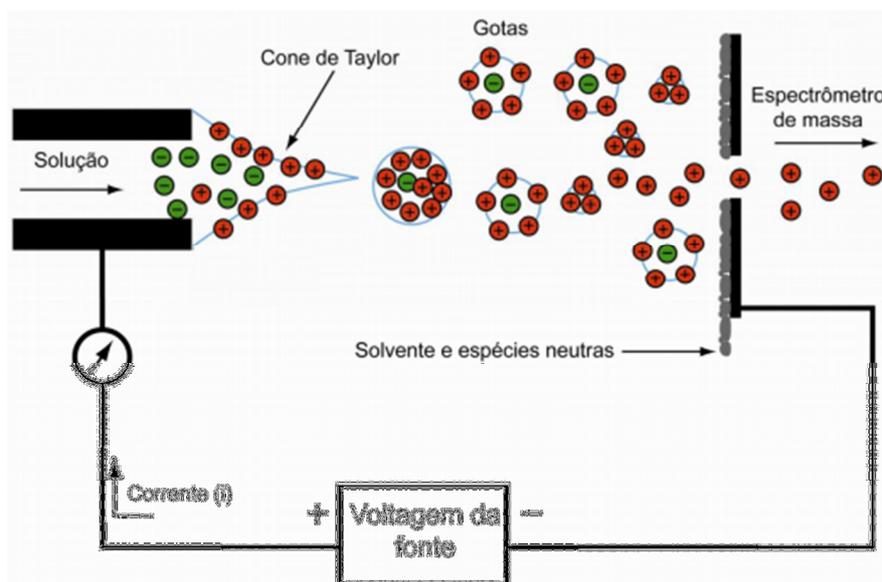


Figura 2: Representação do processo de ionização por *electrospray* e formação do cone de Taylor. [16]-adaptada.

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

Os ESI-MS de amostras complexas geralmente apresentam vários sinais, cada sinal referente a um íon de uma molécula presente na amostra. Os ESI-MS são chamados *fingerprints*, ou seja, impressões digitais das amostras e podem ser utilizados para diferenciação ou verificação de autenticidade. As respostas são rápidas e a manipulação das amostras não envolve etapas complexas. Vários pesquisadores trabalharam com obtenção de *fingerprints* de amostras complexas como extratos de plantas [17], vinhos [18], cerveja [19], whisky [20], óleos essenciais [21], óleos comestíveis [22], dentre outras. Muitas vezes, somente uma análise visual dos *fingerprints* não permite uma análise completa. Então, este padrão de informação pode ser utilizado na construção de modelos quimiométricos, os quais envolvem análise exploratória (métodos não supervisionados) [6,23], métodos de classificação supervisionada [7,24] e métodos de calibração multivariada. Os exemplos de calibração multivariada aplicada em dados de ESI-MS encontrados na literatura são poucos, tais como a quantificação de biodiesel em diesel [8,25], surfactantes em óleo [26], biomarcadores de colesterol alto [27] e misturas de café robusta e arábica [28].

2.1.2 Ionização por *Easy Ambient Sonic-Spray* - EASI

A técnica EASI (*Easy Ambient Sonic-Spray Ionization*) é a mais simples dentre as técnicas de ionização ambiente. Uma representação esquemática desta técnica é mostrada na Figura 3. A ionização EASI ocorre sem a necessidade de aplicação de voltagem, laser, descarga corona ou aquecimento. A técnica EASI se baseia na ionização *sonic-spray* que cria microgotas de solvente carregadas devido à distribuição aleatória e não balanceada de cátions e ânions. O fluxo destas microgotas promove a dessorção do analito da superfície, a ionização e a transferência dos íons para a fase gasosa [29-31].

A composição do solvente, a superfície de ionização, o gás de nebulização e a polaridade do analito são parâmetros que afetam a formação de íons nesta técnica. Uma variedade de superfícies tem sido empregada incluindo papel de envelope pardo, placas de cromatografia em camada delgada (CCD) e vidro [16]. O solvente mais utilizado é o metanol, mas outros solventes como acetonitrila ou uma mistura de metanol com água

também podem ser usados. Os solventes podem ser acidificados com ácido fórmico ou basificados com amônia e o gás de nebulização usado é o nitrogênio.

Com a técnica EASI-MS também pode-se escolher se serão analisados íons positivos ou negativos, da mesma maneira como é feito com a técnica ESI-MS. Espectros de massas obtidos nos modos positivo e negativo são representados pelas siglas EASI(+)-MS e EASI(-)-MS, respectivamente.

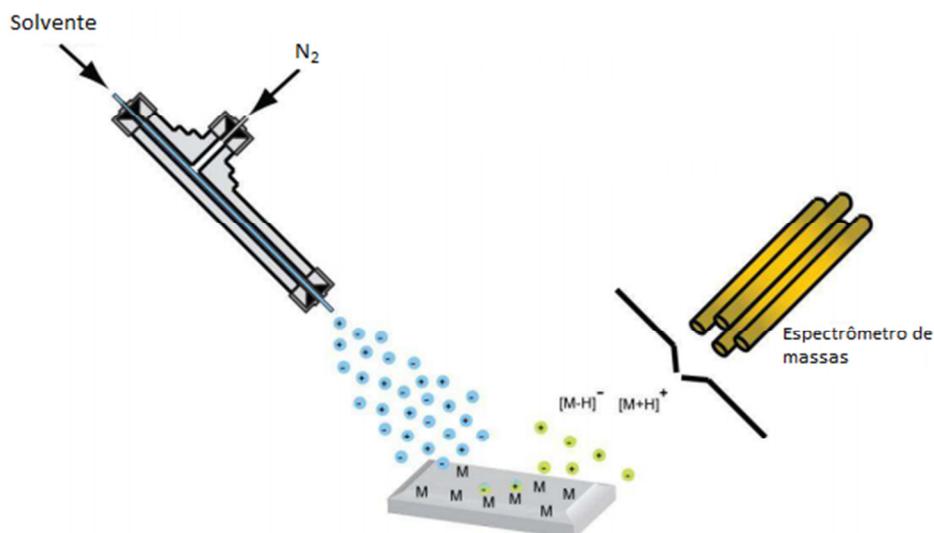


Figura 3: Representação do processo de ionização EASI [12].

A técnica EASI tem sido utilizada com sucesso na análise direta de superfície de comprimidos [32], com ótimos resultados para fármacos como diazepam, atenolol e outros. Também é possível utilizar a técnica EASI para a análise de vários outros fármacos em solução aquosa [33]. Esta aplicação abre espaço para o uso da técnica em análises ambientais de efluentes e outras amostras aquosas. A técnica EASI, assim como a técnica ESI, tem sido usada na obtenção de *fingerprints* para o controle de qualidade de vários produtos como: perfumes [34], amaciante de roupa com análise de surfactantes [35] e combustíveis [36]. Dados obtidos da técnica EASI-MS também foram empregados em análise exploratória, utilizando a análise de componentes principais para a diferenciação de azeites provenientes de regiões distintas [37].

2.1.3 Analisadores de massas

Após serem gerados na fonte de ionização, os íons são transferidos para uma região do equipamento, conhecida como analisador de massas. A função dos analisadores é separar os íons de acordo com a razão massa/carga (m/z). A escolha do analisador pode ser em relação à faixa de massa, resolução de massa, sensibilidade e possibilidade de se fazer MS/MS. Os três analisadores mais comuns são: quadrupolo, aprisionamento de íons (*ion trap*), tempo de voo (*TOF – Time of Flight*).

Os analisadores quadrupolos são bastante populares principalmente devido ao preço baixo, mas apresentam baixa linearidade em análises quantitativas. Eles utilizam campos elétricos oscilantes, gerados por quatro barras metálicas (eletrodos), para estabilizar ou desestabilizar seletivamente os íons, durante sua passagem pelo centro do quadrupolo, de acordo com seus valores de m/z [38]. Considerando um valor de corrente e radiofrequência no quadrupolo somente alguns íons que apresentam determinada razão m/z que estejam em ressonância com o campo poderão passar pelo quadrupolo e assim detectados. Os demais íons atingirão as barras e assim serão eliminados [39]. Alguns instrumentos podem combinar vários analisadores quadrupolo em sequência, exemplo os analisadores triplo quadrupolo e assim torna-se possível a espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Um determinado íon é isolado no primeiro quadrupolo, colide com moléculas de gás inerte no segundo quadrupolo e os fragmentos formados são analisados no terceiro quadrupolo [9].

O analisador *ion trap* também é bastante popular e apresenta preço comparável ao quadrupolo. Sua resolução é baixa (unitária), mas pode ser aumentada empregando varreduras mais lentas e faixas de massa menores.

Ele opera por princípio semelhante ao quadrupolo, inclusive é chamado quadrupolo tridimensional, porém os íons não descrevem uma trajetória através do ambiente quadrupolar, e sim são aprisionados dentro dele. Existe um campo elétrico no interior do *ion trap* que mantém os íons em uma órbita estável em seu interior. Um potencial RF (radio frequência) é aplicado e os íons são então desestabilizados e expelidos para fora do analisador, de acordo com seus valores de m/z [38]. Neste caso, também é possível realizar experimentos de espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Após fazer uma varredura completa de determinada substância, é possível isolar um único íon no *trap*, fragmentá-lo por colisão com gás inerte e assim originar íons filhos. Além disso,

também é possível selecionar um íon filho e fragmentá-lo sequencialmente. Este recurso é uma ótima ferramenta, que pode fornecer informações preciosas na análise de várias substâncias [9].

Nos espectrômetros de massas que medem o tempo de voo, os íons são submetidos a uma diferença de potencial e atingem uma mesma energia cinética. Se os íons apresentam a mesma energia cinética, então os de maior massa terão velocidade menor, de forma que o tempo necessário para um íon atravessar o tubo é proporcional à massa, uma vez que a distância entre a formação do íon e o detector é fixa. O princípio de operação do TOF baseia-se na medida do “tempo de voo” de um íon dentro do espectrômetro de massas [39].

2.2 Quimiometria

A quimiometria utiliza métodos matemáticos e de estatística multivariada para extrair o máximo de informação a partir de dados químicos. As ferramentas quimiométricas são uma forma de auxiliar o analista a retirar o máximo de informação de um experimento.

O desenvolvimento dos computadores e métodos instrumentais contribuiu para o desenvolvimento da quimiometria, pois foi possível obter muitos dados em pouco tempo, sendo necessário que todos estes dados fossem tratados [40,41]. A química analítica foi uma das áreas mais beneficiadas com o desenvolvimento de métodos quimiométricos e a comprovação disso foi o surgimento da *International Chemometrics Society (ICS)*, organização responsável pelo desenvolvimento da quimiometria, composta majoritariamente por químicos analíticos [42].

Dependendo do objetivo do trabalho, a quimiometria pode ser subdividida em diferentes subáreas. No presente trabalho foram empregadas classificação supervisionada usando PLS-DA (*Partial least squares Discriminant Analysis*) e calibração multivariada usando PLS (*Partial Least Squares*), para o controle de qualidade e a quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva e biodiesel em diesel.

2.2.1 Calibração Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais - PLS

Na calibração multivariada utilizam-se diferentes variáveis (x_1, x_2, \dots, x_N) para quantificar uma variável de interesse, y (por exemplo, concentração). Três métodos de calibração multivariada são mais comumente citados na literatura. Os métodos mais comuns são a regressão linear múltipla (MRL, *Multipler Linear Regression*), a regressão por componentes principais (PCR, *Principal Component Regression*) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Squares*) [43].

O PLS e todos os métodos de calibração que utilizam um vetor de medidas instrumentais para cada amostra possibilitam a determinação do analito na presença de interferentes, desde que, os mesmos estejam presentes no conjunto de calibração [44]. No PLS relaciona-se a matriz \mathbf{X} de dados (espectros) com o vetor \mathbf{y} , se apenas uma propriedade for medida, ou matriz \mathbf{Y} , se mais de uma propriedade for medida. A matriz \mathbf{X} e o vetor \mathbf{y} ou matriz \mathbf{Y} são decompostos simultaneamente em uma soma de variáveis latentes (VLs), de acordo com as equações 1 e 2. As VLs são combinações lineares das variáveis originais, que descrevem simultaneamente a maior parte das informações nos dois blocos de dados.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}' + \mathbf{E} = \sum t_k \mathbf{p}'_k + \mathbf{E} \quad (1)$$

Onde:

\mathbf{T} é a matriz de escores

\mathbf{P} é a matriz de pesos (*loadings*) do bloco X

\mathbf{E} é a matriz de resíduos do bloco X.

$$\mathbf{y} = \mathbf{T}\mathbf{q}' + \mathbf{f} = \sum t_k \mathbf{q}'_k + \mathbf{f} \quad (2)$$

Onde:

\mathbf{T} é a matriz de escores

\mathbf{q} é a matriz de pesos (*loadings*) do bloco Y

\mathbf{f} é o vetor de resíduos do bloco Y.

Uma importante característica do PLS é a possibilidade de se obter escores (\mathbf{T}) comuns a ambos os conjuntos de dados, de concentração (\mathbf{y}) e de medidas espectrais (\mathbf{X}).

O número de VLs do modelo é escolhido com base no valor do erro médio da validação cruzada (RMSECV, *Root Mean Squares Errors of Cross Validation*). A maneira mais comum de se fazer a validação cruzada é por meio do *leave-one-out*, em que uma amostra da calibração é retirada de cada vez e, então, com as restantes constrói-se o modelo e estima-se a concentração da amostra retirada, e isso é repetido para todas as amostras. Quando se trabalha com um conjunto maior de amostras pode-se fazer a validação por blocos contínuos ou subconjuntos aleatórios, nos quais um número maior de amostras é retirado e o modelo é construído com as que restaram, estimando-se suas concentrações. A média dos erros de previsão é calculada para cada número de VL e o que apresentar o menor erro será o número de VLs do modelo.

Após a construção do modelo, estima-se a concentração das novas amostras a partir dos novos escores $\hat{\mathbf{T}}$ e dos pesos \mathbf{q} , de acordo com a equação 3:

$$\mathbf{y}_n = \hat{\mathbf{T}}\mathbf{q}' \quad (3)$$

2.2.1.1 Correção do sinal ortogonal - OSC

Antes de construir o modelo o analista tem em mãos os dados originais e, na maioria das vezes, estes dados precisam passar por pré-processamentos, principalmente quando são coletados a partir de amostras complexas [45]. O objetivo destes pré-processamentos podem ser: melhorar a previsão, diminuir os erros da calibração e/ou construir modelos mais simples.

Alguns pré-processamentos são muito simples e por isso muito utilizados, como centrar os dados na média ou autoescalar os dados. Outro pré-processamento utilizado neste trabalho foi a correção do sinal ortogonal (OSC, *Orthogonal Signal Correction*).

O OSC é um filtro que faz uma correção no sinal removendo de \mathbf{X} toda informação que não tem relação com \mathbf{Y} [46,47]. Isso é feito garantindo que a parte removida é ortogonal a \mathbf{Y} , ou o mais próximo possível da ortogonalidade. Para chegar a

este nível é preciso expressar os filtros matematicamente para quantificar a ortogonalidade de um vetor ou matriz [45].

Este filtro é utilizado quando o analista tem uma situação em que a primeira VL explica muita variância em \mathbf{X} e pouca informação em \mathbf{Y} , então a informação que está sendo modelada em \mathbf{X} não está relacionada diretamente à propriedade que se pretende medir. No PLS, fatores que simultaneamente modelam a maior parte da variância em \mathbf{X} e \mathbf{Y} são incluídos no modelo. No OSC, fatores que modelam a maior parte da variância de \mathbf{X} ortogonal a \mathbf{Y} são excluídos do modelo. Deve-se ter o cuidado de não usar muitos fatores no filtro OSC (no máximo 2), pois isto tende a levar ao sobreajuste do modelo.

2.2.1.2 Detecção de amostras anômalas

Durante o desenvolvimento do método, o modelo PLS deve ser otimizado e para isso amostras anômalas precisam ser identificadas e retiradas do conjunto de calibração.

As amostras anômalas (*outliers*) são definidas como amostras que diferem muito do grupo de origem. Esta diferença pode ser causada por erros na aquisição dos dados, ou simplesmente porque as amostras realmente não fazem parte desta população. A detecção de *outliers* é muito importante em calibração multivariada, e pode ser feita de várias maneiras. Os métodos mais utilizados se baseiam na eliminação de amostras com alto *leverage* ou influência e altos resíduos. No presente trabalho, utilizou-se uma metodologia robusta [48,49] para detecção de *outliers* nos conjuntos de calibração, na qual são avaliados valores de *leverage* e os resíduos no bloco \mathbf{X} (dados espectrais) e no bloco \mathbf{Y} (concentração). Para o conjunto de validação usou-se o teste Jackknife, no qual as amostras são avaliadas de acordo com o valor do resíduo de previsão (bloco \mathbf{Y}). Se este valor for maior que um determinado valor crítico, então a amostra é considerada um *outlier* [50].

2.2.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais PLS-DA

A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) é um método multivariado para a classificação

supervisionada de amostras e a construção do modelo é muito semelhante ao PLS, sendo que a única diferença está no vetor y .

A variável independente y no método PLS-DA indica a classe a qual pertence a amostra. Quando no conjunto de dados só existem duas classes, y é um vetor. A variável y pode assumir os valores 0 ou 1, 1 se pertence à classe e 0 se não pertence. Quando se tem três ou mais classes, a variável independente é uma matriz Y , com o número de colunas sendo igual ao número de classes. Neste caso, denomina-se o método como PLS2-DA [51]. Quando se tem mais classes, não necessariamente tem que se usar o PLS2-DA, pode-se usar o PLS1-DA, prevendo uma classe de cada vez.

Os valores previstos pelo modelo PLS-DA ou PLS2-DA não são exatamente zero ou um, e sim aproximados. Se não são exatos, então um limite (*threshold*) é estabelecido e, se o valor previsto estiver acima deste limite, a amostra pertence à classe. O limite para cada classe é estimado usando o teorema de Bayes [52] e para o cálculo assume-se que a variância de y segue uma distribuição semelhante ao que será observado nas amostras futuras.

2.2.3 Validação Analítica Multivariada

A validação de um método estabelece, por meio de alguns testes, que o mesmo atende ao propósito para o qual foi desenvolvido. Qualquer método de análise que é desenvolvido deve ser validado. A validação pode ser feita através da determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito [44]. A maioria dos guias de validação internacionais ou nacionais [53-56] referem-se apenas à calibração univariada, mas já existem na literatura alguns trabalhos que propõem uma harmonização entre a calibração multivariada e os guias de validação [49].

Algumas figuras de mérito, para métodos multivariados, são calculadas a partir do conceito de sinal analítico líquido (NAS, *Net Analyte Signal*).

2.2.3.1 Sinal analítico líquido – NAS

O NAS é a parte do vetor do espectro que é ortogonal a um subespaço chamado de espaço interferente. O conceito de NAS foi proposto por Lorber [57] em 1986 e é usado para o cálculo de algumas figuras de mérito. Cada amostra é representada por um vetor, que contém toda a sua informação. Para o cálculo do NAS é feita uma separação matemática dos vetores das contribuições do analito e dos interferentes (Figura 4). Quando esta separação matemática é feita obtém-se o vetor NAS que é a contribuição específica do analito para o sinal total.

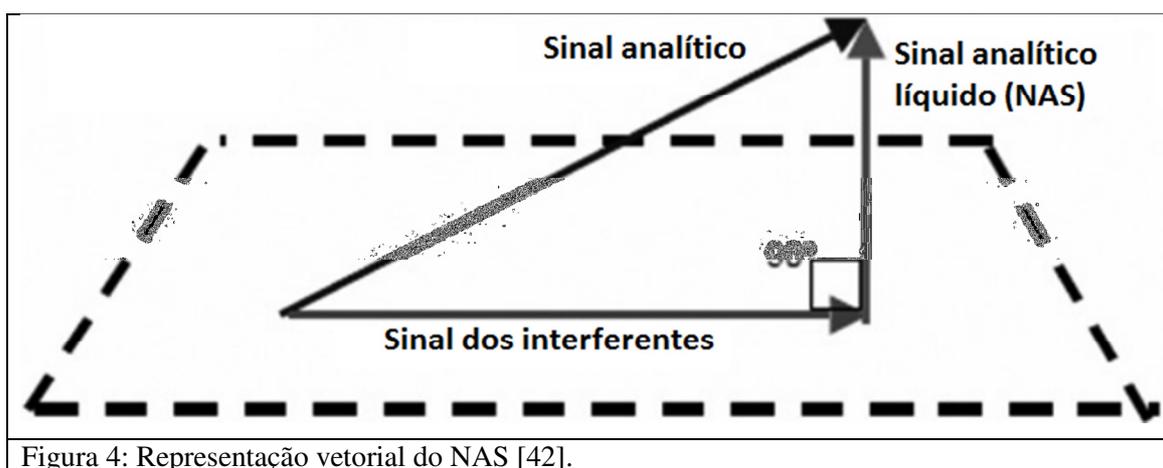


Figura 4: Representação vetorial do NAS [42].

Se cada conjunto de dados é composto por n amostras e cada uma é representada por um vetor, após a separação matemática do vetor NAS de cada amostra, resultarão n vetores NAS (X_i^{NAS}). De cada vetor pode-se calcular a norma (equação 4) e, então, cada amostra terá um valor escalar que representa o analito e é diretamente proporcional à sua concentração [58].

$$n\hat{s}_i = \|X_i^{NAS}\| \quad (4)$$

De posse do vetor NAS e sua norma é possível o cálculo de algumas figuras de mérito, tais como sensibilidade, seletividade, limites de detecção e quantificação.

2.2.3.1 Figuras de Mérito

A seguir, são apresentadas as figuras de mérito abordadas no presente trabalho. Alguns dos parâmetros são calculados de forma semelhante ao que é feito em métodos univariados.

Linearidade

A linearidade é a capacidade do modelo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito [44]. Normalmente, em calibração univariada, se usa a curva de calibração para avaliar tal parâmetro. Isso faz com que a linearidade seja uma figura de mérito que apresente dificuldade de harmonização em métodos multivariados, uma vez que para estes não existe curva de calibração. Em calibração multivariada, a linearidade costuma ser avaliada por meio do coeficiente de correlação (r) do ajuste entre os valores preditos e de referência, mas o valor de (r) isoladamente não é capaz de garantir a linearidade do modelo [56]. Então, para se avaliar melhor a linearidade, uma maneira adicional, também proveniente de métodos univariados, é verificar a aleatoriedade dos resíduos através da comprovação de algumas de suas propriedades assumidas como premissas: i) normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner; ii) homocedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe; iii) independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson [50].

Viés (Bias)

O termo *bias*, ou viés, é relativo á presença de erros sistemáticos no modelo. A norma E1655 da ASTM [59] descreve o cálculo para a avaliação deste parâmetro. A avaliação é feita por meio de um teste t para as amostras de validação ao nível de 95% de confiança. O *bias* médio para o conjunto de validação é calculado pela equação 5. A seguir, o desvio padrão dos erros de validação é estimado através da equação 6 e, por fim, o valor de t é obtido da equação 7. Se o valor t calculado for maior que o t crítico para n_v graus de liberdade, a presença de erro sistemático é confirmada.

$$bias = \frac{\sum_{i=1}^{n_v} y_i - \hat{y}_i}{n_v} \quad (5)$$

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum [(y_i - \hat{y}_i) - bias]^2}{n_v - 1}} \quad (6)$$

$$t_{bias} = \frac{|bias|\sqrt{n_v}}{SDV} \quad (7)$$

Onde:

y_i = valor de referência

\hat{y}_i = valor estimado

n_v = número de amostras do conjunto de validação

Relação de desempenho do desvio

A relação de desempenho do desvio (RPD, *Residual Prediction Deviation*) é uma figura de mérito introduzida recentemente e mede a capacidade preditiva dos métodos em termos absolutos [60]. O valor do RPD é mais adequado para comparações entre métodos, pois leva em consideração a faixa de concentração do analito. A figura de mérito RPD é estimada para os conjuntos de calibração e validação e pode ser calculada de acordo com as equações 8 e 9.

$$RPC_{cal} = \frac{DP_{cal}}{RMSECV} \quad (8)$$

$$RPC_{val} = \frac{DP_{val}}{RMSEP} \quad (9)$$

Onde:

DP_{cal} = Desvio padrão dos valores de referência do conjuntos de calibração

$RMSECV$ = Raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada

DP_{val} = Desvio padrão dos valores de referência do conjuntos de validação

$RMSEP$ = Raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão

Precisão

Precisão é a estimativa da dispersão dos resultados, repetidos de uma mesma amostra. Existem três níveis nos quais a precisão pode ser expressa [53]: i) A repetitividade, que trata da concordância entre os resultados de medições efetuados sob as mesmas condições, mesmo dia e mesmo analista. ii) A precisão intermediária ou

reprodutibilidade intralaboratorial, que se refere a replicatas analisadas no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, por analistas diferentes e, às vezes, equipamentos diferentes. iii) A reprodutibilidade, que representa um procedimento analítico que somente pode ser estimada mediante a participação em um ensaio interlaboratorial colaborativo e, assim, toda a análise será repetida em outro laboratório.

De acordo com o manual de garantia da qualidade analítica do ministério da agricultura [53], para a determinação da repetitividade é necessário um conjunto de amostras constituídas de matrizes brancas fortificadas, no mínimo em três níveis de concentração, com as substâncias a analisar, de tal forma que os limites permitidos se encontrem preferencialmente na região central dos níveis de concentração. E, para cada nível, a análise deve ser realizada em, pelo menos, seis réplicas independentes.

Veracidade

A veracidade (termo que substitui o antigo significado de exatidão) é o grau de concordância entre o valor predito e o valor de referência, ou valor verdadeiro. Normalmente, em calibração multivariada, a veracidade é avaliada pelo cálculo da raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão (*RMSEP, Root Mean Squares Errors of Prediction*), de acordo com a equação 10:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_v}} \quad (10)$$

Onde:

y_i = valor de referência

\hat{y}_i = valor estimado

n_v = número de amostras no conjunto de validação.

Pode-se calcular, também, a raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração (*RMSEC, Root Mean Squares Errors of Calibration*) (equação 11), mas este parâmetro é viciado e, com isso, não é tão robusto para avaliar a exatidão. Ele é um parâmetro viciado, pois se avalia o erro de previsão das amostras do conjunto de calibração, ou seja, as mesmas amostras que foram utilizadas para construir o modelo.

No entanto, a sua comparação com o valor de RMSEP é importante para avaliar se há presença de sobreajuste no modelo.

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_c - \nu}} \quad (11)$$

Onde:

y_i = valor de referência

\hat{y}_i = valor estimado

N_c = número de amostras no conjunto de calibração.

ν = número de variáveis latentes do modelo + 1 se os dados forem centrados na média.

Para avaliar de maneira mais completa a veracidade, além do RMSEP e RMSEC, calcula-se o erro relativo (ER) de cada amostra do conjunto de validação (equação 12).

$$ER = \left(\frac{\hat{y}_i - y_i}{y_i} \right) 100\% \quad (12)$$

Seletividade

A seletividade (SEL) é o grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes, ou seja, é a porcentagem do sinal total que é referente ao analito [44]. Para os métodos univariados, deseja-se que a SEL seja o mais próximo possível de 100%, indicando a ausência de interferentes no sinal analítico. No entanto, quando tratamos de métodos multivariados, não existe a necessidade de exigência de um valor limite de SEL, mesmo porque, se o sinal analítico fosse totalmente seletivo, não seria necessária uma análise multivariada. A SEL pode ser estimada de acordo com a equação 13. Com este cálculo é possível obter um valor de SEL para cada amostra, então a média destes valores é usada para descrever o método [58].

$$SEL_i = \frac{n\hat{a}s_i}{\|X_i\|} \quad (13)$$

Onde:

$n\hat{a}s_i$ = norma do vetor NAS para a amostra i .

X_i = Vetor da amostra i .

Sensibilidade

A sensibilidade (SEN) é definida como a fração de sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração do analito. A SEN pode ser estimada como o inverso da norma do vetor de coeficientes de regressão do modelo PLS (equação 14). A sensibilidade é dependente da técnica analítica utilizada. Assim, não é possível fazer comparações entre métodos com técnicas diferentes e, por isso, outra figura de mérito deve ser calculada, a sensibilidade analítica [58].

$$SEN = \frac{1}{\|b\|} \quad (14)$$

Quando o vetor NAS é determinado, o vetor de sensibilidade para cada amostra do conjunto de calibração pode ser determinado a partir do vetor X_i^{NAS} (equação 15) e este vetor é o mesmo para todas as amostras, então calcula-se a norma dele para se ter o valor de sensibilidade (equação 16).

$$S_i^{NAS} = \frac{X_i^{NAS}}{y} \quad (15)$$

$$SEN = \|S_i^{NAS}\| \quad (16)$$

Onde:

S_i^{NAS} = vetor de sensibilidade para cada amostra

y = Vetor Concentração

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica (γ) expressa a sensibilidade em função da unidade de concentração que se está medindo. A γ é definida como a razão entre a SEN e o ruído instrumental (ϵ), como mostrado na equação 17. Para estimar o ruído são necessários 10 a 15 medidas do branco para construir uma matriz de brancos e, então, calcula-se o desvio padrão combinado desta matriz [58].

$$\gamma = \frac{\text{SEN}}{\varepsilon} \quad (17)$$

O inverso da sensibilidade analítica (γ^{-1}) é uma estimativa da diferença mínima que é discernível pelo método, considerando que a única fonte de erro é o ruído instrumental aleatório.

Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser observada com o método (equação 18) e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser medida (equação 19). Os LD e LQ são calculados a partir de γ^{-1} e por isso a única fonte erro considerada no calculo, é o erro aleatório instrumental.

$$LD = 3.3(\gamma^{-1}) \quad (18)$$

$$LQ = 10(\gamma^{-1}) \quad (19)$$

Capítulo 3 - Objetivos Gerais e Específicos

3.1 Objetivos Gerais

Utilizar técnicas modernas de espectrometria de massas associada a tratamentos quimiométricos, classificação supervisionada e calibração multivariada para controle de qualidade de azeite de oliva extra virgem e diesel b.

3.2 Objetivos Específicos

- Classificar amostras de azeite de oliva de dois tipos (extra virgem e puro) e amostras de azeite de oliva extra virgem adulteradas com diferentes tipos de óleos vegetais (soja, milho, girassol, canola e azeite de oliva puro), utilizando ESI-MS de baixa resolução.
- Desenvolver e validar métodos de calibração multivariada para quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem, utilizando a técnica ESI-MS de baixa resolução.
- Desenvolver e validar métodos de calibração multivariada para a quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem, utilizando a técnica ESI-MS de alta resolução.
- Desenvolver e validar métodos de calibração multivariada para quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem, utilizando a técnica EASI-MS.
- Desenvolver e validar métodos de calibração multivariada para quantificação de biodiesel em diesel, utilizando a técnica ESI-MS.

Capitulo 4 -Identificação e quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem

4.1 Introdução

O azeite de oliva é o óleo extraído do fruto da oliveira e, pelo fato de ser oriundo do mesocarpo (parte mais succulenta do fruto) da azeitona, ao invés da semente, é chamado de azeite. Os óleos vegetais são extraídos de grãos ou sementes e geralmente utilizam-se solventes durante a extração [61].

O azeite de oliva, assim como outros óleos vegetais, é composto, principalmente, por triacilgliceróis. Em sua composição são encontrados, também, os diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos, que são formados pela hidrólise dos triacilgliceróis [62, 63]. De acordo com a norma do CODEX 33-1981, revisada em 2013 [64], a composição em ácidos graxos do azeite de oliva deve seguir os valores mostrados na Tabela 1.

No azeite de oliva, além dos compostos citados, são encontrados também compostos fenólicos [65], substâncias que são de grande interesse por serem antioxidantes [66]. A concentração de compostos fenólicos no azeite de oliva depende do bom estado da azeitona. Se elas estão perfeitas, foram colhidas manualmente e não ficaram armazenadas, produzem um azeite de ótima qualidade. O modo de produção do azeite também é importante para sua qualidade; se as azeitonas selecionadas são prensadas em temperatura inferior a 25°C há a produção do melhor azeite que é rico em compostos fenólicos, dentre eles o hidroxitirosol fenol [67]. De acordo com a norma do CODEX 210-1999, revisada em 2013, só pode ser considerado azeite virgem aquele que for extraído apenas por processos mecânicos [68].

Tabela 1: Composição em ácido graxo do azeite de oliva

Ácido graxo	Cn:m ^a	% 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 heptadecanóico	C17:0	< 0,5
Ácido heptadecenóico	C17:1	< 0,6
Ácido esteárico	C18:0	0,5-5,0
Ácido oleico	C18:1	55,0-83,0
Ácido linoleico	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 erúcico	C22:1	Não detectável
Ácido lignocérico	C24:0	< 1,0

^a n= número de carbonos; m= número de duplas ligações C-C presentes na estrutura da molécula[67].

Os outros tipos de azeite, de qualidade inferior, são produzidos de azeitonas defeituosas, de azeitonas de espécies não apropriadas para a sua produção ou de azeitonas provenientes de uma safra com problemas climáticos. Dependendo da qualidade, o azeite não pode ser empregado para consumo humano, a menos que seja refinado. No entanto, durante este refino compostos antioxidantes podem ser perdidos e assim o azeite torna-se menos benéfico à saúde [67].

Vários tipos de azeite de oliva são encontrados e a seguinte classificação é feita pela ANVISA na resolução RDC nº 482, de 23/09/1999, com alguns valores atualizados na resolução RDC nº 270, de 22/09/2005 [69]:

- Azeites extra virgem e virgem são obtidos por processos mecânicos e outros meios físicos, particularmente condições térmicas amenas, e que não tenham sido submetidos a outros tratamentos que não a lavagem, a centrifugação e a

filtragem. O azeite extra virgem deverá ter acidez, expressa em ácido oleico, de no máximo 0,8% m/m e o virgem deverá ter acidez menor que 2% m/m;

- O azeite refinado é o azeite de oliva obtido do refino do azeite virgem e tem acidez menor que 0,3% m/m;
- O azeite de oliva puro é composto da mistura de azeite refinado com azeite virgem e terá acidez de, no máximo, 1,0 % m/m;

O consumo de azeite tem aumentado muito nos últimos anos, pois sendo um alimento rico em antioxidantes traz grandes benefícios à saúde. Este crescimento no consumo provocou uma elevação no seu preço de mercado, o que aumentou consideravelmente sua importância para a economia. Esta importância pode ser comprovada pelo fato de o azeite ser o único óleo comestível que possui seu próprio acordo internacional de comércio, regulado por uma organização intergovernamental, o COI, Conselho Oleícola Internacional (IOOC, *International Olive Oil Council*) [70].

Dentre todos os tipos de azeite, o azeite extra virgem é o de maior interesse e valor econômico, devido à maior concentração de antioxidantes e também pela baixa produção, menos que 10% da produção total de azeite de oliva [67]. Todo este valor agregado do azeite de oliva extra virgem faz com que ele seja alvo de adulterações [71], sendo a mais habitual a adição de outros óleos vegetais [72]. Assim, torna-se muito importante o desenvolvimento de novas metodologias para que se faça um melhor controle de qualidade do azeite de oliva extra virgem.

Uma das formas de analisar óleos adulterantes em azeite de oliva é utilizando métodos cromatográficos, tanto cromatografia líquida [62,73] quanto gasosa [74-76], mas estes métodos, apesar de eficientes, têm a desvantagem de serem demorados e caros. A cromatografia líquida também tem a desvantagem de consumir muito solvente e gerar resíduos. Outros estudos têm mostrado o uso de técnicas de análise alternativas, especialmente quando associadas a métodos quimiométricos, para identificação de amostras adulteradas, tais como espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier (ATR/FTIR) [77], ressonância magnética nuclear (RMN) [78] e espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) [79]. Também são encontrados trabalhos voltados para a quantificação de adulterantes em azeite de oliva extra virgem utilizando métodos desenvolvidos com espectroscopia no infravermelho médio (MIR) [80,81] e infravermelho próximo (NIR) [82].

No presente estudo utilizou-se técnicas modernas de espectrometria de massas (ESI-MS e EASI-MS) e métodos quimiométricos para a identificação e quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem.

4.2 Desenvolvimento de um modelo PLS2-DA e modelos PLS a partir de dados de ESI-MS obtidos num espectrômetro de massas de baixa resolução

4.2.1 Objetivos

- Construir um modelo PLS2-DA para a discriminação entre sete classes de amostras de azeite de oliva: azeites de oliva extra virgem (OEV) e oliva puro (OP) e azeite de OEV adulterado com óleos vegetais [soja (SO), milho (MI), girassol (GI), canola (CA) e azeite de OP].
- Quantificar o teor de cada adulterante através de modelos de calibração multivariada utilizando o método PLS.

4.2.2 Parte experimental

4.2.2.1 Amostras

As amostras de azeite de oliva foram adquiridas no comércio local. Para a construção dos modelos foram utilizadas 10 marcas de azeite de OEV e 10 marcas de azeite de OP. Os outros óleos vegetais (SO, MI, GI e CA) foram comprados para que se fizesse o preparo das amostras adulteradas.

Contaminação do azeite de oliva extra virgem

O azeite de OEV foi contaminado propositalmente com óleos de SO, MI, GI, CA e azeite de OP. Para cada adulterante preparou-se 40 amostras, com a concentração do adulterante variando de 0,5 até 20,0 % m/m, com incrementos de 0,5 % m/m, as amostras foram pesadas em balança analítica (Adventurer Pro, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA).

4.2.2.2 Preparo de amostras

Reagentes

Metanol (Grau HPLC (99,9%) – Merck)

Hidróxido de Amônio (Grau HPLC (28-30%) – J.T.Baker)

Ácido Fórmico (Grau HPLC (88%) – J.T.Baker)

A água utilizada no preparo das soluções foi purificada com um sistema Milli-Q de purificação (Millipore, Eschborn, Alemanha)

Procedimento

Realizou-se uma extração líquido-líquido prévia, pois não é possível injetar o óleo diretamente no espectrômetro de massas. Em um frasco Eppendorf adicionou-se 100,0 µL de óleo e 1,0 mL de solução metanol/água 50 % v/v com 0,1 % v/v de ácido fórmico, para as análises no modo positivo, ou 0,1 % v/v 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 e então a fase aquosa foi injetada no equipamento. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

4.2.2.3 Obtenção dos Espectros de Massas

Os espectros de massas foram adquiridos no espectrômetro de massas com ionização *electrospray* e analisador *ion trap* (LCQ-Fleet, Thermo-Scientific). Para a obtenção dos espectros, a fase aquo-metanólica foi injetada continuamente no espectrômetro de massas. A amostra foi bombeada por uma seringa (Hamilton 500 μL) com fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tensão aplicada para a formação do *electrospray* foi + 3kV e -3kV para os modos positivo e negativo, respectivamente, a temperatura de dessolvatação foi 300 $^{\circ}\text{C}$.

4.2.2.4 Tratamento dos dados

Para a realização das análises multivariadas, a matriz de dados \mathbf{X} foi construída (Figura 5). Esta matriz é um agrupamento de vetores que representam as amostras, ou seja, cada linha contém valores medidos para cada variável de uma amostra. A variável é a razão massa/carga (m/z) de cada íon e cada valor de intensidade relativa num dado m/z forma um elemento da matriz. Assim, em cada linha tem-se o espectro de massas de uma amostra (Figura 5).

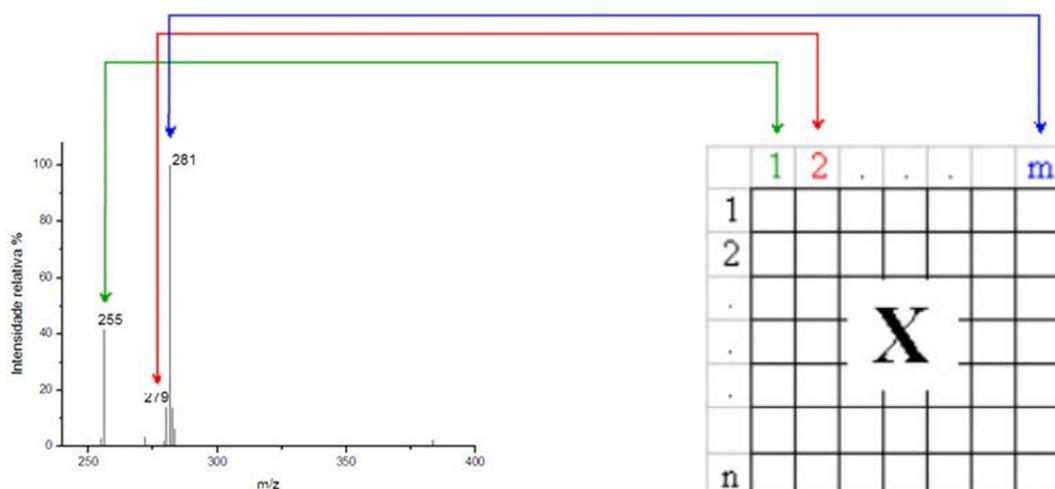


Figura 5: Construção da matriz \mathbf{X} a partir de dados coletados nos espectros de massas.

Para a obtenção do modelo de classificação PLS2-DA construiu-se, as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} . Esta última possui o número de linhas igual ao número de amostras e uma coluna para cada classe contendo o valor binário 0 (não pertence) ou 1 (pertence). O

modelo PLS2-DA foi empregado, porque todas as classes são previstas em um único modelo, ou seja, Y é uma matriz. Se a opção fosse pela construção de modelos PLS1-DA, as amostras seriam discriminadas da mesma maneira, mas seria construído um modelo para cada classe, contendo um vetor y específico.

Para os modelos de calibração multivariada (PLS1) também é necessário que se tenha um vetor y para cada modelo. Nas entradas do vetor y do modelo de calibração coloca-se a concentração de óleo adulterante correspondente a cada amostra.

4.2.3 Resultados

4.2.3.1 Análise dos espectros de massas nos modos positivo e negativo

Nos espectros de massas com ionização *electrospray* no modo positivo, ESI(+)-MS, muitos íons podem ser observados (Figura 6). Alguns íons foram identificados por outros autores, tais como os de m/z 121 e 137, observados nos espectros de massas dos azeites de OEV e OP, que são referentes aos íons $[M+H-H_2O]^+$ dos compostos fenólicos tirosol e hidroxitirosol, respectivamente [83,84]. Outro íon observado nos espectros de massas dos azeites de OEV e OP é o de m/z 417, que pode ser atribuído ao composto fenólico acetoxipinoresinol [85]. Quando se faz uma comparação entre os espectros dos azeites de OEV e OP (Figura 6-a, b), tem-se que os três íons citados são mais intensos no espectro de massas do azeite de OEV. Isso reflete uma maior concentração destes compostos antioxidantes no azeite de OEV, o que é esperado, uma vez que este azeite é mais rico em antioxidantes e, por isso, é o de maior benefício para a saúde. Os íons como os de m/z 165 e 225 são atribuídos aos ácidos cumárico e sinápico [83,84].

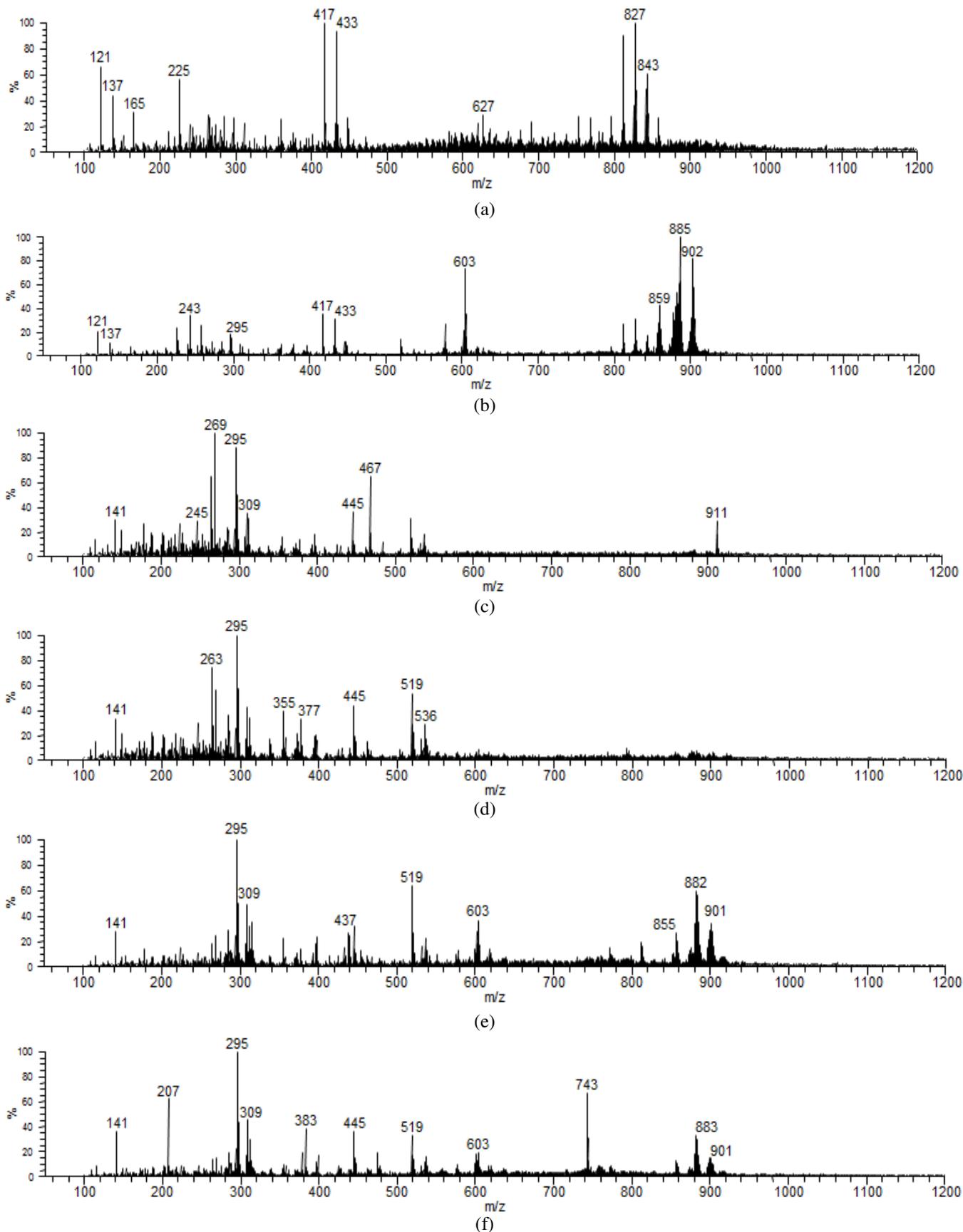
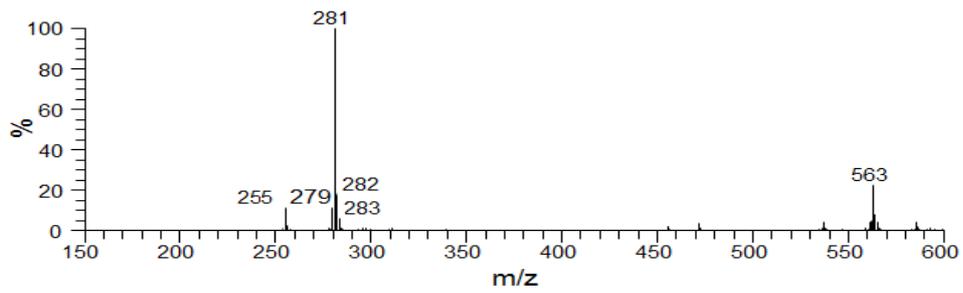


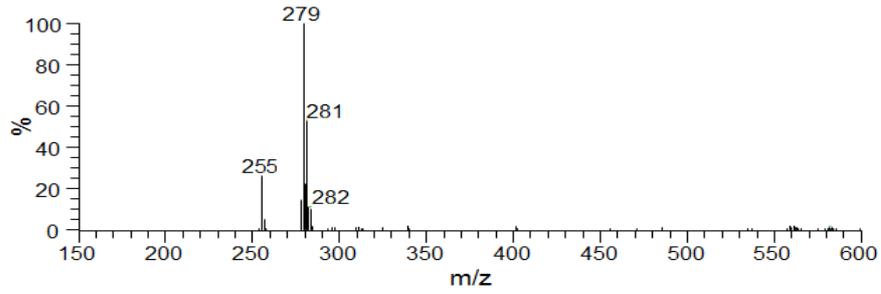
Figura 6: ESI(+)-MS referentes às amostras de azeite de oliva extra virgem (a), azeite de oliva puro (b), óleo de soja (c), óleo de milho (d), óleo de girassol (e) e óleo de canola (f).

Alguns outros íons observados nas faixas de massa de m/z 800-900, 500-600 e 250-400 foram atribuídos às formas protonadas de um conjunto de triacilgliceróis (TAGs), diacilgliceróis (DAGs), e monoacilgliceróis (MAGs), respectivamente [72]. Alguns íons mais abundantes também podem ser atribuídos a TAGs específicos em outros óleos, como o 1,2-dilinoleoil-3-oleoilglicerol (LLO), com m/z 881, e o 1,2-dilinoleil-3-palmitoilglicerol (LLP), de m/z 855, no ESI(+)-MS do óleo de girassol (Figura 6e), e o 2,3-dioleil-1-linoleiglicerol (OOL), de m/z 883, no ESI(+)-MS do óleo de canola (Figura 6f) [86]. No ESI(+)-MS do óleo de soja (Figura 6c), o íon m/z 911 é atribuído ao aduto de sódio $[\text{TAG}+\text{Na}]^+$ do triacilglicerol SSO formado por duas moléculas de ácido esteárico (S) e uma molécula de ácido oleico (O) [87].

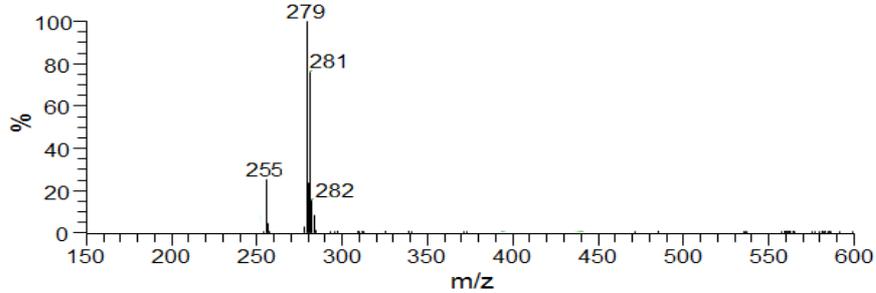
Nos espectros de massas com ionização *electrospray* no modo negativo, ESI(-)-MS (Figura 7), é possível observar íons com m/z referentes aos ácidos graxos mais abundantes de cada tipo de óleo. Observa-se a presença dos mesmos íons em todos os espectros, mas com diferenças nas intensidades relativas. O íon de m/z 281 (forma desprotonada do ácido oleico) é o mais abundante no azeite de oliva e no óleo de canola (Figura 7-a,e); o íon de m/z 279 (forma desprotonada do ácido graxo linoleico) é o mais abundante nos outros óleos vegetais (Figura 7-b,c,d). Fazendo-se uma comparação dos espectros de massas, chega-se à conclusão que o óleo adulterante mais semelhante ao azeite de oliva é o óleo de canola, pois os perfis dos respectivos ESI(-)-MS são muito parecidos [88]. O íon de m/z 255 (forma desprotonada do ácido palmítico) também aparece em todos os espectros de massas, sempre com intensidade menor que 40%. O íon de m/z 563, observado no espectro de massas do azeite de oliva, provavelmente se refere ao dímero de próton do ácido oleico $[\text{oleico}+\text{oleico}+\text{H}]^+$. Os espectros de massas dos azeites extra virgem e puro não apresentaram diferenças visíveis. Isso já era esperado, visto que os seus teores de ácidos graxos não devem ser diferentes, pois ambos os azeites são obtidos do mesmo tipo de matéria prima.



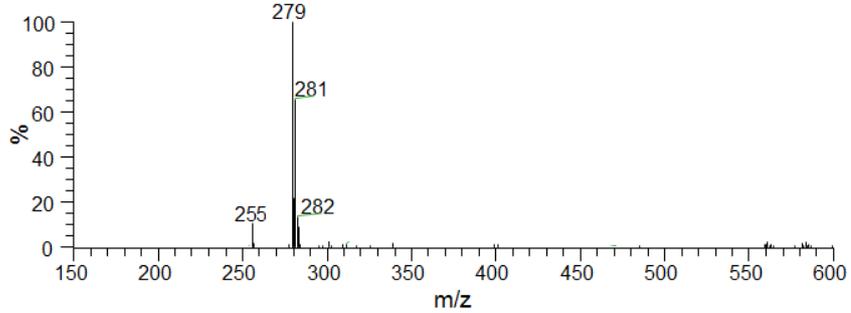
(a)



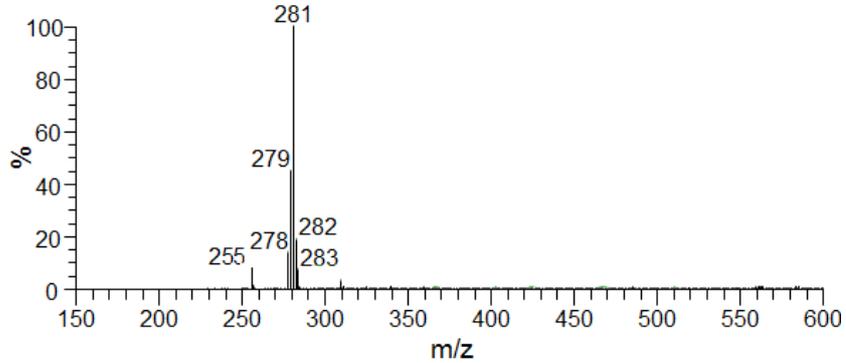
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 7: ESI(-)-MS referente às amostras de azeite de oliva (a), óleo de soja (b), óleo de milho (c), óleo de girassol (d) e óleo de canola (e).

4.2.3.1 Classificação das amostras de azeite

Com os dados dos espectros de massas no modo positivo foi possível construir um modelo PLS2-DA capaz de classificar de forma correta a grande maioria das amostras das 7 classes estudadas: azeites de OEV e OP, azeite de OEV adulterado com óleo de SO (OEV/SO), azeite de OEV adulterado com óleo de MI (OEV/MI), azeite de OEV adulterado com óleo de GI (OEV/GI), azeite de OEV adulterado com óleo de CA (OEV/CA) e azeite de OEV adulterado com azeite de OP (OEV/OP), Figura 8.

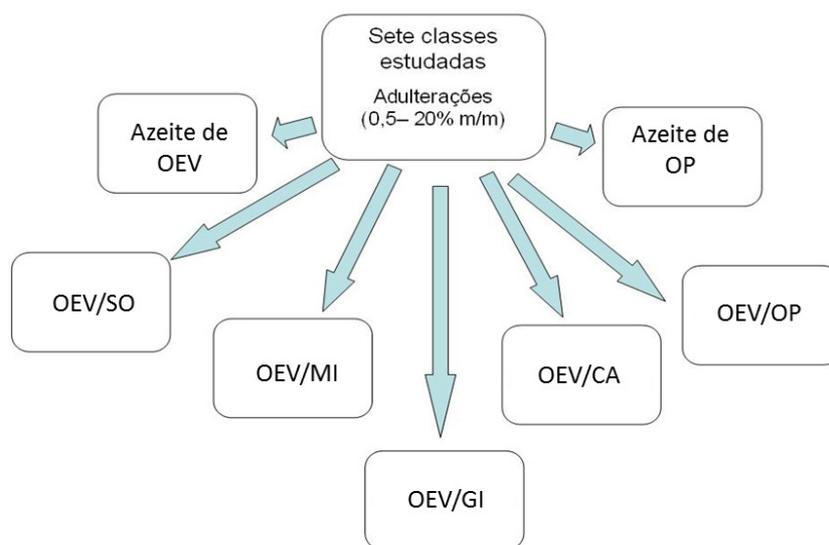


Figura 8: Representação esquemática indicando as classes utilizadas no modelo de classificação PLS-DA.

Para construir o modelo de classificação utilizou-se 190 amostras (20 amostras de azeite de OEV, 20 amostras de azeite de OP, e 30 amostras para cada tipo de adulterante, totalizando 150 amostras adulteradas) para o conjunto de treinamento e 70 amostras (10 amostras de cada classe) para o conjunto de teste. As amostras foram separadas em conjuntos de treinamento e teste usando o algoritmo de Kennard-Stone dentro de cada classe. Este algoritmo de mapeamento uniforme é capaz de selecionar as amostras mais representativas para o conjunto de treinamento com base na distância euclidiana entre seus respectivos pontos [89]. Para construir o modelo, os dados foram centrados na média. O melhor modelo foi construído com oito variáveis latentes (VLs), escolhidas por meio da validação cruzada no modo subconjuntos aleatórios. Na construção do modelo são calculados limites (*threshold*) para classificar a amostra como pertencente ou não a uma determinada classe; este limite é mostrado nos gráficos da

Figura 9. É importante ressaltar que o limite para cada classe foi estimado usando o teorema de Bayes [52] a fim de minimizar os erros de classificação. O cálculo deste valor limite assume que a variância dos valores de y previstos segue uma distribuição semelhante ao que vai ser observado para as amostras futuras.

Nos gráficos de classificação mostrados na Figura 9, todas as classes foram classificadas corretamente. Por exemplo, na Figura 9-a a classe 1 (OEV) aparece claramente separada (acima do limite) das demais (classes 2-7), tanto para o conjunto de treinamento quanto para o conjunto teste. Resultados semelhantes foram obtidos para todas as outras classes (Figura 9 b-g). Nota-se também que mesmo as amostras adulteradas com o menor teor de adulterantes (0,5 % m/m) foram classificadas corretamente para todas as classes, incluindo o grupo de amostras de azeite de OEV adulterado com azeite de OP, dois tipos de amostras muito semelhantes. Este resultado demonstra a viabilidade da presente metodologia para identificação de fraudes com azeite de oliva extra virgem.

Após a criação do modelo, alguns parâmetros de qualidade foram estimados, dentre os quais pode-se destacar a sensibilidade e a especificidade qualitativas. A sensibilidade qualitativa é a capacidade do método para detectar amostras verdadeiramente positivas como positivas e, para tal, calcula-se a razão entre o número de amostras corretamente classificadas pelo número real de amostras pertencentes à classe. A especificidade é a capacidade do método para detectar amostras verdadeiramente negativas como negativas e, para calcular este parâmetro, divide-se o número de amostras corretamente previstas como não pertencente à classe pelo número de amostras que não pertencem à classe [90]. Ambos os parâmetros foram calculados para os conjuntos de treinamento e teste, e excelentes resultados foram obtidos (Tabela 2). A sensibilidade qualitativa foi calculada para as sete classes e os valores foram sempre 1,00 para ambos os conjuntos de treinamento e teste. Estes resultados revelam, portanto, a ausência total de falsos negativos, ou seja, todas as amostras foram corretamente atribuídas às suas classes. Da mesma forma, os valores calculados para a especificidade foram maiores do que 0,981 e 0,967 para os conjuntos de treinamento e teste, respectivamente. Isto significa que apenas três falsos positivos para o conjunto de treinamento e dois falsos positivos para o conjunto teste foram observados, ambos para a classe de amostras adulteradas com óleo de girassol. Para as classes de azeites de OEV

e OP, o valor de especificidade foi 0,994, devido à ocorrência de um falso positivo para cada classe.

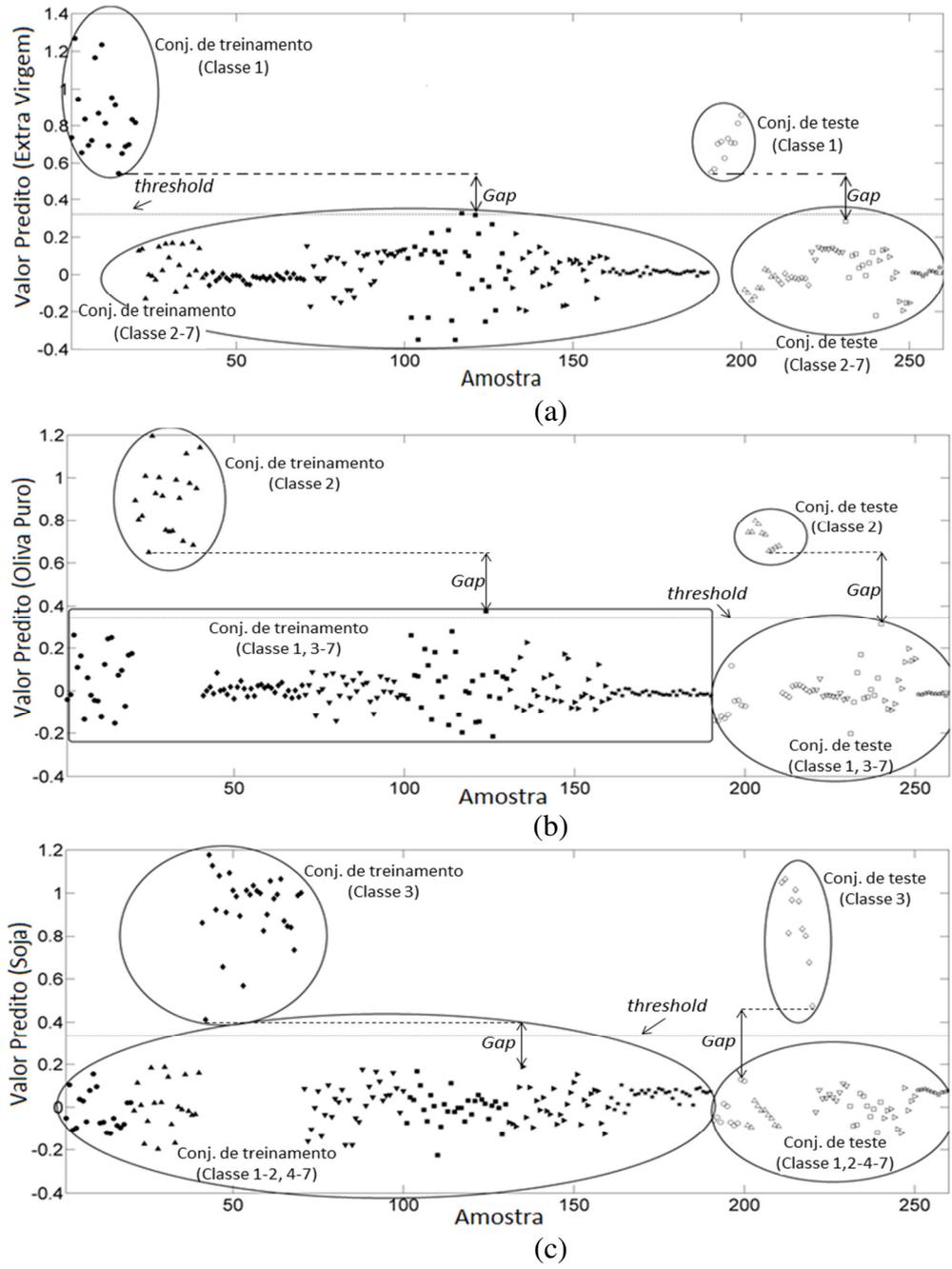
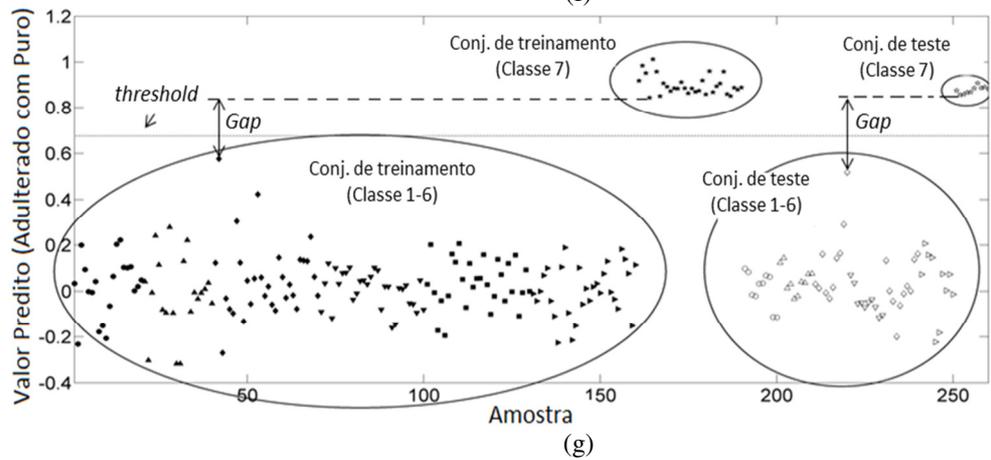
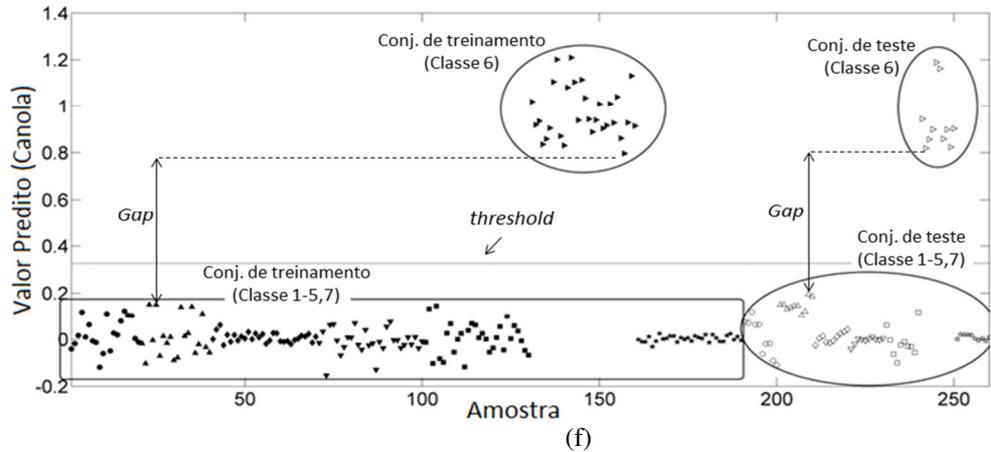
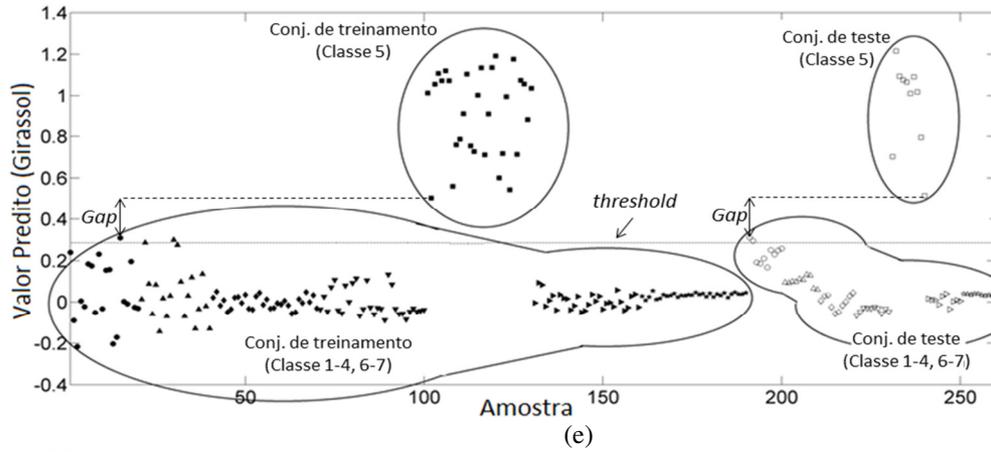
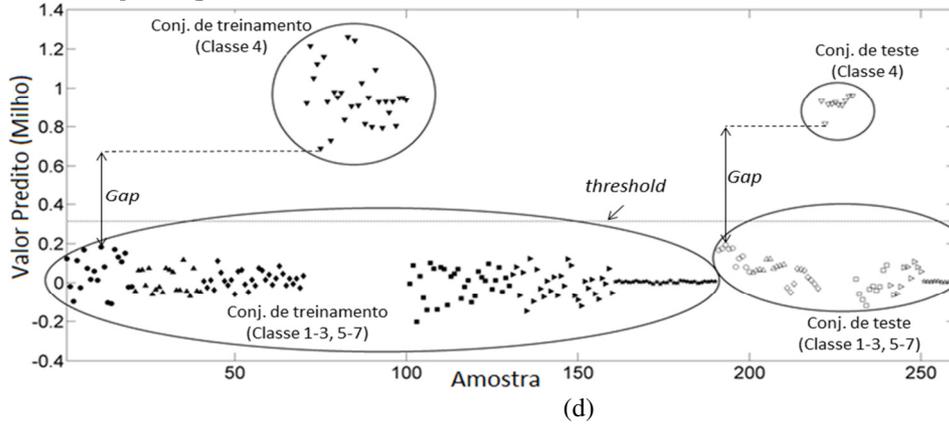


Figura 9: Gráficos de classificação para as sete classes: OEV (●); OP (▲); OEV/SO (◆); OEV/MI (▼); OEV/GI (■); OEV/CA (▶); OEV/OP (*).

Continuação (figura 9)



Além da sensibilidade e especificidade qualitativas, existe outra maneira simples de avaliar a capacidade de distinção entre as classes, calculando-se a distância (*gap*) entre elas (Figura 9). O cálculo é feito medindo-se a diferença entre o valor mais próximo ao *threshold* da classe avaliada, ou seja, o menor valor acima do limiar, e o maior valor das amostras inferiores ao *threshold* (outras classes) [91]. Estes valores também são mostrados na Tabela 2 e, como pode ser observada, a menor distância foi 0,20 para a classe de amostras adulteradas com girassol, tanto para o conjunto de treinamento quanto para o conjunto de teste. Estes resultados são consistentes com outros trabalhos da literatura [91] e indicam que o modelo de classificação é robusto e eficiente.

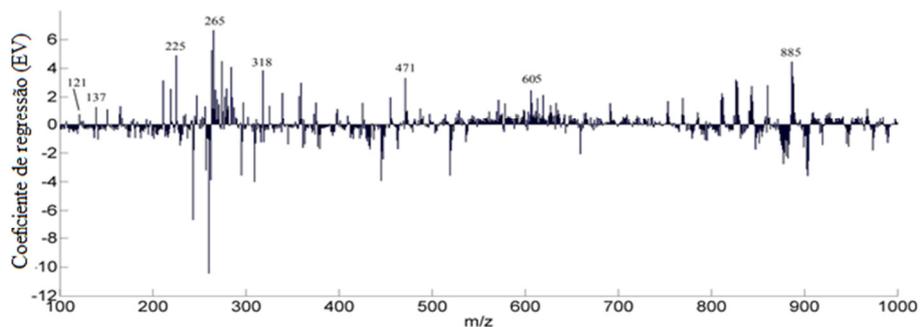
Tabela 2: Resultados obtidos para sensibilidade qualitativa, especificidade e *gap* dos conjuntos de treinamento e teste para o modelo de classificação das sete classes estudadas

Classe*	OEV	OP	OEV/SO	OEV/MI	OEV/GI	OEV/CA	OEV/SO
Conjunto de treinamento							
Senibilidade qualitativa	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Especificidade	0,994	0,994	1,000	1,000	0,981	1,000	1,000
<i>Gap</i>	0,22	0,37	0,22	0,51	0,20	0,65	0,26
Conjunto teste							
Senibilidade qualitativa	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Especificidade	1,000	1,000	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000
<i>Gap</i>	0,27	0,35	0,34	0,64	0,20	0,62	0,34

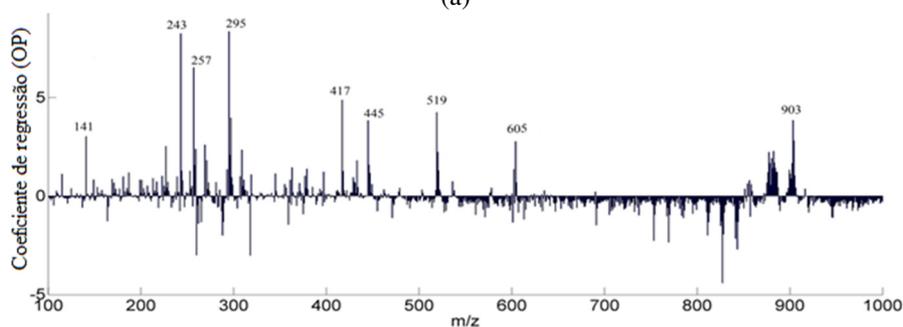
Para a construção deste modelo, não é necessário conhecer a identidade de todos os íons detectados no espectro de massas. De fato, isso não é possível em virtude da baixa resolução do equipamento utilizado. Contudo, podem-se fazer sugestões a respeito destas estruturas com base em dados da literatura. Primeiro, é necessário que se avalie quais os íons (variáveis) foram mais importantes para a construção do modelo de classificação, e isso pode ser feito com base na observação dos coeficientes de regressão de cada classe. Na Figura 10 são mostrados os coeficientes de regressão de cada classe e, em cada coeficiente de regressão, existem variáveis com valores positivos e

negativos. Os valores positivos no eixo y indicam as variáveis que mais contribuíram para discriminar as amostras pertencentes a cada classe e os valores negativos discriminam as amostras não pertencentes à respectiva classe. Na Tabela 3, estas variáveis m/z foram agrupadas de acordo com a classe para a qual contribuem na discriminação, buscando possíveis atribuições espectrais.

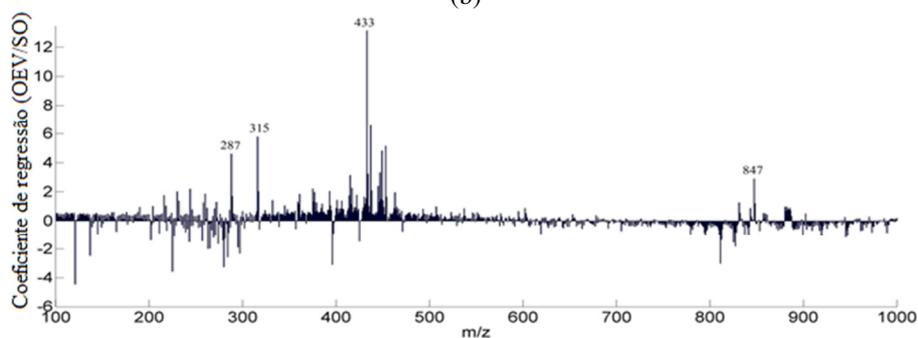
Alguns destes íons já foram citados inicialmente, quando se analisou os espectros de massas dos óleos puros; agora são assinalados os íons mais importantes na classificação de cada classe. É importante destacar que os íons de maior intensidade em um espectro de massas não são necessariamente os mais importantes para sua classificação/discriminação. O íon mais importante no modelo pode ser um pico com intensidade baixa e, se não fosse através dos coeficientes de regressão, poderia passar despercebido durante a análise visual dos espectros de massas.



(a)



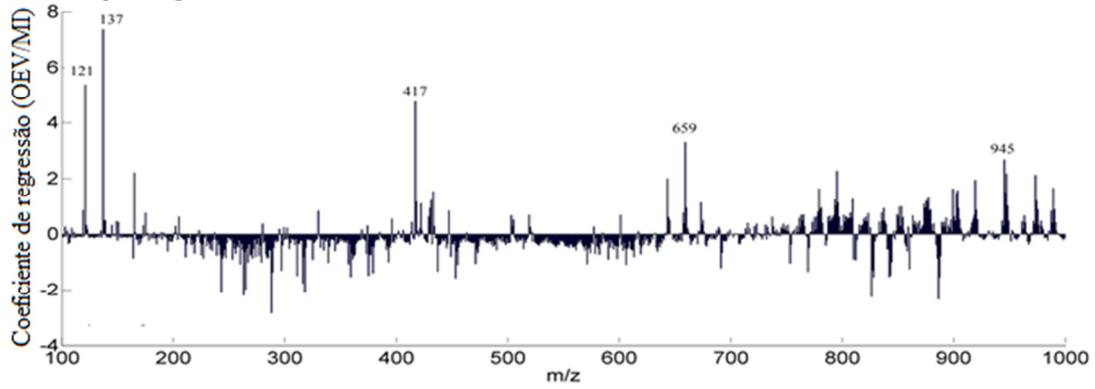
(b)



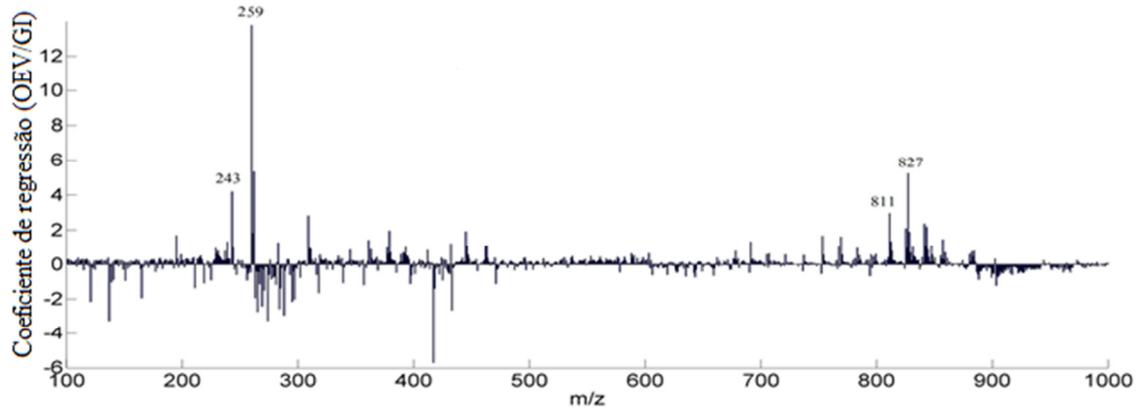
(c)

Figura 10: Vetores dos coeficientes de regressão do modelo PLS2-DA: (a) OEV, (b) OP, (c) OEV/SO, (d) OEV/MI, (e) OEV/GI, (f) OEV/CA e (g) OEV/OP.

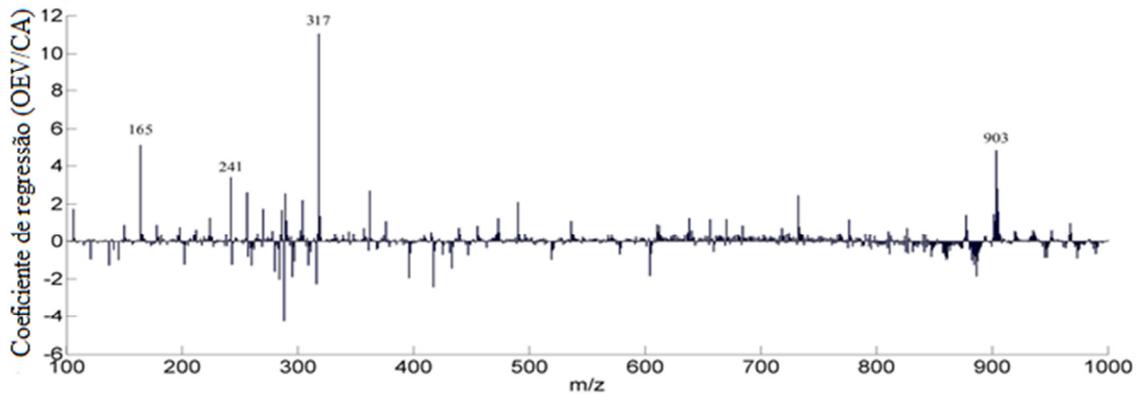
Continuação figura 10



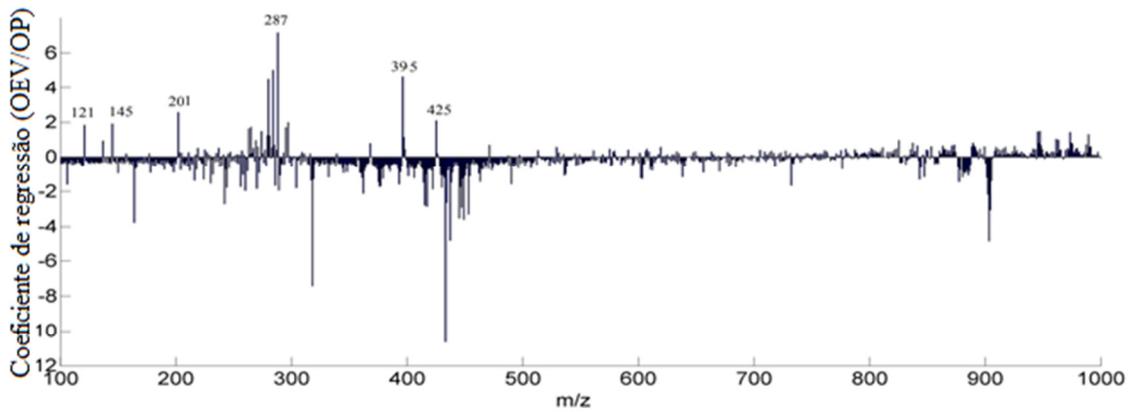
(d)



(e)



(f)



(g)

Tabela 3: Íons mais importantes para a classificação de cada grupo de amostras e uma possível identificação para eles com base na literatura.

Classe	Íons mais importantes na classificação em cada classe
OEV	121 (tirosol) ^[83] , 137 (hidroxitirosol) ^[83] , 225 (ácido sinápico) ^[83] , 265 e 318 (MAGs) ^[72] , 359 (pinoresinol) ^[85] , 471 (não identificado) e 605 (DAG) ^[72] , 885 (1,2,3 trioleilglicerol) ^[86]
OP	141 e 243 (não identificados), 257 (MAG) ^[72] , 417(acetoxipinoresinol) ^[85] , 445 (não identificado), 519 (DAG) ^[72] , 605 (não identificado), 903 (TAG) ^[72]
OEV/SO	287 e 315 (MAG) ^[72] , 433 (não identificado) ^[83] , 847 (TAG) ^[72]
OEV/MI	121 (tirosol) ^[83] , 137 (hidroxitirosol) ^[83] , 417 (acetoxipinoresinol) ^[85] , 659 (não identificado), 945 (não identificado)
OEV/GI	243 (não identificado), 259 (MAG) ^[72] , 811 e 827 (TAG) ^[72]
OEV/CA	165(ácido cumárico) e 241 (não identificado), 317 (não identificado) ^[83] , 903 (TAG) ^[72]
OEV/OP	121 (tirosol) ^[83] , 145 e 201 (não identificado), 287 (MAG) ^[72] , 395 (não identificado) ^[83] , 425(não identificado)

Com os dados dos espectros de massas no modo negativo também foi possível classificar amostras de azeite de OEV adulteradas com os diferentes tipos de óleos vegetais. No entanto, as amostras de azeite de OEV e azeite de OP foram confundidas e, com isso, a classificação não foi eficiente para os fins do presente trabalho. Esta dificuldade de classificação ocorreu porque os espectros no modo negativo dos dois tipos de azeites são praticamente indistinguíveis.

4.2.3.2 Quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem

No item anterior, as amostras foram classificadas quanto ao adulterante detectado ou tipo de azeite. Dando seguimento a este estudo, as amostras que foram identificadas como adulteradas tiveram a concentração do adulterante predita por modelos de calibração multivariada (Figura 11). A estratégia adotada foi inspirada em um trabalho desenvolvido para o controle de qualidade de combustível [92].

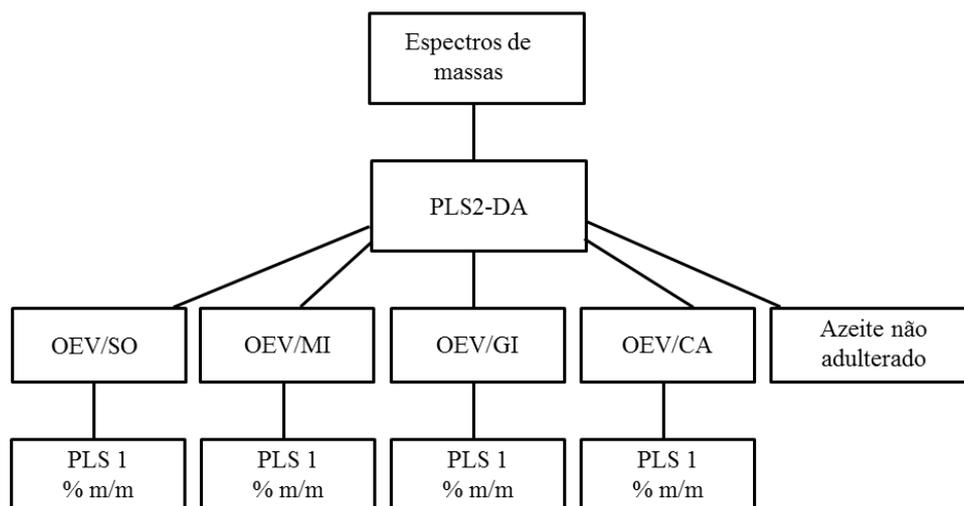


Figura 11: Estratégia quimiométrica utilizada para a identificação e a quantificação de adulterantes em azeite de OEV.

Amostras utilizadas para a construção dos modelos

Para a construção dos modelos de calibração utilizou-se as 40 amostras adulteradas propositadamente (30 amostras para o conjunto de calibração e 10 amostras para o conjunto de validação). As amostras de calibração e validação foram escolhidas de modo que as amostras de validação ficassem distribuídas de forma homogênea e simétrica em toda a faixa de concentração estudada, 0,5 – 20 % m/m, e sempre mantendo-se as amostras de validação dentro do intervalo de concentração das amostras de calibração.

Foram feitas extrações com as amostras, as quais foram preparadas em triplicata. Os espectros de massas foram obtidos nos modos positivo e negativo e os dados foram compilados e tratados. Uma descrição detalhada sobre todas as etapas foi apresentada na parte experimental deste capítulo.

Modelos construídos com dados de ESI(+)-MS

Após a separação das amostras em dois conjuntos, calibração e validação, iniciou-se a construção dos modelos. As tentativas iniciais para construção de todos os modelos PLS mostraram uma primeira variável latente (VL) que é responsável por uma variância explicada muito maior em \mathbf{X} (espectros de massas) do que em \mathbf{y} (concentrações). Isso indica que uma parte significativa da variância em \mathbf{X} não está relacionada com \mathbf{y} , o que pode perturbar a modelagem e causar erros nas previsões das amostras. Esta situação justifica o uso do OSC [46], uma técnica de pré-processamento para remover as informações em \mathbf{X} que não estão relacionadas ao vetor \mathbf{y} . Então, os dados foram pré-processados com OSC e centrados na média, para todos os modelos, e o número de VLs em cada modelo foi escolhido por validação cruzada de blocos contínuos (com nove divisões), com base nos menores valores de RMSECV.

Na sequência, os modelos foram otimizados através da identificação e retirada de amostras anômalas. As amostras anômalas (*outliers*) são definidas como amostras que diferem significativamente do grupo de origem. Esta diferença pode ser causada por erros na aquisição dos dados, ou simplesmente porque as amostras realmente não fazem parte da mesma população. A detecção de *outliers* é muito importante em calibração multivariada, e pode ser feita de várias maneiras. No presente trabalho utilizou-se uma metodologia robusta que baseia-se na eliminação de amostras com alto *leverage* (ou influência) e altos resíduos, tanto em \mathbf{X} (espectrais) como em \mathbf{y} (valores de concentração) com 95% de confiança [48,49]. A identificação de amostras anômalas no conjunto de validação foi feita pelo teste de *Jacknife* e, assim, as amostras são avaliadas de acordo com o resíduo; se o resíduo for maior que um valor crítico, então ela é considerada um *outlier* [50].

O número de *outliers* identificados variou entre um e três, para cada modelo, para os conjuntos de calibração e validação. As amostras correspondentes ao nível mais baixo, 0,5 % m/m, foram considerados *outliers* em quase todos os modelos, a única exceção sendo o modelo de quantificação de óleo de CA. A única amostra excluída deste modelo, no conjunto de calibração, foi a amostra adulterada com 19,5 % m/m. O número de VLs usado para a construção de cada modelo variou entre três e cinco. Os parâmetros para cada modelo são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Número de amostras de validação e calibração e número de variáveis latentes para cada modelo construído a partir de dados de ESI(+)-MS

Parâmetro	Óleo de SO	Óleo de MI	Óleo de GI	Óleo de CA
Nº de amostras de calibração	29	27	29	29
Nº de amostras de validação	8	9	9	8
Nº de VLs	5	4	5	3

O desenvolvimento de modelos de calibração multivariada não exige identificação dos íons (variáveis) mas, para estes modelos, assim como foi feito no modelo qualitativo, é possível identificar quais os íons são mais importantes na quantificação de cada óleo adulterante. Isso é feito analisando os coeficientes de regressão de cada modelo (Figura 11).

Nos gráficos dos coeficientes de regressão, os íons com valores positivos contribuem para a predição do analito (óleo adulterante) e os íons com valores negativos estão relacionados ao azeite de OEV.

Vale ressaltar que alguns íons diagnósticos do ESI(+)-MS do azeite de OEV já foram citados na literatura [83, 84], como m/z 121 (tiroso), m/z 137 (hidroxitiroso) e m/z 165 (ácido cumárico), os quais apresentaram coeficientes de regressão negativos para todos os modelos PLS. Também pode-se observar outras variáveis com valores negativos nos gráficos dos coeficientes de regressão: os íons de m/z 319, 361, 379, 443, 449, 505, 549, 811, 827 e 843. Os dois últimos íons foram destacados no ESI(+)-MS de OEV (Figura 6a). Os íons que mais contribuem para a previsão de cada óleo adulterante estão indicados nas Figuras 12a-d.

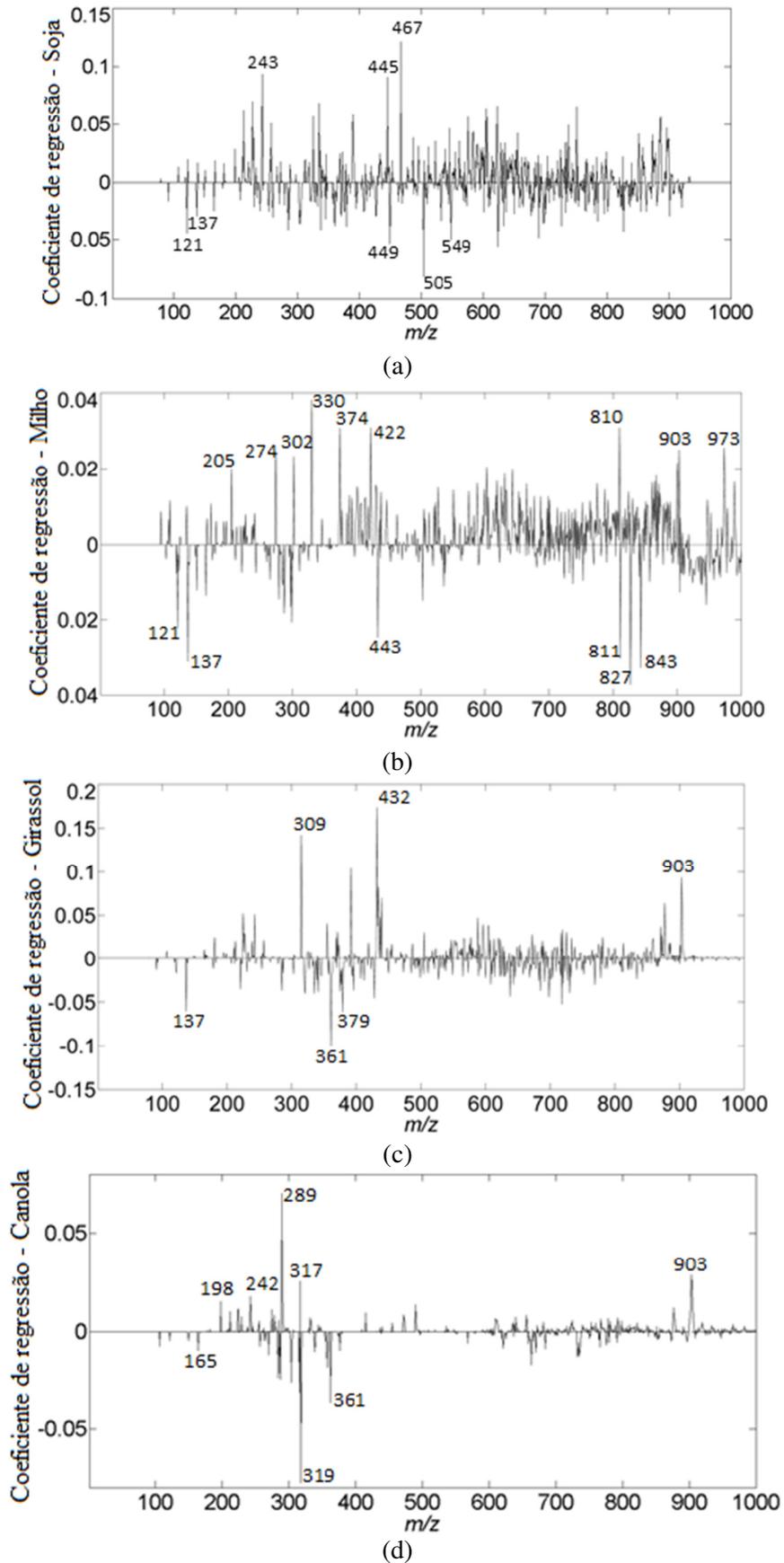


Figura 12: Coeficientes de regressão dos modelos de quantificação de óleo de a) SO, b) MI, c) GI e d) CA em azeite de OEV.

Quantificação de óleo de SO em azeite de OEV

O modelo construído para quantificação de óleo de SO em azeite de OEV explicou 97% da variância dos dados em **Y** e 42% em **X**. O RMSEC calculado para o modelo foi 0,97 % m/m e o RMSEP foi 1,73% m/m. O gráfico de ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos juntamente com as barras de erro que são representadas pelo desvio padrão das triplicatas de cada amostra é mostrado na Figura 13. O maior erro relativo de previsão para o conjunto de validação foi de -20,2% (Tabela 5).

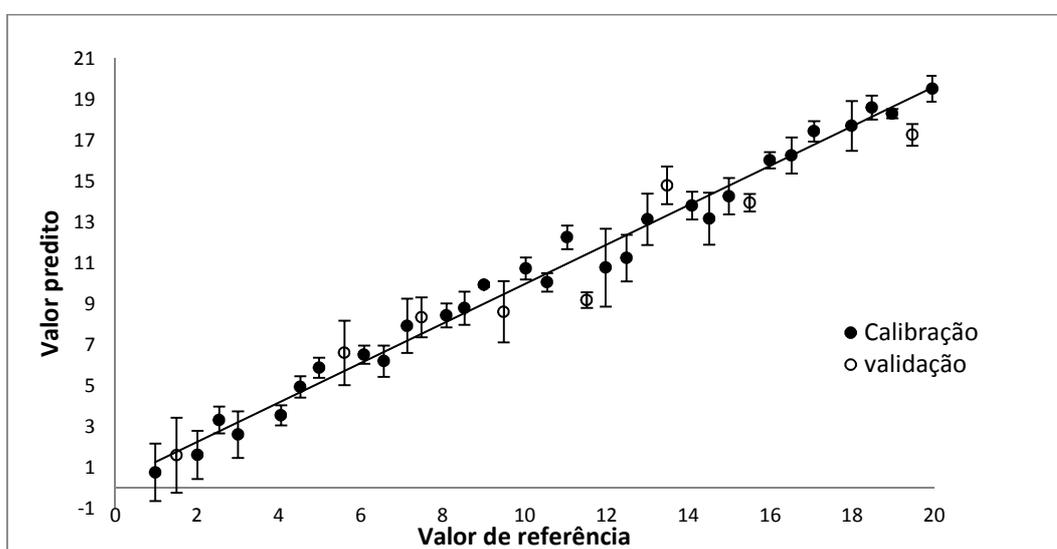


Figura 13: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo de SO em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Tabela 5: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de SO em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Valor de Referência (% m/m)	Valor Predito (% m/m)	Erro relativo (%)
1,50	1,60	7,0
5,60	6,61	18,1
7,48	8,35	11,7
9,49	8,62	-9,1
11,52	9,19	-20,2
13,48	14,81	9,8
15,5	13,96	-10,0
19,47	17,27	-11,3

Quantificação de óleo de MI em azeite de OEV

O modelo construído para quantificação de óleo de MI em azeite de OEV explicou 98% da variância dos dados em **Y** e 62% em **X**. O RMSEC calculado para o modelo foi 0,91 % m/m e o RMSEP foi 1,01% m/m. O gráfico de ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos juntamente com as barras de erro que são representadas pelo desvio padrão das triplicatas de cada amostra é mostrado na Figura 14. O maior erro relativo de previsão para o conjunto de validação foi de 24,6% (Tabela 6)

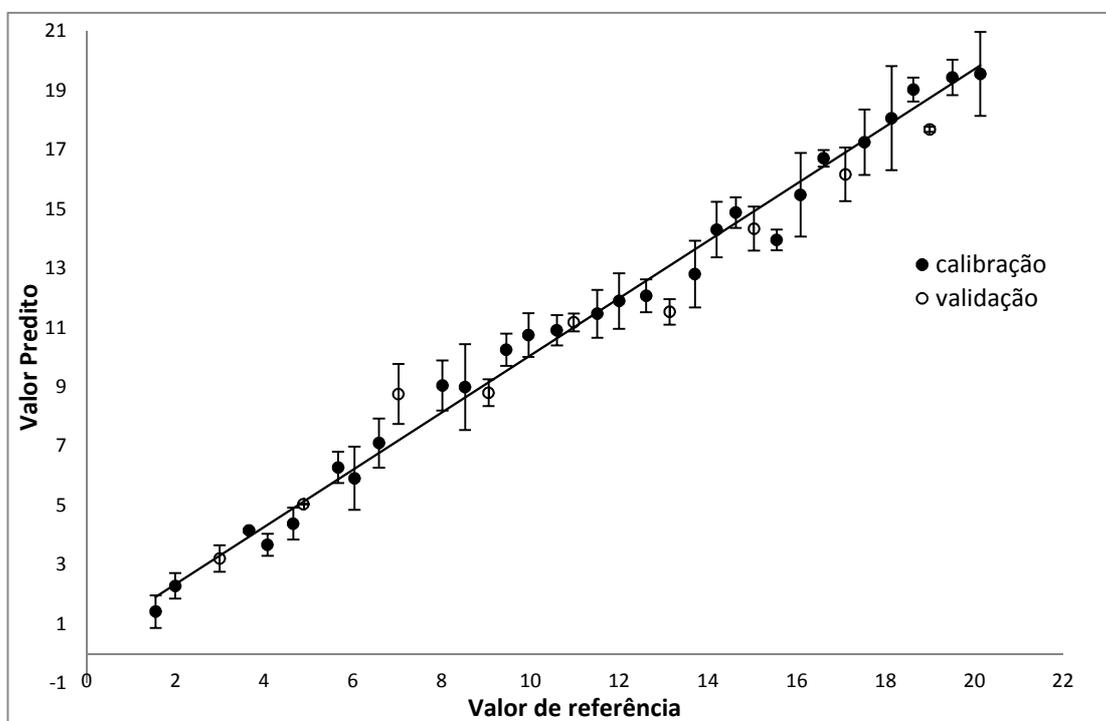


Figura 14: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo MI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Tabela 6: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de MI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Valor de Referência (% m/m)	Valor Predito (% m/m)	Erro relativo (%)
3,00	3,21	7,0
4,89	5,04	3,1
7,03	8,76	24,6
9,06	8,80	-2,9
10,98	11,17	1,7
13,14	11,53	-12,3
15,04	14,33	-4,7
17,10	16,17	-5,5
19,00	17,68	-7,0

Quantificação de óleo de GI em azeite de OEV

O modelo construído para quantificação de óleo de GI em azeite de OEV explicou 99% da variância dos dados em **Y** e 51% em **X**. O RMSEC calculado para o modelo foi 0,55 % m/m e o RMSEP foi 1,37% m/m. O gráfico de ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos juntamente com as barras de erro que são representadas pelo desvio padrão das triplicatas de cada amostra é mostrado na Figura 15. O maior erro relativo de previsão para o conjunto de validação foi de 30,9% (Tabela 7).

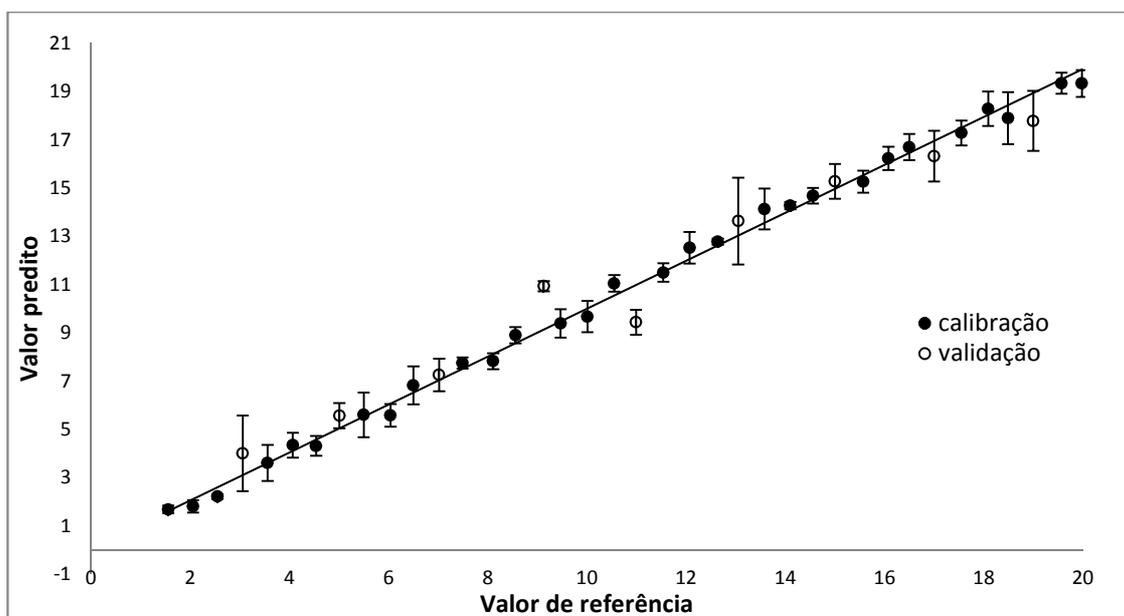


Figura 15: Ajuste dos valores preditos *vs.* valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Tabela 7: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Valor de Referência (% m/m)	Valor Predito (% m/m)	Erro relativo (%)
3,06	4,01	30,9
5,01	5,57	11,2
7,02	7,26	3,4
9,13	10,93	19,7
10,99	9,43	-14,2
13,05	13,63	4,4
15,00	15,27	1,8
17,00	16,31	-4,0
19,00	17,78	-6,4

Quantificação de óleo de CA em azeite de OEV

O modelo construído para quantificação de óleo de CA em azeite de oliva extra virgem explicou 98% da variância dos dados em **Y** e 59% em **X**. O RMSEC calculado para o modelo foi 0,69 % m/m e o RMSEP foi 1,03% m/m. O gráfico de ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos juntamente com as barras de erro que são representadas pelo desvio padrão das triplicatas de cada amostra é mostrado na Figura 16. O maior erro relativo de previsão para o conjunto de validação foi de 48,7% (Tabela 8).

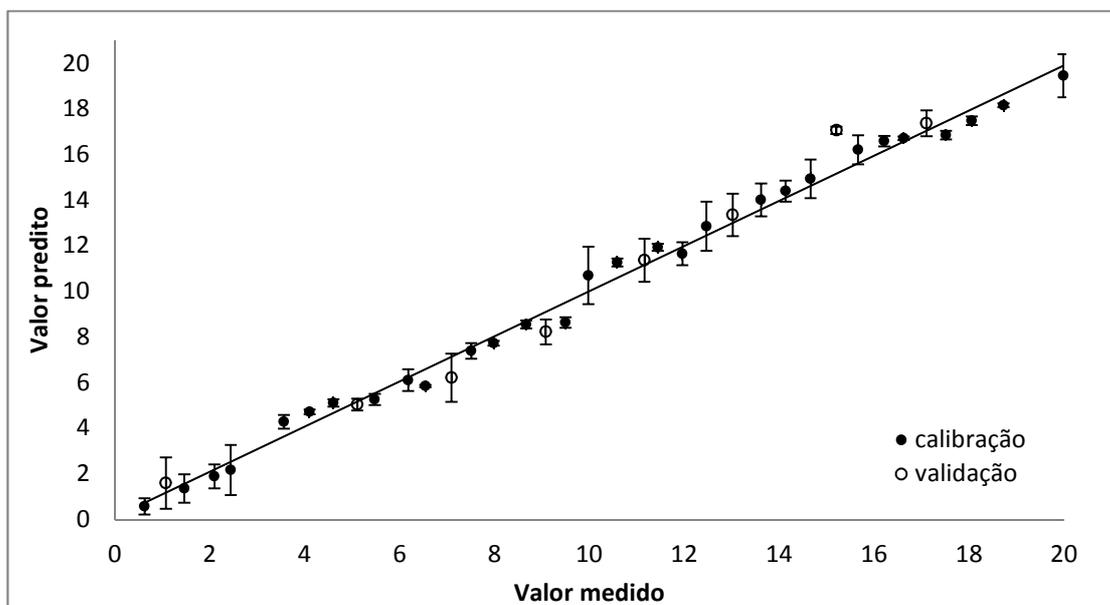


Figura 16: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo de CA em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Tabela 8: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de CA em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Valor de Referência (% m/m)	Valor Predito (% m/m)	Erro relativo (%)
1,08	1,60	48,7
5,11	5,04	-1,3
7,09	6,22	-12,3
9,08	8,23	-9,4
11,16	11,37	1,9
13,02	13,36	2,6
15,21	17,06	12,2
17,10	17,37	1,6

Quantificação de azeite de OP em azeite de OEV

Com os dados dos ESI(+)-MS não foi possível construir um bom modelo de calibração para quantificação de azeite de oliva puro em azeite de oliva extra virgem. Uma explicação para este fato pode ser a semelhança entre os ESI(+)-MS dos dois azeites, como foi discutido no item 4.2.3.1. O modelo construído apresentou erros de previsão altíssimos, maiores que 100%, e por isso não foram mostrados os resultados.

Validação analítica dos modelos PLS construídos com dados ESI(+)-MS

Os quatro métodos PLS desenvolvidos foram validados através de estimativas de figuras de mérito. Os resultados estão resumidos na Tabela 9.

Para métodos multivariados pode-se avaliar a linearidade através do ajuste dos valores de referência pelos valores preditos e, para tal avaliação, o parâmetro mais utilizado é o coeficiente de correlação (r). Como pode ser observado na Tabela 9, todos os modelos apresentaram uma boa linearidade, expressa como valores de r superiores a 0,993. No entanto, apenas o valor de r não é suficiente para avaliação da linearidade; então é necessário que se faça uma avaliação da aleatoriedade dos resíduos, utilizando-se uma metodologia baseada em três testes estatísticos, originalmente usados em métodos univariados [50]. Para a confirmação da aleatoriedade dos resíduos é necessário provar que os mesmos seguem uma distribuição normal, são homocedásticos e independentes. Para verificação da normalidade dos resíduos, utilizou-se o teste de Ryan-Joiner, no qual os resíduos são considerados normalmente distribuídos se o R estimado for superior a um R crítico, e este valor crítico é calculado em função do número de amostras. O teste foi feito com 95% de confiança e apenas o modelo de previsão para o óleo de GI não atendeu a esse critério. No entanto, os resíduos de tal modelo foram considerados normais num nível de confiança de 99 % (Tabela 9). Na sequência, a homocedasticidade dos resíduos foi avaliada com o teste de Brown-Forsythe. Neste teste, os resíduos são considerados homoscedásticos se o valor de p estimado estiver acima do $p > 0,05$ (95 %). Como pode ser observado, todos os modelos apresentaram resíduos homoscedásticos a 95% de confiança. Finalmente, a presença de autocorrelação dos resíduos foi avaliada com o teste de Durbin-Watson e, para três dos quatro modelos, este teste comprovou que os resíduos são independentes a 95% de confiança. A única exceção foi o modelo para quantificação de óleo de MI, para o qual os resíduos só podem ser considerados independentes a 99% de confiança.

O *bias*, ou viés, foi calculado apenas com amostras de validação, de acordo com a norma ASTM [59]. Este cálculo consiste em um teste t , no qual calcula-se t_{bias} (Equação 7), e se o valor de t calculado for maior que o t crítico para n_v graus de liberdade confirma-se a existência de erro sistemático. Como pode ser visto na Tabela 9,

não foi verificada a presença de erros sistemáticos em nenhum dos modelos apresentados.

A precisão foi avaliada no nível de repetitividade através da estimativa do coeficiente de variação CV (%) das triplicatas de três níveis de concentração, 4% m/m, 10 % m/m e 16 % m/m. A recomendação é que se faça 6 replicatas de pelo menos 3 níveis de concentração. O critério de aceitação é que o valor do coeficiente de variação CV (%) seja inferior a 0,9 % para analitos de concentração 10 a 100 g/kg (1 a 10 % m/m) e 0,7 % para analitos de concentração 100 a 200 g/kg (10 a 20 % m/m) [53]. Como pode ser visto na Tabela 9, os modelos apresentados não mostraram a precisão recomendada, mas deve-se levar em consideração que o analito estudado aqui é um óleo adulterante em uma matriz também oleosa e não se trata, portanto, de análise trivial. Talvez estes valores de precisão recomendados estejam muito distantes da realidade de tal análise.

A veracidade dos modelos pode ser avaliada pela raiz quadrada do erro quadrático médio dos conjuntos de calibração (RMSEC) e validação (RMSEP). Estes parâmetros variaram entre 0,55-0,97 % m/m e 1,01-1,73 % m/m, respectivamente, indicando que os valores estimados apresentaram uma boa concordância com os valores de referência. A veracidade pode ser observada também pelos erros médios relativos das amostras de validação, os quais são mostrados nas Tabelas 5 a 8. A média dos valores absolutos destes erros, para cada modelo, está entre 7,63 % e 12,14 %, mostrados na Tabela 9.

Para os métodos univariados busca-se 100 % de seletividade, mas para métodos multivariados não existe significado prático em estabelecer este requisito. Ao contrário de métodos univariados, baixos valores de seletividade podem ser observados até mesmo para métodos PLS considerados satisfatórios. Para os quatro modelos validados, os valores estimados de seletividade indicam que apenas uma pequena fração (de 14 % a 39 %) do sinal analítico foi utilizada para prever a adulteração.

A sensibilidade também foi estimada e depende da técnica analítica utilizada e, por conseguinte, não é adequada para a comparação com outros métodos. Assim, a sensibilidade analítica (γ) foi calculada dividindo a sensibilidade pela estimativa do ruído instrumental ($\varepsilon = 0,178$), o qual foi obtido a partir do desvio padrão combinado de 15 repetições do branco. O inverso da γ fornece uma estimativa da diferença mínima de concentração que pode ser discriminada pelo modelo e os valores variaram de 0,03 a

0,09 % m/m, isso considerando o ruído instrumental aleatório como única fonte de erro. Este valor também indica o número de casas decimais (duas) para serem utilizados na expressão dos resultados.

Os LD e LQ foram estimados em 3,3 e 10 vezes do inverso da γ , respectivamente [93]. Para os LD os valores variaram de 0,1 a 0,3 % m/m e para LQ variaram de 0,3 a 0,9 % m/m. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

E, por fim, calculou-se o parâmetro RPD, a razão entre a variação natural nas amostras de calibração ou de validação para o tamanho de prováveis erros que ocorrem durante a predição [60]. Ele representa o quão bem o modelo de calibração quantifica o analito nas amostras e, por levar em consideração a faixa de trabalho, é mais adequado para avaliar o desempenho de um modelo em termos absolutos. De acordo com a literatura [60, 94], bons modelos de calibração devem ter RPD superior a 2,4. Para os quatro modelos, os valores de RPD variaram entre 3,1 e 5,6, indicando o seu bom desempenho.

Tabela 9: Figuras de mérito dos quatro modelos PLS construídos com os dados ESI(+)-MS (os testes foram realizados a 95% de confiança)

Parâmetro	Analito	Óleo de soja			Óleo de milho			Óleo de girassol			Óleo de canola		
	Testes	Valores calculados		Limites	Valores calculados		Limites	Valores calculados		Limites	Valores calculados		Limites
Linearidade	Normalidade	R = 0,9829		R > 0,9696	R = 0,9860		R > 0,9689	R = 0,9609		R > 0,9580 ^a	R = 0,9706		R > 0,9696
	Homocedasticidade	p = 0,6193		p > 0,05	p = 0,3357		p > 0,05	p = 0,5683		p > 0,05	p = 0,8622		P > 0,05
	Independência	2,19		1,53 - 2,58	1,42		1,32 - 2,68 ^a	1,72		1,54 - 2,57	1,76		1,53 - 2,58
	r	0,9931			0,9951			0,9984			0,9966		
Erro Sistemático	Viés (<i>Bias</i>)	t = 0,86		t < 2,31	t = 0,84		t < 2,26	t = 0,29		t < 2,26	t = 0,57		t < 2,31
Precisão	CV (%) (4%, 10% e 16%)	13,83	5,02	2,45	10,16	6,84	2,53	11,7	6,72	3,01	2,33	1,58	1,41
Veracidade	RMSEC %m/m	0,97			0,91			0,55			0,69		
	RMSEP %m/m	1,73			1,01			1,37			1,03		
	Erro relativo médio %	12,14			7,63			10,67			11,24		
Seletividade	...	0,14			0,27			0,20			0,39		
Sensibilidade	...	1,96			4,90			2,13			6,28		
Sensibilidade analítica γ (% m/m) ⁻¹	...	11,0			27,5			12,0			35,3		
1/ γ	...	0,09			0,04			0,08			0,03		
LD % m/m	...	0,30			0,13			0,26			0,10		
LQ % m/m	...	0,90			0,40			0,80			0,30		
RPD	RPD calibração	3,1			5,6			4,3			5,6		
	RPD validação	3,3			5,5			4,0			5,2		

^aTestes realizados a 99% de confiança.

Modelos construídos com dados de ESI(-)-MS

Com as amostras separadas em dois blocos, 30 amostras para o conjunto de calibração e 10 amostras para o conjunto de validação, iniciou-se a construção dos modelos com os dados de ESI(-)-MS.

Os dados foram centrados na média e o número de VL de cada modelo foi escolhido com base no menor valor do RMSECV. A validação cruzada foi feita por blocos contínuos (com nove divisões).

Os modelos foram otimizados pela detecção de *outliers*. Para as amostras de calibração utilizou-se uma metodologia que se baseia na eliminação de amostras com alto *leverage* e altos resíduos [48,49] e para as amostras de validação utilizou-se o teste de Jacknife [50].

O número de *outliers* variou entre três e cinco para os conjuntos de calibração e, nos conjuntos de validação, foi detectado um *outlier* em cada modelo. Para o modelo de quantificação de óleo de SO, as duas primeiras amostras (0,5 e 1,0 % m/m) foram identificadas como *outliers*. Isso demonstra a incapacidade de previsão das amostras com baixos teores de adulterante. Para o modelo de quantificação de óleo de GI a amostra de 0,5% m/m foi retirada e para o modelo de quantificação de óleo de MI a amostra de 0,5% m/m fez parte do conjunto de calibração. O número de amostras de calibração e validação e o número de VLs após a otimização pode ser visto na Tabela 10.

Tabela 10: Número de amostras de validação e calibração e número de variáveis latentes para cada modelo construído a partir de dados de ESI(-)-MS

Parâmetro	Óleo de SO	Óleo de MI	Óleo de GI
Nº de amostras de calibração	25	25	27
Nº de amostras de validação	9	9	9
Nº de VLs	4	4	5

Para os modelos de calibração construídos com os dados de ESI(-)-MS também fez-se a análise dos íons que são mais importantes para a quantificação dos analitos (óleos adulterantes) e esta verificação foi possível com base nos coeficientes de regressão de cada modelo (Figura 17). As variáveis (*m/z*) com valores positivos nos gráficos da Figura 17 contribuem para a predição do analito (adulterante) e as variáveis com valores negativos estão relacionadas ao azeite de OEV. É possível observar os íons

referentes a ácidos graxos desprotonados citados anteriormente, de m/z 281 (ácido oleico), m/z 279 (ácido linoleico), m/z 255 (ácido palmítico) e m/z 563 (dímero do ácido oleico).

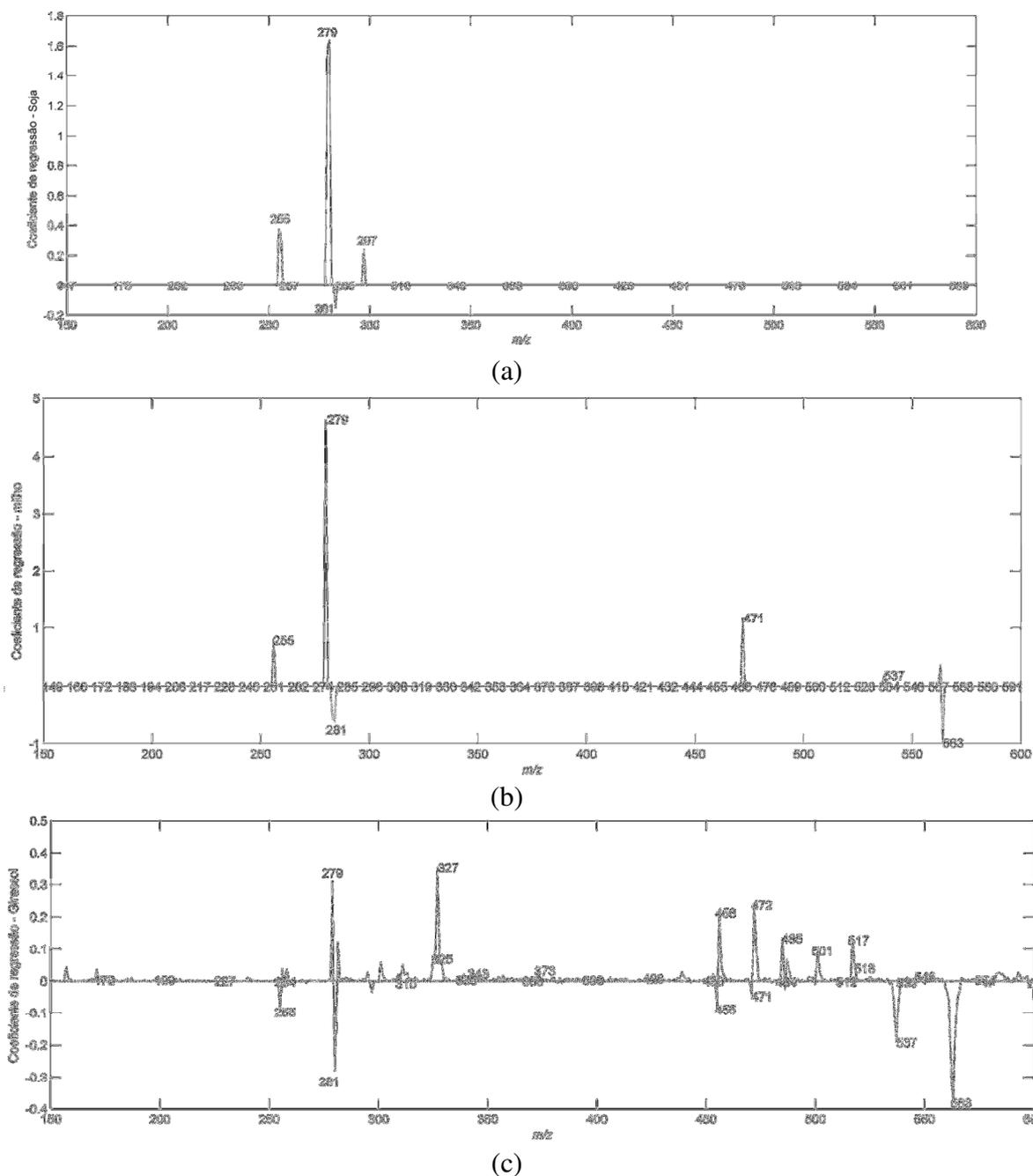


Figura 17: Coeficientes de regressão dos modelos de quantificação de óleo de SO (a), MI (b) e GI (c) em azeite de OEV para os modelos construídos a partir de dados de ESI(-)-MS.

Quantificação de óleo de SO em azeite de OEV

O modelo construído para quantificação de óleo de SO em azeite de oliva extra virgem explicou 97 % da variância dos dados em **Y** e 98 % em **X**. O RMSEC calculado para o modelo foi 0,98 % m/m e o RMSEP foi 1,24 % m/m. O gráfico de ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos juntamente com as barras de erro que são representadas pelo desvio padrão das triplicatas é mostrado na Figura 18. O maior erro relativo de previsão para o conjunto de validação foi de 13,6 % (Tabela 11).

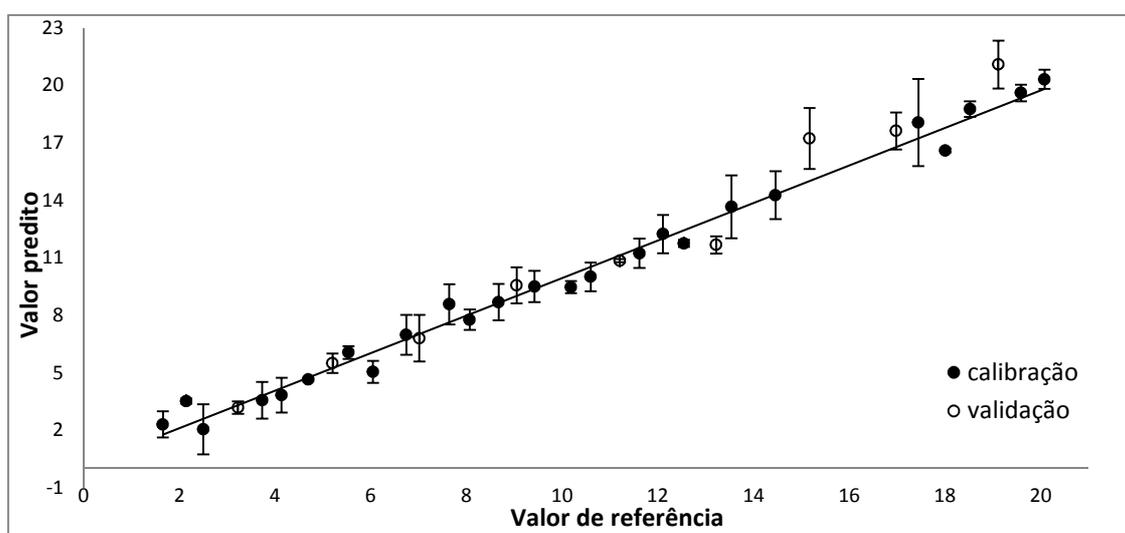


Figura 18: Ajuste dos valores preditos *vs.* valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo de SO em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS.

Tabela 11: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de SO em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS

Valor de Referência (% m/m)	Valor Predito (% m/m)	Erro relativo (%)
3,23	3,19	-1,3
5,20	5,51	5,9
7,02	6,80	-3,0
9,05	9,57	5,7
11,21	10,86	-3,1
13,22	11,68	-11,7
15,171	17,23	13,6
16,98	17,63	3,8
19,12	21,10	10,4

Quantificação de óleo de MI em azeite de OEV

O modelo construído para quantificação de óleo de MI em azeite de OEV explicou 94 % da variância dos dados em **Y** e 99 % em **X**. O RMSEC calculado para o modelo foi 1,22 % m/m e o RMSEP foi 1,35 % m/m. O gráfico de ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos juntamente com as barras de erro que são representadas pelo desvio padrão das triplicatas é mostrado na Figura 19. O maior erro relativo de previsão para o conjunto de validação foi de 40,2 % (Tabela 12).

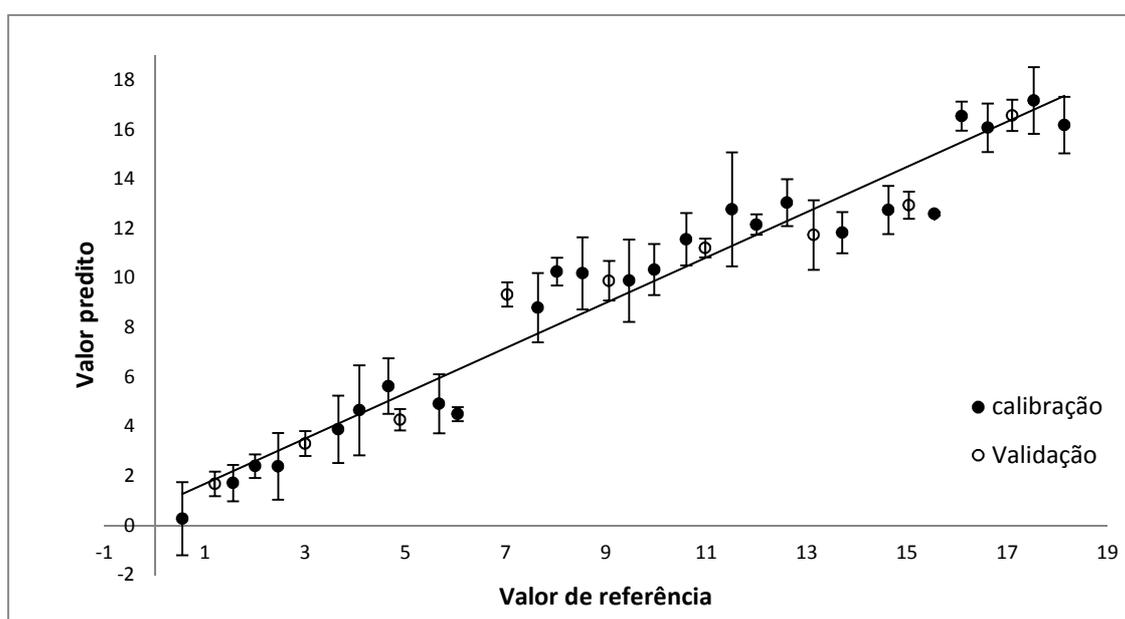


Figura 19: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo de MI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS.

Tabela 12: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de MI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS

Valor de Referência (% m/m)	Valor Predito (% m/m)	Erro relativo (%)
1,20	1,68	40,2
3,00	3,31	10,3
4,89	4,27	-12,7
7,03	9,33	32,8
9,06	9,89	9,1
10,98	11,22	2,1
13,14	11,74	-10,7
15,04	12,94	-14,0
17,10	16,57	-3,1

Quantificação de óleo de GI em azeite de OEV

O modelo construído para quantificação de óleo de GI em azeite de OEV explicou 97 % da variância dos dados em **Y** e 71 % em **X**. O RMSEC calculado para o modelo foi 0,93 % m/m e o RMSEP foi 1,64 % m/m. O gráfico de ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos juntamente com as barras de erro que são representadas pelo desvio padrão das triplicatas é mostrado na Figura 20. O maior erro relativo de previsão para o conjunto de validação foi de 57,2 % (Tabela 13).

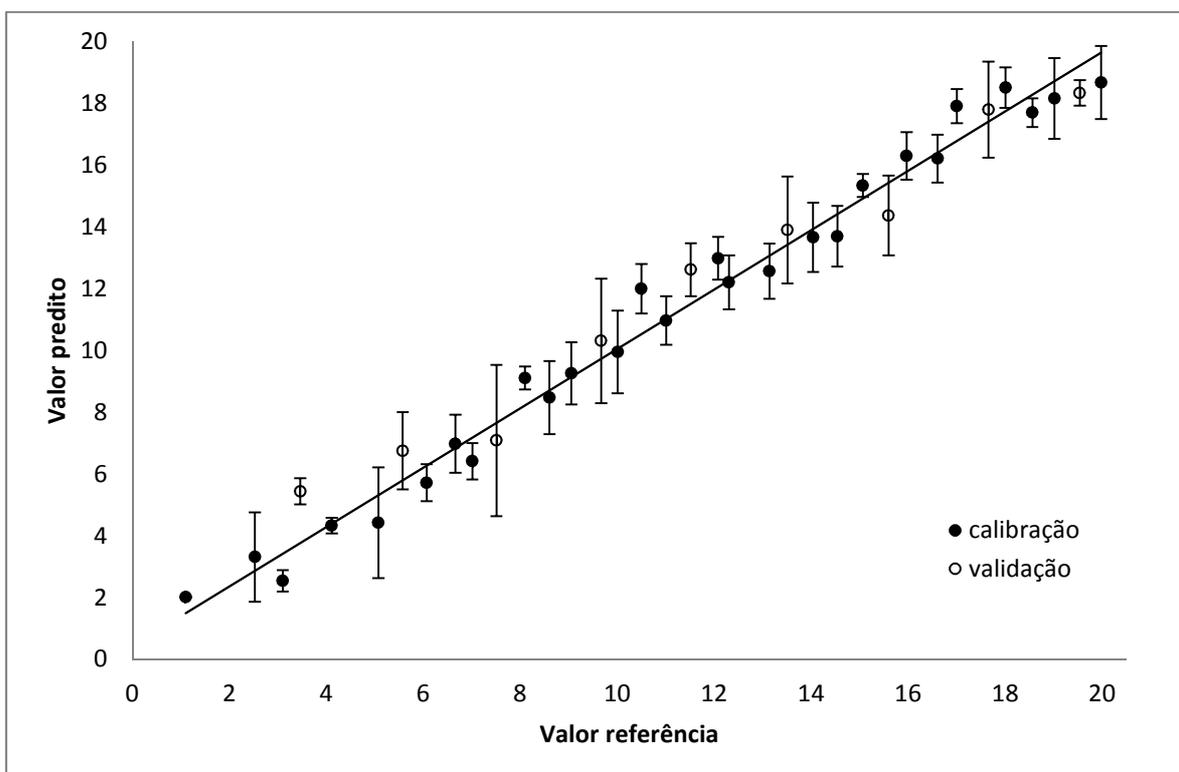


Figura 20 Ajuste dos valores preditos *vs.* valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS.

Tabela 13: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-MS

Valor de Referência (% m/m)	Valor Predito (% m/m)	Erro relativo (%)
3,46	5,44	57,2
5,58	6,76	21,2
7,51	7,09	-5,5
9,67	10,32	6,7
11,52	12,62	9,6
13,51	13,90	2,9
15,60	14,37	-7,9
17,66	17,80	0,8
19,54	18,34	-6,2

Quantificação de óleo de CA em azeite de OEV

Com os dados dos ESI(-)-MS não foi possível construir um bom modelo de calibração para quantificação de óleo de CA em azeite de OEV. Uma explicação para este fato pode estar relacionado à semelhança entre os ESI(-)-MS do óleo de canola e do azeite de oliva, como foi mostrado e discutido anteriormente. O modelo construído apresentou erros de previsão altíssimos e por isso não foram apresentados os resultados.

Validação dos modelos PLS construídos com dados ESI(-)-MS

Os três modelos construídos com dados do modo negativo também foram validados por meio de estimativas de figuras de mérito.

A linearidade foi avaliada pelo ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos e por testes estatísticos que comprovam a aleatoriedade dos resíduos dos modelos. Como pode ser observado na Tabela 14, dois dos três modelos construídos apresentaram excelente ajuste, com r superior a 0,99. O modelo de quantificação de óleo de MI teve um r menor (0,9740), mas que também demonstra um bom ajuste. De acordo com os testes de Ryan-Joiner, Brow-Forsythe e Durbin-Watson, os resíduos dos três modelos seguem uma distribuição normal, são homocedásticos e independentes a um nível de 95% de confiança (Tabela 14).

A avaliação de erros sistemáticos foi feita de acordo com a norma da ASTM [59] e, como pode ser visto na Tabela 14, não existe indício de erros sistemáticos nos modelos.

A precisão foi avaliada no nível de repetitividade através da estimativa do CV (%) das triplicatas de três níveis de concentração, 4 % m/m, 10 % m/m e 16 % m/m, da mesma maneira que foi feito para os modelos construídos no modo positivo. Os valores de coeficiente de variação CV (%) para o menor valor de concentração variaram de 5,5 a 19 %, para o valor intermediário (3,3 a 9 %) e para o maior valor (2,2 a 3,5 %), Tabela 14. Os modelos construídos com dados de ESI(-)-MS não mostraram a precisão recomendada, assim como ocorreu com os modelos construídos com dados de ESI(+)-MS.

A veracidade dos modelos foi avaliada através dos valores de RMSEC, que variou de 0,93 a 1,22 % m/m, e RMSEP, que variou de 1,23 a 1,64 % m/m. Também foi calculado o erro relativo das amostras dos conjuntos de validação (tabelas 11 a 13) e as médias dos valores absolutos dos erros para cada modelo, que variaram de 6,5 a 15%, são mostradas na Tabela 14.

Estimou-se também a seletividade para os três modelos, e os valores obtidos indicam que apenas 12, 10 e 11 % do sinal analítico foram usados para a quantificação de óleo de SO, óleo de MI e óleo de GI, respectivamente.

A sensibilidade e sensibilidade analítica (γ) foram estimadas. Para o cálculo da γ foi necessário a estimativa do ruído instrumental (ϵ) que, para o modo negativo foi 0,143. O inverso da sensibilidade analítica fornece a diferença mínima, entre concentrações que pode ser discriminado pelo método, com este valor (γ^{-1}) é possível calcular o LD e LQ (Tabela 14). O mínimo discernível pelos métodos foram, 0,2 % m/m, 0,06 % m/m e 0,1 % m/m para os modelos de quantificação de óleo de SO, MI e GI, respectivamente, e os valores de LD variaram de 0,2 a 0,6 % m/m e LQ variaram de 0,6 a 1,9 % m/m.

Os valores de RPD foram calculados e os resultados podem ser vistos na Tabela 14. Os modelos de quantificação de óleo de SO e óleo de MI apresentaram bom desempenho e somente o modelo de quantificação de óleo de GI apresentou um valor RPD menor que 2,4 para o conjunto de calibração. Isso ocorreu porque o RMSECV calculado foi 3,8 % m/m, bem maior que o RMSEP de 1,64 %m/m. Isso normalmente não ocorre, pois tanto o RMSECV e RMSEP são calculados com as previsões de

amostras que não pertencem ao modelo e normalmente eles têm valores bem próximos, como foi observado nos seis modelos anteriores.

Após a validação dos modelos, pode-se fazer comparações com outros métodos, também construídos com dados de ESI-MS, encontrados na literatura. Vale ressaltar que neste trabalho foi realizada uma validação completa, ausente em qualquer outro trabalho publicado na literatura. Em um dos artigos citados inicialmente, que realizou a quantificação de biomarcadores de colesterol alto [27], os autores construíram o modelo com cinco VLs e estimaram o ajuste da curva de valores de referência *versus* valores preditos ($r^2 = 0,995$), o RMSEC (15,0835 mg/dL) e o RMSECV (34,6087 mg/dL), mas não avaliaram o RMSEP, devido à inexistência de um conjunto de validação independente. No artigo que realizou a quantificação de surfactantes em óleo [26], o único parâmetro avaliado pelos autores foi o ajuste da curva de valores de referência e valores preditos ($r^2 = 0,97$). No artigo que realizou a quantificação de cafés das espécies robusta e arábica [28], os autores construíram vários modelos, nos modos positivo e negativo, e avaliaram os parâmetros de veracidade, RMSEC, que variou de 1,90-4,37 % m/m, e RMSEP, que variou de 2,54-23,03 % m/m.

Também é possível fazer comparações dos resultados do presente trabalho com outros modelos PLS construídos com dados de infravermelho para a quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva. Dois destes artigos foram construídos com dados de infravermelho médio (MIR) [80,81]. No primeiro artigo, os autores construíram modelos PLS e PCR para a quantificação de óleo de palma [80], mas somente avaliaram os parâmetros de linearidade e veracidade: r^2 , RMSECV (0,285-1,44 % m/m) e RMSEP (0,616-2,27 % m/m). No segundo artigo, os parâmetros avaliados foram r^2 , RMSEC (0,48-0,78 % m/m) e RMSEP (1,04-1,4 % m/m) [81]. Em outro artigo previamente citado, os autores utilizaram dados de NIR [82] e construíram modelos PLS para a quantificação de óleo de soja, milho, girassol, canola e algodão em azeite de OEV, mas também só avaliaram os parâmetros de veracidade, RMSECV (0,45-7,60 % m/m) e RMSEP (0,94-6,41 % m/m). É possível, então, a comparação dos valores de RMSEC e RMSEP dos modelos construídos no presente trabalho e os parâmetros dos modelos encontrados na literatura. Assim, o desempenho dos modelos validados no presente trabalho é comparável como o dos outros modelos, tanto para outras matrizes e analitos utilizando ESI-MS, quando para a mesma matriz, utilizando outras técnicas de análise.

Tabela 14: Figuras de mérito dos quatros modelos PLS construídos com dados ESI(-)-MS (os testes foram realizados a 95% de confiança)

Parâmetro	Analito	Óleo de soja			Óleo de milho			Óleo de girassol		
	Testes	Valores calculados	Limites		Valores calculados	Limites		Valores calculados	Limites	
Linearidade	Normalidade	R = 0,9756	R > 0,9674		R = 0,9816	R > 0,9674		R = 0,9947	R > 0,9689	
	Homocedasticidade	p = 0,17929	p > 0,05		p = 0,2310	p > 0,05		p = 0,6574	p > 0,05	
	Independência	1,77	1,51 - 2,49		1,58	1,51 - 2,49		2,15	1,53 - 2,47	
	r	0,9941			0,9740			0,9921		
Erro Sistemático	Viés (<i>Bias</i>)	t = 0,98	t < 2,26		t = 0,13	t < 2,26		t = 0,68	t < 2,26	
Veracidade	RMSEC % m/m	0,98			1,22			0,93		
	RMSEP % m/m	1,23			1,35			1,64		
	Erro relativo médio %	6,50			15			15		
Precisão	CV (%) (4%, 10% e 16%)	5,5	3,3	2,2	19,0	9,0	3,5	5,9	5,3	3,1
Seletividade	...	0,12			0,10			0,11		
Sensibilidade	...	0,739			2,45			1,44		
Sensibilidade analítica γ (% m/m) ⁻¹	...	5,17			17,13			10,1		
1/ γ	...	0,2			0,06			0,1		
LD % m/m	...	0,6			0,20			0,3		
LQ % m/m	...	1,9			0,60			1,0		
RPD	RPD calibração	4,7			4,0			1,4		
	RPD validação	4,4			4,0			3,3		

4.3 Desenvolvimento de modelos PLS com dados de ESI-MS de alta resolução – ESI-HRMS

A resolução de um espectrômetro de massas pode ser definida pela sua capacidade de separar íons de m/z muito próximos, que em um espectrômetro de massas de baixa resolução seriam indistinguíveis [95].

A alta resolução e alta exatidão de massas apresentada pelo espectrômetro de massas utilizado neste trabalho (modelo IT-TOF, é devido à união de dois analisadores, *ion trap* (IT) e *time-of-flight* (TOF), e pelo controle interno de temperatura do equipamento, que garante uma distância de voo e uma voltagem aceleradora de íons altamente estáveis, podendo assim atingir altos níveis de estabilidade de massa. Obtém-se, assim, leitura de massas com exatidão na quarta casa decimal, possibilitando a identificação inequívoca da fórmula molecular do íon, sem a necessidade de fragmentação.

4.3.1 Objetivo

- Construir modelos PLS para quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem com dados de ESI(+)-HRMS e ESI(-)-HRMS

4.3.2 Parte experimental

4.3.2.1 Amostras

O azeite de oliva extra virgem foi contaminado propositalmente com óleo de girassol. Preparou-se 40 amostras, com a concentração do adulterante variando de 0,5 até 20,0 % m/m, com incrementos de 0,5 % m/m, as amostras foram pesadas em balança analítica (Adventurer Pro, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA).

4.3.2.2 Preparo de amostras

Reagentes

Metanol (Grau HPLC (99,9%) – Merck)

Hidróxido de Amônio (Grau HPLC (28-30%) – J.T.Baker)

A água utilizada no preparo das soluções foi purificada com um sistema Milli-Q de purificação (Millipore, Eschborn, Alemanha)

Procedimento

Realizou-se uma extração líquido-líquido prévia, pois não é possível injetar a amostra oleosa diretamente no espectrômetro de massas. Em um frasco Eppendorf adicionou-se 100 µL de óleo e 1,0 mL de solução metanol/água 50 % v/v e 0,1 % de hidróxido de amônio. Essa mistura foi agitada em vortex (Phoenix AP-56) por 30 segundos e mantida em repouso até a separação completa das fases. A fase aquosa foi transferida para *vials* de 2 mL para uso no injetor automático, que direciona as amostras para a leitura nos modos positivo e negativo simultaneamente. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e colocadas no injetor de forma aleatória.

4.3.2.3 Obtenção dos espectros de massas

As análises foram realizadas no modo de infusão direta utilizando o espectrômetro de massas modelo IT-TOF (Shimadzu, Tokyo, Japão). Foram injetados 5µL de amostra e as seguintes condições de análise foram aplicadas: ionização (ESI) nos modos positivo e negativo (4,5 kV e -3,5 kV, respectivamente), gás de nebulização (nitrogênio) a um fluxo de 1,5 L/min, interface a 200°C e gás de secagem (nitrogênio) a uma pressão de 100 kpa.

4.3.2.4 Tratamento dos dados

O processamento quimiométrico foi realizado utilizando os *softwares* PLS Toolbox v. 6.5 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, EUA) e Matlab v. 7.9 (The Mathworks Inc., Natick, MA, EUA).

4.3.3 Resultados

4.3.3.1 Análise dos espectros de massas nos modos positivo e negativo

No ESI(+)-HRMS referente à amostra de azeite de oliva extra virgem (Figura 21) o único íon identificado com absoluta certeza foi aquele de m/z 417,1581, é atribuído ao composto fenólico acetoxypinoresinol. No ESI(+)-HRMS referente à amostra de óleo de girassol (Figura 22) os íons não foram identificados. Nos ESI(-)-HRMS do azeite de oliva extra virgem (Figura 23) e do óleo de girassol (Figura 24) foi possível observar os íons referentes às formas desprotonadas dos ácidos palmítico (m/z 255,2355), linoleico (m/z 279,2353) e oleico (m/z 281,2500). Outro íon também identificado no ESI(-)-HRMS do azeite de oliva extra virgem foi aquele de m/z 153,0539, referente à forma desprotonada do hidroxitirosol, um composto fenólico existente no azeite. Utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução, é possível determinar a fórmula molecular de cada íon, através de suas massas exatas, com erro máximo de 20 ppm. Outro parâmetro que pode ser avaliado para a confirmação estrutural é o DBE, *Double Bond Equivalence*, que permite estimar o número de insaturações presentes em uma estrutura química [95]. As massas experimentais e teóricas, juntamente com o erro e o DBE, são apresentados na Tabela 15. Na Tabela 16, as fórmulas estruturais de todos os compostos identificados são apresentadas.

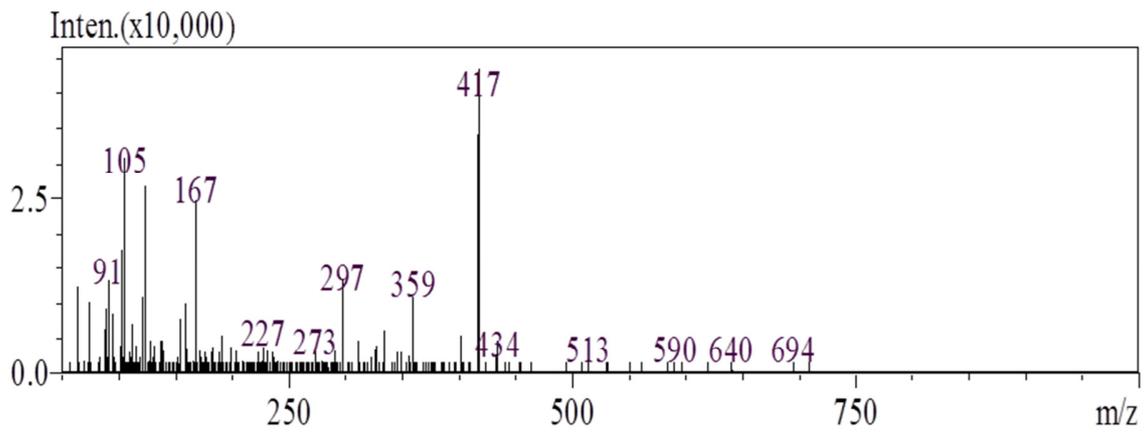


Figura 21: ESI(+)-HRMS referente à amostra de azeite de oliva extra virgem.

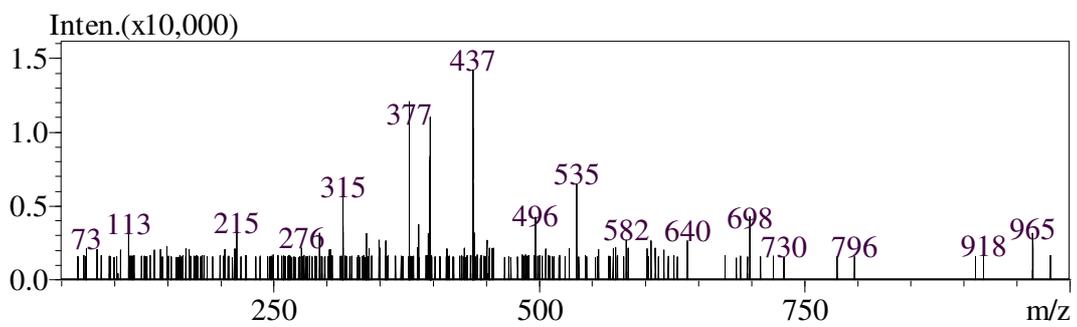


Figura 22: ESI(+)-HRMS referente à amostra de óleo de girassol.

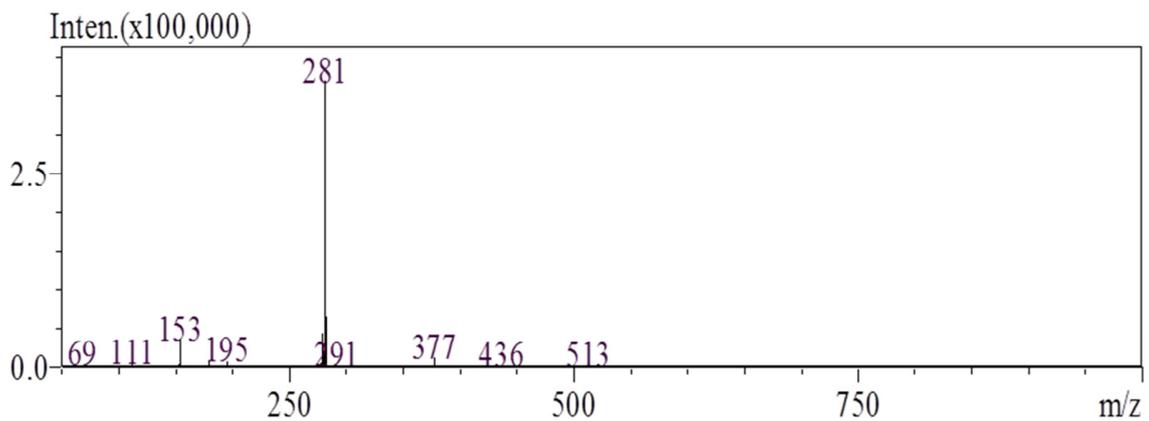


Figura 23: ESI(-)-HRMS referente à amostra de azeite de oliva extra virgem.

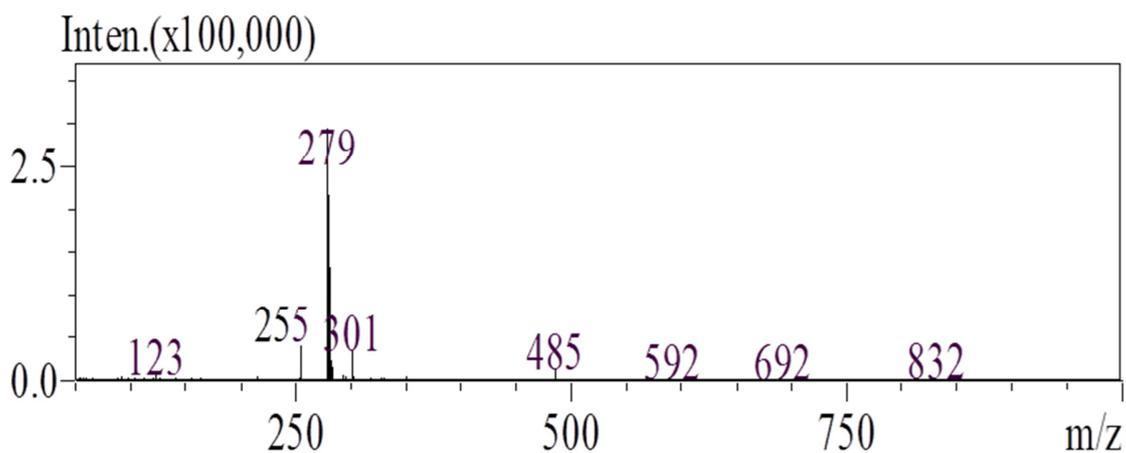
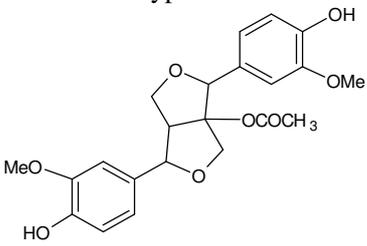
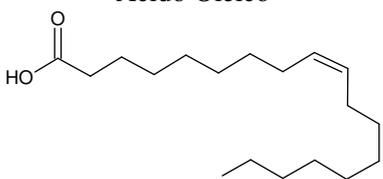
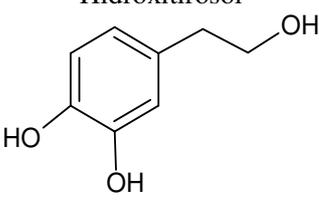
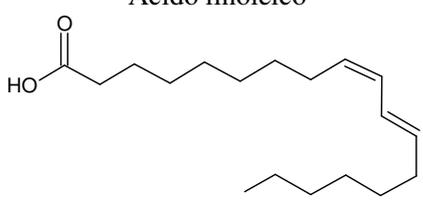
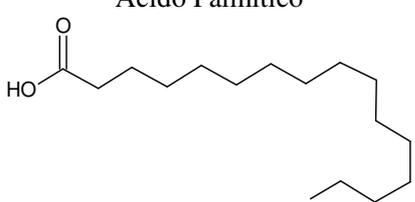


Figura 24: ESI(-)-HRMS referente à amostra de óleo de girassol.

Tabela 15: Fórmula molecular, massa experimental e teórica, erro e DBE dos compostos identificados por HRMS

Fórmula molecular	Íon	Massa do íon medida	Massa do íon tabelada	Erro (ppm)	DBE
$C_{22}H_{24}O_8$	$[M+H]^+$	417,1581	417,1549	7,67	11
$C_{18}H_{34}O_2$	$[M-H]^-$	281,2500	281,2481	6,76	2
$C_8H_{10}O_3$	$[M-H]^-$	153,0539	153,0552	-8,49	4
$C_{18}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	279,2353	279,2324	10,39	3
$C_{16}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	255,2355	255,2324	12,15	1

Tabela 16: Fórmulas molecular e estrutural dos compostos identificados por HRMS

Fórmula molecular	Fórmula estrutural
$C_{22}H_{24}O_8$	<p>acetoxypinoresinol</p> 
$C_{18}H_{34}O_2$	<p>Ácido Oleico</p> 
$C_8H_{10}O_3$	<p>Hidroxitirosol</p> 
$C_{18}H_{32}O_2$	<p>Ácido linoleico</p> 
$C_{16}H_{32}O_2$	<p>Ácido Palmítico</p> 

4.3.3.2 Quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem

Para a construção dos modelos de quantificação utilizaram-se as 40 amostras adulteradas propositadamente (30 para o conjunto de calibração e 10 para o conjunto de validação). As amostras de calibração e validação foram escolhidas de modo que as amostras de validação ficassem distribuídas de forma homogênea em toda a faixa de concentração. As extrações das amostras foram feitas em triplicata e, para as análises, utilizou-se um injetor automático. O equipamento utilizado faz a leitura de ambos os modos, positivo e negativo, simultaneamente; então, o procedimento de extração foi feito uma única vez.

Após a separação das amostras em dois conjuntos, calibração e validação, iniciou-se a construção dos modelos. Os dados foram centrados na média e o número de VLs de cada modelo foi escolhido com base no menor valor de RMSECV. A validação cruzada e a detecção de *outliers* foram realizadas da mesma maneira descrita anteriormente para os dados de ESI-MS, no item 4.2.3.2.

Para o modelo construído com os dados de ESI(+)-HRMS somente um *outlier* foi identificado no conjunto de calibração (amostra adulterada com 0,5 % m/m). No modelo construído com dados ESI(-)-HRMS não foi identificado nenhum *outlier* no conjunto de calibração. O número de amostras de calibração e validação e o número de VLs para os modelos podem ser vistos na Tabela 17.

Tabela 17: Número de amostras de validação e calibração e número de variáveis latentes para os modelos de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV

Quantificação de óleo de GI em azeite OEV	Dados de ESI(+)-HRMS	Dados de ESI(-)-HRMS
Nº de amostras de calibração	29	30
Nº de amostras de validação	8	9
Nº de VLs	6	5

Para os modelos de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV com dados de ESI-HRMS também se determinou os íons mais importantes para a quantificação através dos coeficientes de regressão estimados (Figura 25 e 26).

No gráfico dos coeficientes de regressão do modelo construído com os dados de ESI(+)-HRMS (Figura 24) observa-se, além do íon de m/z 417,1549 (valor positivo), outras variáveis mais relevantes. Normalmente, as variáveis com valores positivos nos coeficientes de regressão estão relacionadas ao analito, mas a variável de m/z 417,1549 tem um valor muito pequeno e, portanto, pouco relevante na quantificação do óleo de GI em azeite de OEV. No gráfico dos coeficientes de regressão do modelo construído com dados de ESI(-)-HRMS (Figura 25) observa-se as variáveis de m/z 279,2353 e 255,2355 com valores positivos. Isso já era esperado, pois estes íons foram identificados no espectro de massas do óleo de GI. As variáveis de m/z 153,0539 e 281,2500 apresentam valores negativos, pois são relativas a íons identificados no espectro de massas do azeite de OEV.

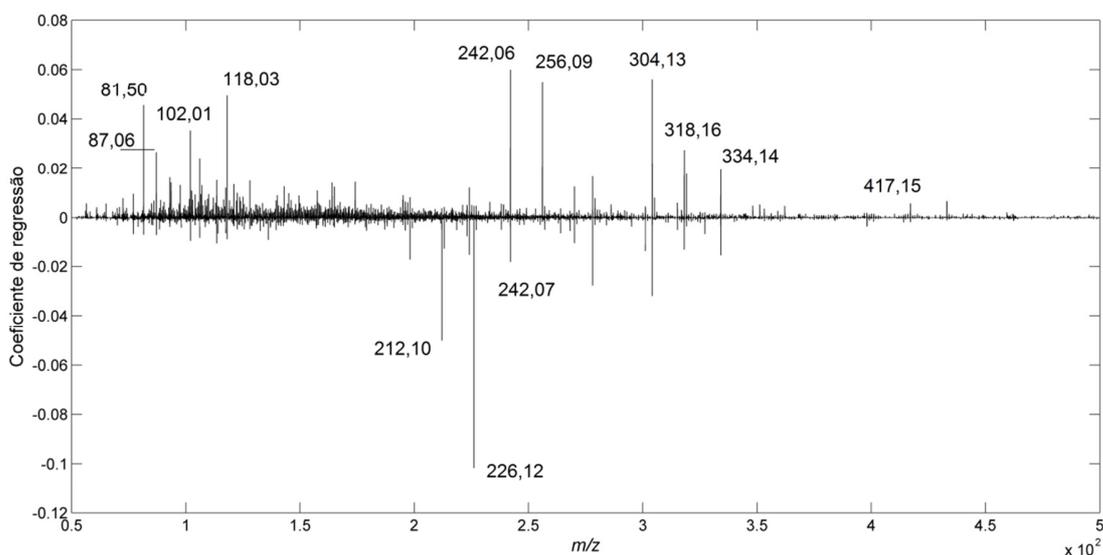


Figura 25: Coeficiente de regressão dos modelos de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV obtido do modelo construído com dados ESI(+)-HRMS.

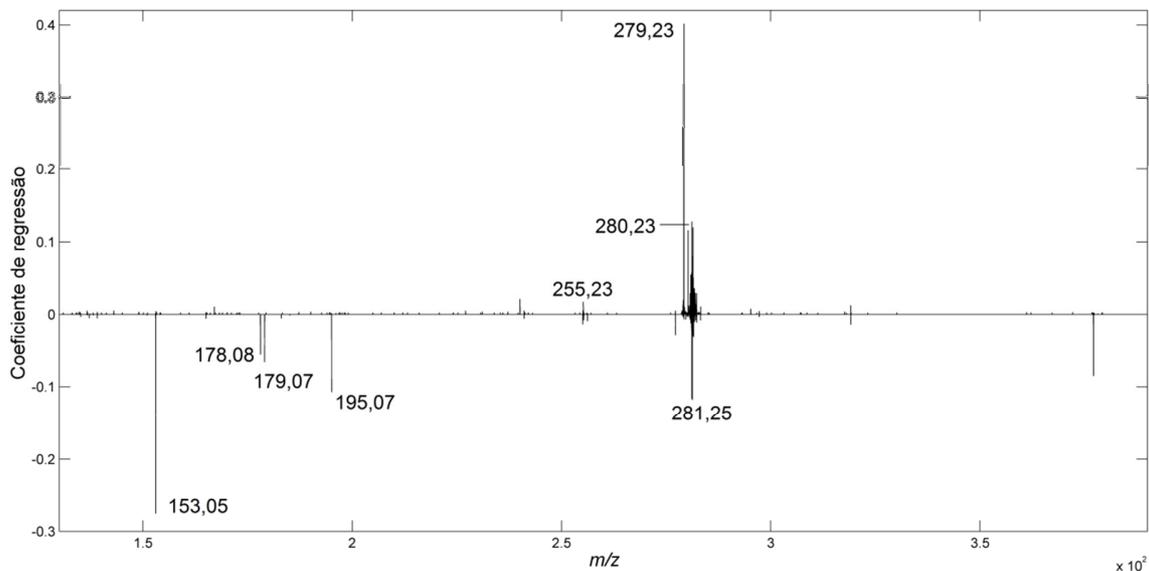


Figura 26: Coeficiente de regressão dos modelos de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV - obtido do modelo construído com dados ESI(-)-HRMS.

Modelo construído com os dados de ESI(+)-HRMS para quantificação de óleo de GI em azeite de OEV

O modelo construído com os dados de ESI(+)-HRMS explicou 96 % da variância dos dados em **Y** e 57 % em **X**. Os valores de RMSEC e RMSEP calculados foram 1,17 % m/m e 1,98 % m/m, respectivamente. O gráfico de ajuste de valores de referência *versus* valores preditos, juntamente com as barras de erro que representam o desvio padrão das triplicatas de cada amostra, é mostrado na Figura 27. O maior erro relativo de previsão para o conjunto de validação foi de 44% (Tabela 18).

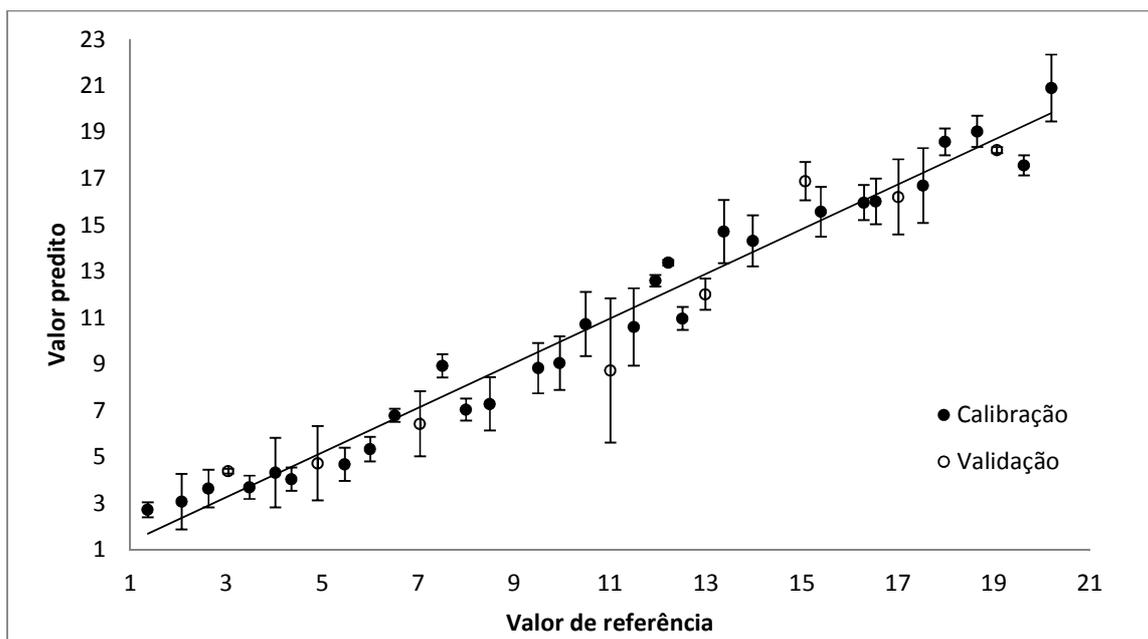


Figura 27: Ajuste dos valores preditos vs valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-HRMS.

Tabela 18: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(+)-HRMS

Valor de Referência (% m/m)	Valor Predito (% m/m)	Erro relativo (%)
3,04	4,38	44,1
4,90	4,72	-3,6
7,04	6,43	-8,7
11,01	8,72	-20,7
12,98	12,01	-7,5
15,07	16,88	12,0
17,01	16,20	-4,7
19,07	18,22	-4,4

Modelo construído com os dados ESI(-)-HRMS para quantificação de óleo de GI em azeite de OEV

O modelo construído com os dados de ESI(-)-HRMS explicou 95 % da variância dos dados em **Y** e 67 % em **X**. O RMSEC calculado foi 1,28 % m/m e o RMSEP foi 1,34 % m/m. O gráfico de ajuste de valores de referência *versus* valores preditos juntamente com as barras de erro é mostrado na Figura 28. O maior erro relativo de previsão para o conjunto de validação foi de -31,4% (Tabela 19). Mas, todos os demais erros foram inferiores a 10%.

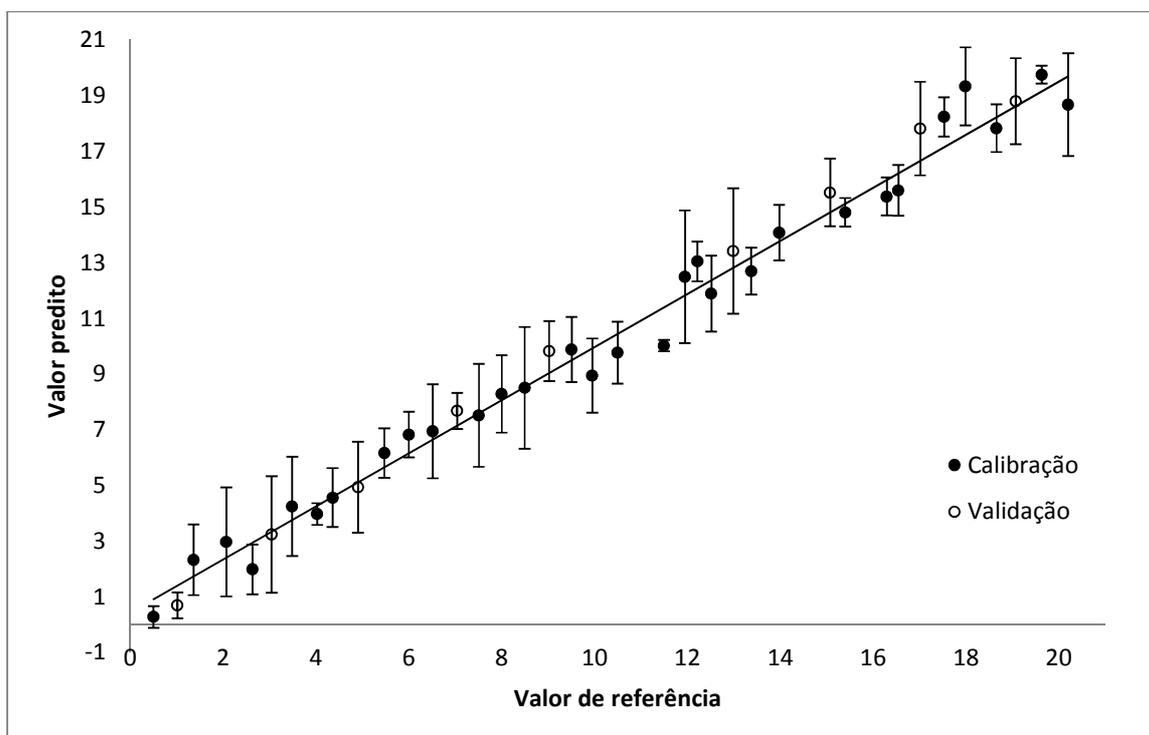


Figura 28: Ajuste dos valores preditos *vs* valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-HRMS.

Tabela 19: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de ESI(-)-HRMS

Valor de Referência (% m/m)	Valor Predito (% m/m)	Erro relativo (%)
1,01	0,70	-31,4
3,04	3,24	6,4
4,90	4,94	0,6
7,04	7,70	9,1
9,02	9,82	8,9
12,98	13,42	3,3
15,07	15,52	3,0
17,01	17,82	4,7
19,07	18,80	-1,4

Validação dos modelos PLS construídos com dados de alta resolução para quantificação de óleo de GI em azeite de OEV.

Os dois métodos PLS desenvolvidos para quantificação de óleo de GI foram validados por meio de estimativas de figuras de mérito. Os resultados estão apresentados na Tabela 20.

A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação do ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos e por testes que comprovam a aleatoriedade dos resíduos do modelo. Os dois modelos apresentaram excelente ajuste e, de acordo com os testes de Ryan-Joiner, Brow-Forsythe e Durbin-Watson, os resíduos de ambos os modelos seguem uma distribuição normal, são homocedásticos e independentes a um nível de 95% de confiança, apenas o teste de independência dos resíduos (Durbin Watson), para o modelo construído com dados de ESI(+)-HRMS, foi realizado à 99 % de confiança (Tabela 20).

Fez-se também avaliação de erros sistemáticos, de acordo com a norma da ASTM [59]. Como pode ser visto na Tabela 20, não existe indício de erro sistemático em ambos os modelos a um nível de 95% de confiança.

A veracidade foi avaliada por meio dos valores de RMSEC, de 1,17 e 1,28 % m/m, e de RMSEP, de 1,98 e 1,34 % m/m, para os modos positivo e negativo, respectivamente (Tabela 20). Também foi avaliado o erro relativo das amostras de validação (Tabelas 18 e 19) e as médias dos valores absolutos dos erros relativos foram 13,24 % e 7,67 %, para os

modelos construídos a partir de dados ESI(+)-HRMS e ESI(-)-HRMS, respectivamente (Tabela 20).

A precisão foi avaliada no nível de repetitividade através do cálculo do CV (%) das triplicatas de três níveis de concentração, 4 % m/m, 10 % m/m e 16 % m/m. Os valores de CV (%) para o menor nível de concentração foram 12,45 e 9,88 %, para o nível intermediário, 12,27 e 11,33 %, e para o maior nível, 4,71 e 5,84 %, para os modos positivo e negativo, respectivamente (Tabela 20). Os modelos construídos com dados de ESI(+)-HRMS e ESI(-)-HRMS não mostraram a precisão recomendada, assim como ocorreu com os modelos anteriores que utilizaram dados de baixa resolução.

Os valores de seletividade para os dois modelos indicam que 16 % e 25 % do sinal analítico foram usados para a quantificação do óleo de GI em azeite de OEV nos modelos construídos com dados ESI(+)-HRMS e ESI(-)-HRMS, respectivamente.

A sensibilidade e a sensibilidade analítica (γ) foram estimadas e, para o cálculo desta última, foi necessária a estimativa do ruído instrumental (ϵ) para os modos positivo (0,178) e negativo (0,195). O inverso da sensibilidade analítica (γ^{-1}) fornece o mínimo de concentração discernível pelo método, considerando como única fonte de erro o ruído instrumental. Com o valor de γ^{-1} é possível calcular o LD e LQ (Tabela 20), os valores de LD estimados foram 0,30 e 0,46 % m/m, e de LQ foram 0,90 e 1,39 % m/m, para os modos positivo e negativo, respectivamente.

O RPD também foi calculado e os valores variaram entre 2,55 e 4,79, indicando o bom desempenho dos modelos construídos.

Finalizada a validação destes dois métodos, foi possível comparar os modelos de quantificação do óleo de GI construído com dados de MS de alta e baixa resolução. Para os dados obtidos no modo positivo, tanto alta como baixa resolução originaram bons modelos. No entanto, o modelo com os dados de baixa resolução foi um pouco superior devido aos menores valores de RMSEC, RMSEP e erros relativos. Além disso, este modelo produziu valores de RPD superiores, o que indica sua maior capacidade preditiva. Para os modelos com dados no modo negativo, ambos os modelos (alta e baixa resolução) atendem a finalidade para à qual foram desenvolvidos. No entanto, o modelo com dados de alta resolução foi um pouco superior, pois produziu melhor veracidade e maiores valores de

RPD. Com isso, o uso de um equipamento de alta resolução (de maior custo) não é justificado, já que a qualidade dos modelos PLS obtidos não foi superior. No entanto, o uso de um equipamento de alta resolução permite a identificação de forma inequívoca dos compostos (variáveis) mais importantes para o modelo de calibração.

Tabela 20: Figuras de mérito para validação dos modelos de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construídos a partir de dados de ESI-RHMS

Parâmetro	Testes	Modo positivo			Modo negativo		
		Valores calculados		Limites	Valores calculados		Limites
Linearidade	Normalidade	R = 0,9863		R > 0,9702	R= 0,9820		R> 0,9709
	Homocedasticidade	p = 0,8064		p > 0,05	p = 0,0579		p > 0,05
	Independência	1,52		1,33-2,67 ^a	2,14		1,54 – 2,46
	r	0,9865			0,9917		
Erro Sistemático	Viés (<i>Bias</i>)	t = 0,68		t < 2,31	t = 2,17		t < 2,26
Precisão	CV% (4%, 10% e 16%)	12,45	12,27	4,71	9,88	11,33	5,84
Veracidade	RMSEC %m/m	1,17			1,28		
	RMSEP %m/m	1,98			1,34		
	Erro relativo médio %	13,24			7,67		
Seletividade	...	0,16			0,25		
Sensibilidade (%m/m) ⁻¹	...	3,74			1,40		
Sensibilidade analítica γ (%m/m) ⁻¹	...	11,11			7,17		
1/ γ	...	0,09			0,14		
LD %m/m	...	0,30			0,46		
LQ %m/m	...	0,90			1,39		
RPD	RPD calibração	2,93			2,55		
	RPD validação	2,94			4,79		

^aTestes realizados a 99% de confiança.

4.4 Desenvolvimento de modelos PLS com dados de EASI-MS

4.4.1 Objetivo

- Construir modelos PLS para a quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem com dados de EASI(+)-MS e EASI(-)-MS.

4.4.2 Parte experimental

4.4.2.1 Amostras

O azeite de OEV foi contaminado propositalmente com o óleo de GI. Preparou-se 40 amostras, com a concentração do adulterante variando de 0,5 até 20,0 % m/m, com incrementos de 0,5 % m/m, as amostras foram pesadas em balança analítica (Adventurer Pro, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA).

4.4.2.2 Obtenção dos Espectros de Massas

Ensaios foram realizados no laboratório Thomson (IQ – UNICAMP) utilizando a fonte de ionização EASI (*Easy Ambient Sonic-spray Ionization*) em um espectrômetro de massas mono-quadrupolo LCMS-2010 EV (Shimadzu, Japão) operando nos modos positivo e negativo de análise. A fonte EASI foi operada com metanol em fluxo de 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ e gás de nebulização (N_2) numa vazão de 3 L/min. O ângulo de superfície-entrada foi de 30°. Para as análises, as amostras (1 μL) foram depositados na superfície de um papel (Craft marrom - envelope de papel). Todas as amostras foram analisados em triplicata.

4.4.2.3 Tratamento dos dados

O processamento quimiométrico foi realizado utilizando os *softwares* PLS Toolbox v. 6.5 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, EUA) e Matlab v. 7.9 (The Mathworks Inc., Natick, MA, EUA).

4.4.3 Resultados

4.4.3.1 Análise dos espectros de massas nos modos positivo e negativo

No EASI(+)-MS referente à amostra de azeite de OEV (Figura 29) observa-se os íons de m/z 882, 908 e 910 referentes a TAGs presentes no azeite. Na literatura foi encontrado um estudo de determinação de triacilglicerois por EASI [87] que relata a composição dos TAGs, os quais formam adutos com os cátions sódio e potássio. Então, os íons m/z de 882, 908 e 910 são adutos de sódio, $[TAG+Na]^+$, dos triacilglicerois POO, OOO e SOO (P - ácido palmítico, O - ácido oleico e S - ácido esteárico). O mesmo aconteceu com a análise do óleo de GI (Figura 30), para o qual os íons observados são m/z 902, 904 e 906, que se referem aos adutos $[TAG+Na]^+$ dos triacilglicerois LLL, LLO e SLL (L - ácido linoleico).

Nos EASI(-)-MS mostrados nas Figuras 31 e 32, referentes às amostras de azeite de OEV e óleo de GI, respectivamente, é possível observar os íons referentes a alguns ácidos graxos desprotonados, i.e ácido palmítico (m/z 255), ácido linoleico (m/z 279), ácido oleico (m/z 281) e ácido esteárico (m/z 283). Todos estes compostos foram previamente determinados por EASI em um estudo de controle de qualidade de azeite, no qual o foco era a certificação de origem do azeite [37].

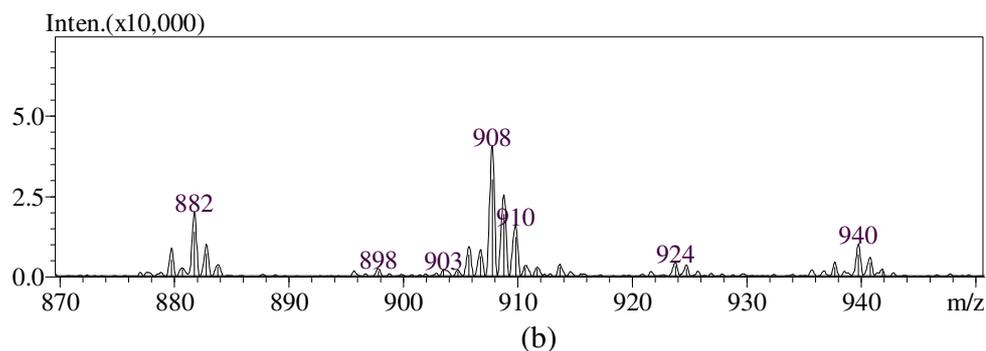
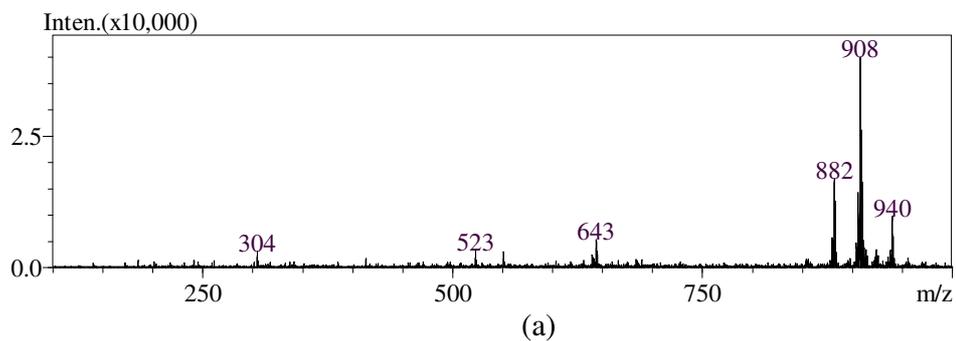


Figura 29: EASI(+)-MS referente à amostra de azeite de OEV: (a) Toda a faixa estudada e (b) ampliação na região dos TAGs.

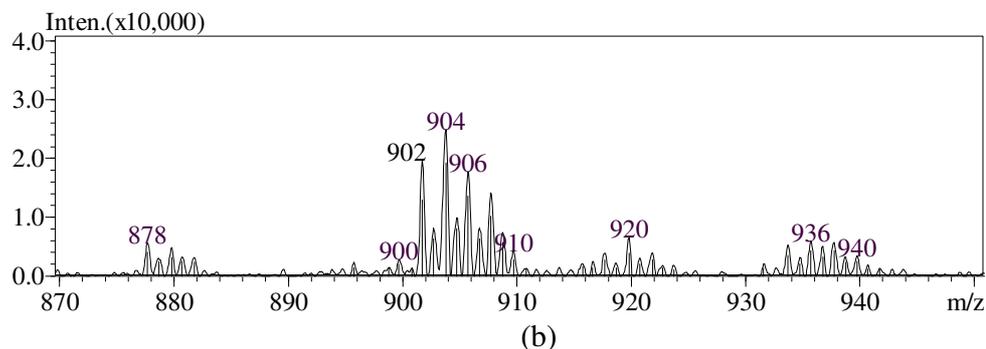
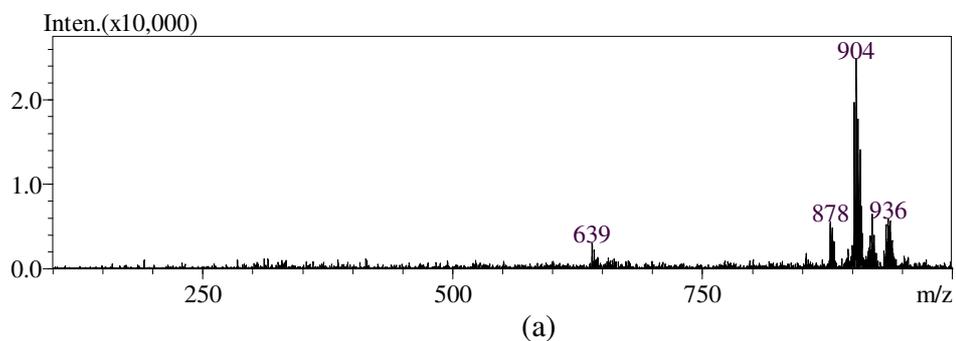


Figura 30: EASI(+)-MS referente à amostra de óleo de GI: (a) Toda a faixa estudada e (b) ampliação na região dos TAGs.

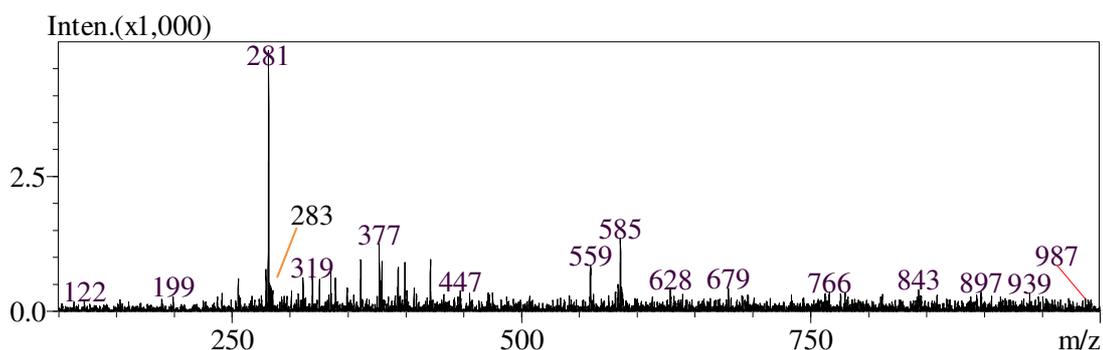


Figura 31: EASI(-)-MS referente à amostra de azeite de OEV.

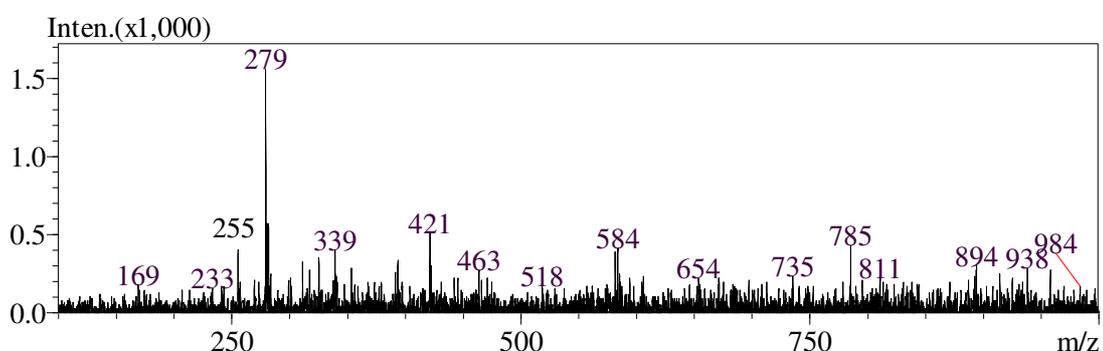


Figura 32: EASI(-)-MS referente à amostra de óleo de GI.

4.3.3.2 Quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem

Para a construção do modelo de quantificação utilizaram-se as 40 amostras adulteradas propositadamente (30 para o conjunto de calibração e 10 para o conjunto de validação). As amostras de calibração e validação foram escolhidas de modo que as amostras de validação ficassem distribuídas de forma homogênea em toda a faixa de concentração. As análises foram feitas em triplicata para ambos os modos, positivo e negativo. Somente o modelo construído com os dados do modo positivo é apresentado, pois os dados com o modo negativo não foram coerentes.

Após a separação das amostras em dois conjuntos, calibração e validação, iniciou-se a construção do modelo. Os dados foram centrados na média e o número de VLs foi escolhido com base no menor valor de RMSECV. A validação cruzada foi feita por blocos

contínuos (com nove divisões). O modelo foi otimizado pela detecção de *outliers* de maneira semelhante ao que foi feito com dados de ESI-MS, como descrito no item 4.2.3.2. O melhor modelo foi construído com quatro VLs, 27 amostras de calibração e oito amostras de validação. Das três amostras identificadas como *outliers* no conjunto de calibração, duas são as de concentrações mais baixas, 0,5 % m/m e 1,0 % m/m. O modelo explicou 93 % da variância dos dados em **Y** e 43 % em **X**. O RMSEC calculado para o modelo foi 1,47 % m/m, enquanto o RMSEP foi 1,78 % m/m. O gráfico de ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos juntamente com as barras de erro que representam o desvio padrão das triplicatas é mostrado na Figura 33. O maior erro relativo de previsão para o conjunto de validação foi -29,8% (Tabela 21).

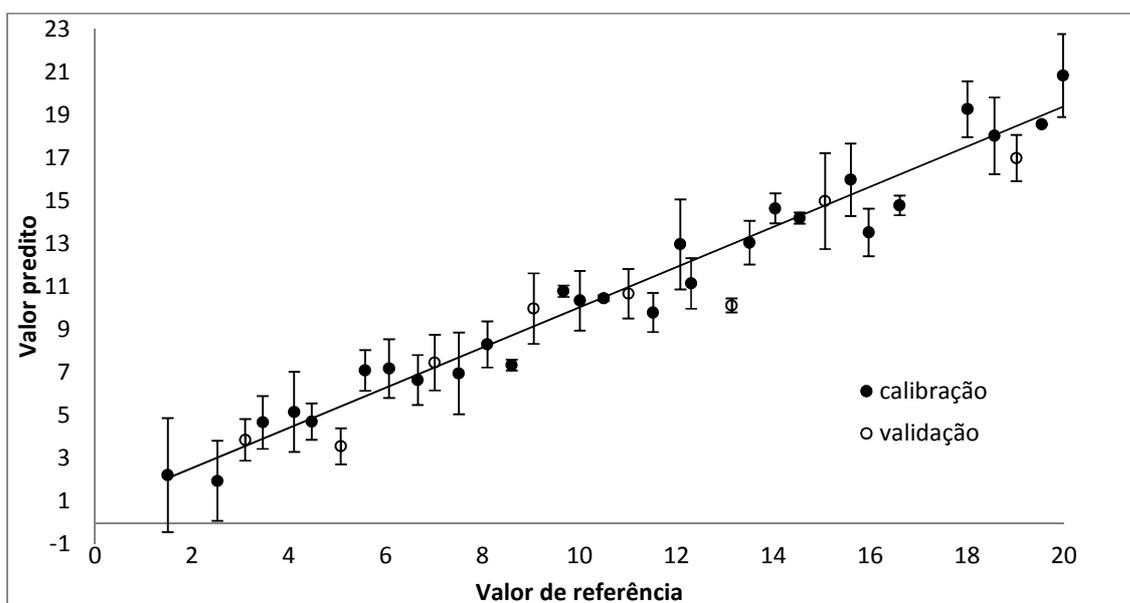


Figura 33: Ajuste dos valores preditos *vs* valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de óleo GI em OEV construído a partir de dados de EASI(+)-MS.

Tabela 21: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de EASI(+)-MS

Valor de Referência (% m/m)	Valor Predito (% m/m)	Erro relativo (%)
3,10	3,86	24,6
5,07	3,57	-29,8
7,01	7,46	6,5
9,05	9,98	10,2
11,01	10,67	-3,1
13,14	10,12	-22,9
15,07	14,99	-0,5
19,02	16,98	-10,7

Para o modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV com dados de EASI(+)-MS também fez-se a análise dos íons mais importantes através da observação dos coeficientes de regressão (Figura 34).

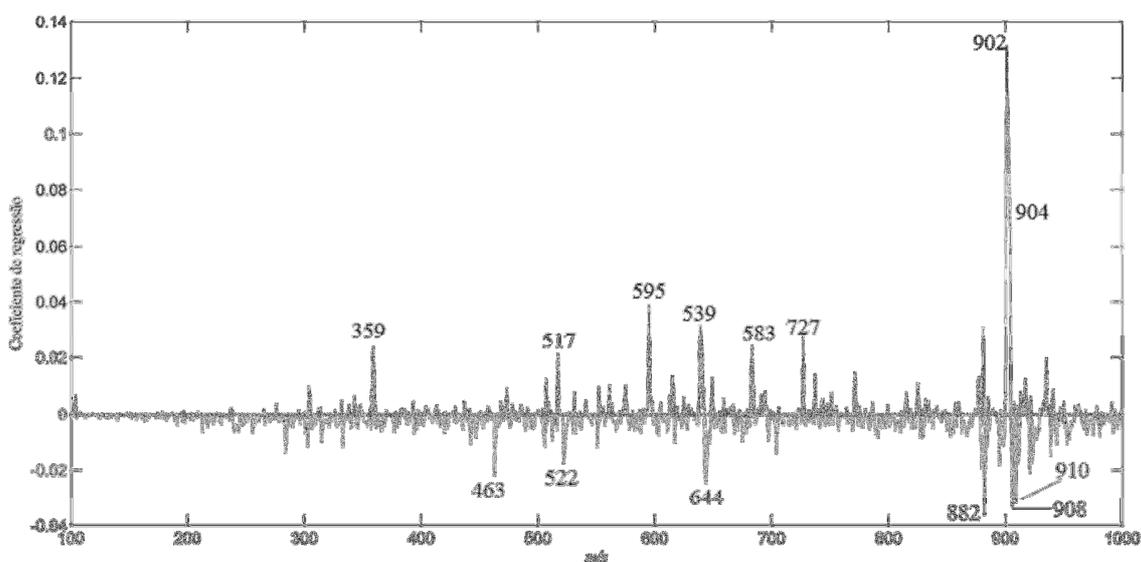


Figura 34: Coeficiente de regressão do modelo de quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem obtido dos dados de EASI(+)-MS.

No gráfico dos coeficientes de regressão observa-se tanto variáveis não identificadas quanto outras já citadas durante a discussão dos espectros de massas. Os coeficientes com valores positivos estão relacionados aos íons de m/z 902 e 904, referentes

aos [TAG +Na]⁺ observados no EASI(+)-MS do óleo de GI. Os coeficientes com valores negativos referem-se aos íons de *m/z* 882, 908 e 910, que foram identificadas como TAGs encontrados no azeite.

Validação do modelo PLS construído com dados de EASI(+)-MS para quantificação de óleo de GI em azeite de OEV.

O modelo PLS construído a partir de dados de EASI-MS também foi validado através da estimativa de figuras de mérito. Os resultados estão apresentados na Tabela 22.

A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação do ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos e por testes que comprovam a aleatoriedade dos resíduos do modelo. O modelo apresentou excelente ajuste e, de acordo com os testes de Ryan-Joiner, Brow-Forsythe e Durbin-Watson, os seus resíduos seguem uma distribuição normal, são homocedásticos e independentes.

Fez-se também avaliação de erros sistemáticos, de acordo com a norma da ASTM [59]; o valor de *t* calculado foi 1,2 e o *t* crítico a 95% de confiança é 2,30, e então, não existe indício de erro sistemático no modelo (Tabela 22).

A veracidade foi avaliada por meio do RMSEC igual a 1,47 % m/m, RMSEP igual a 1,78 % m/m (Tabela 22) e erros relativos das amostras de validação (Tabelas 21), e a média dos valores absolutos dos erros foi igual a 13,54 % (Tabela 22).

A precisão foi avaliada no nível de repetitividade através do cálculo do CV (%) das triplicatas de três níveis de concentração, 4 % m/m, 10 % m/m e 16 % m/m, e os valores estimados foram 17,9 %, 13,4 % e 8,2 %, respectivamente (Tabela 22).

A seletividade do modelo foi 0,18, o que indica que 18 % do sinal analítico foi usado para a quantificação do óleo de GI em azeite de OEV.

A sensibilidade e a sensibilidade analítica (γ) foram estimadas e para o cálculo da γ foi necessário a estimativa do ruído instrumental ($\varepsilon=1,026$). O valor γ^{-1} fornece o mínimo de concentração discernível pelo método (0,2 % m/m), considerando como única fonte de erro o ruído instrumental. Com o valor de γ^{-1} , é possível calcular LD = 0,7 % m/m e LQ = 2,1 % m/m (Tabela 22).

O RPD também foi calculado e para os conjuntos de calibração (2,55) e validação (2,99). Estes valores indicam um bom desempenho do modelo.

Finalmente, pode-se comparar este método de quantificação com os outros dois que foram desenvolvidos para quantificar óleo de GI em azeite de OEV. Os três modelos construídos com dados no modo positivo foram validados e demonstraram uma boa eficiência. No entanto, o modelo construído com dados do EASI(+)-MS apresentou os maiores limites de detecção e quantificação. Isso provavelmente ocorreu devido ao maior nível de ruído da técnica EASI em comparação com a técnica ESI. Quando se avalia os parâmetros de veracidade, os valores dos três modelos são bem próximos. Contudo, quando se compara os valores de RPD, conclui-se que o melhor modelo foi aquele construído com os dados de ESI(+)-MS de baixa resolução. Apesar disso, a técnica EASI-MS apresenta vantagens importantes, tais como: rapidez (o tempo pode ser reduzido pela metade, quando comparada à ESI-MS) e a não utilização de nenhuma etapa de extração da amostra. Então, dependendo da quantidade de amostras e do tempo disponível para a análise, a técnica EASI-MS pode ser uma alternativa atraente a ser utilizada no controle de qualidade do azeite de OEV.

Tabela 22: Figuras de mérito para validação do modelo de quantificação de óleo de GI em azeite de OEV construído a partir de dados de EASI(+)-MS

Parâmetro	Testes	Valores calculados		Limites
Linearidade	Normalidade	R = 0,9744		R > 0,9683
	Homocedasticidade	p = 0,8500		p > 0,05
	Independência	2,39		1,52-2,48
	r	0,9815		
Erro Sistemático	Viés (<i>Bias</i>)	t = 1,2	t < 2,30	
Precisão	CV%	17,9	13,4	8,2
Veracidade	RMSEC %m/m	1,47		
	RMSEP %m/m	1,78		
	Erro relativo médio %	13,54		
Seletividade	...	0,18		
Sensibilidade (% m/m) ⁻¹	...	4,80		
Sensibilidade analítica γ (% m/m) ⁻¹	...	4,68		
1/ γ	...	0,2		
LD % m/m	...	0,7		
LQ % m/m	...	2,1		
RPD	RPD calibração	2,55		
	RPD validação	2,99		

4.5 Conclusões parciais

Os dados provenientes dos ESI(+)-MS de amostras representativas de azeites de oliva (extra virgem e puro) e azeite extra virgem adulteradas com diversos tipos de óleos (SO, MI, GI, CA e azeite de OP) foram utilizados para a construção de um modelo de classificação, PLS2-DA, e as amostras foram classificadas inequivocamente.

Os dados provenientes dos ESI(+)-MS e ESI(-)-MS foram utilizados para a construção de modelos de calibração multivariada, os quais foram validados pelo cálculo de

figuras de mérito. Sete modelos foram construídos, sendo possível quantificar teores de óleo de SO, óleo de MI, óleo de GI e óleo de CA em azeite de OEV, vale ressaltar que as amostras com adulterações de 0,5% foram consideradas *outlier* em alguns modelos. Além disso, o método é rápido, não exige maiores tratamentos das amostras e gera poucas quantidades de resíduos.

Os dados provenientes dos ESI(+)-HRMS e ESI(-)-HRMS foram utilizados para a construção de dois modelos de calibração multivariada, para a quantificação de óleo de GI em azeite de OEV. Os dois modelos apresentaram desempenho semelhante àqueles obtidos a partir de dados de espectrometria de massas de baixa resolução.

Finalmente, os dados obtidos por EASI(+)-MS foram utilizados para a construção de um modelo de calibração multivariada, visando a quantificação de óleo de GI em azeite de OEV. O modelo, validado através do cálculo de figuras de mérito, apresentou desempenho semelhante àquele gerado por ESI(+)-MS. Estes resultados indicam, portanto, que a técnica EASI pode ser convenientemente aplicada no controle de qualidade e quantificação de adulteração em azeite de OEV.

Capitulo 5 - Quantificação de biodiesel em diesel

5.1 Introdução

O biodiesel e outras fontes de energia renováveis são de grande interesse para todos, pois o preço do barril do petróleo, fonte não renovável de energia, está sempre se elevando e existe também uma grande preocupação ambiental com a queima de combustíveis fósseis.

Hoje, o álcool combustível representa uma política bem sucedida quando se leva em consideração que nossa gasolina comercial tem 25% de álcool, além dos carros flex que podem utilizar ambos os combustíveis separadamente ou em qualquer proporção e o biodiesel está percorrendo o mesmo caminho. O biodiesel é obtido de fontes renováveis, como óleos vegetais e gordura animal e é uma alternativa muito atraente para substituição, em parte, do óleo diesel, obtido do petróleo [36].

Atualmente, o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo [8] e, de acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), as matérias primas mais utilizadas na obtenção do biodiesel têm sido o óleo de soja (80,6 %), o sebo bovino (13,7%) e o algodão (3,6%) [96]. O Brasil é grande produtor e possui grande potencial para aumentar ainda mais a produção de biodiesel devido à sua grande extensão territorial. O aumento da produção de biodiesel é um dos motivos que contribuirá para o crescente desenvolvimento econômico do país.

A partir de 2008, a adição de biodiesel puro (B100) ao diesel passou a ser obrigatória. Entre janeiro e junho de 2008, a mistura de B100 ao óleo diesel foi estabelecida em 2 % v/v e, entre julho de 2008 e julho de 2009, passou a 3 % v/v. A partir de 01/07/2009, o biodiesel passou a ser adicionado ao óleo diesel na proporção de 4 % em volume [97]. Estava previsto um aumento para 5% v/v a partir de 2013, mas o governo brasileiro antecipou este aumento para 2010 [36]. A concentração de biodiesel se manteve em 5 % v/v na mistura diesel/biodiesel até junho de 2014 e, por meio de uma medida provisória, o percentual da mistura aumentou para 6 % v/v em 01/07/2014, devendo passar a ser 7 % v/v a partir de 01/11/2014 [98-100]. O teor de biodiesel no diesel deve aumentar ainda mais e testes com o B20, ou seja 20 % v/v de biodiesel em diesel, já estão sendo realizados pela Petrobrás [101].

A partir de janeiro de 2009, a ANP estabeleceu que o teor de biodiesel nas amostras analisadas pelo Programa de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis fosse determinado seguindo a Norma Européia EN 14078 [102]. Esta norma descreve análises por infravermelho médio de amostras de derivados líquidos de petróleo diluídas em cicloexano. A quantificação é feita utilizando uma curva analítica univariada, que relaciona a concentração de biodiesel à intensidade da banda características de ésteres (1745 ± 5) cm^{-1} . Este procedimento é pouco robusto e está sujeito a erros, pois no infravermelho a absorção ocorre em faixas e não em um valor específico e outros grupos funcionais podem interferir, absorvendo neste mesmo número de onda. Deste modo, escolher somente um número de onda para construir uma curva de calibração pode levar a erros.

Em 2008, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) publicou a norma NBR 15568 para determinação do teor de biodiesel utilizando a espectroscopia na região do MIR e modelos de calibração multivariada. Neste método, a calibração multivariada é aplicada a medidas de absorbância no infravermelho médio. As amostras podem ser lidas diretamente, sem diluição, na faixa de 0,5 a 30% v/v. Entretanto, a presença de contaminantes que contêm grupos carbonila pode causar falsos resultados [96].

Apesar das ações de monitoramento e de fiscalização, o óleo diesel B5 (5 % v/v) com parâmetros de qualidade fora da especificação tem sido comercializado no Brasil. De acordo com o boletim de monitoramento da qualidade dos combustíveis da ANP, o teor de biodiesel ainda é um dos maiores motivos de detecção de não conformidades neste combustível [103]. Existe uma melhora deste cenário, pois em 2010 o teor de biodiesel representava mais de 40% das não conformidades [104] e atualmente representa pouco mais que 23 % (Figura 35). É necessário um maior controle de qualidade deste combustível e uma atenção maior na determinação do teor de biodiesel.

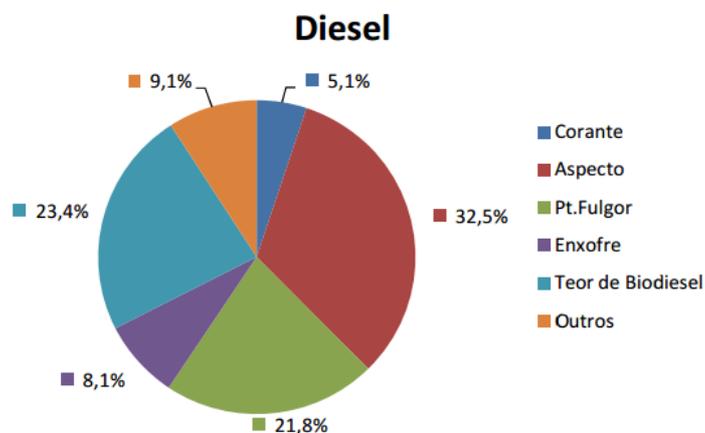


Figura 35: Distribuição da não conformidade por item especificado para o diesel (Fonte: ANP, dados de Maio de 2014).

Além dos métodos padrões citados acima, foram propostos métodos alternativos para a quantificação de biodiesel em diesel. Na literatura são descritas aplicações de calibração multivariada utilizando dados de infravermelho [105-107], ressonância magnética nuclear [108], cromatografia gasosa bidimensional acoplada ao massas [109], e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS) [8,25]. No entanto, nenhum dos trabalhos mencionados realizou uma validação analítica multivariada, que é um tópico de grande importância para aplicações quantitativas, mas cujos conceitos começaram a ser consolidados apenas recentemente [44].

5.2 Objetivo

- Quantificar o teor de biodiesel em diesel através de modelos de calibração multivariada utilizando o método PLS a partir de dados de ESI-MS e validar o método desenvolvido.

5.3 Parte experimental

5.3.1 Amostras

As amostras de diesel-S50 (combustíveis com teor de enxofre máximo de 50 mg/kg) foram cedidas pelo laboratório de ensaios de combustíveis da Universidade Federal de Minas Gerais (LEC/DQ-UFMG), as quais são procedentes da REGAP (Refinaria Gabriel Passos), localizada em Betim/MG, Brasil. As amostras de biodiesel metílico de soja foram produzidas em Rondonópolis-MT no dia 07/08/2012, nº do lote 763707082012.

As misturas foram preparadas à temperatura ambiente utilizando uma balança analítica (Adventurer Pro, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA). Em seguida, as concentrações % m/m foram convertidas a % v/v, a fim de expressar os resultados para teor de biodiesel na mesma unidade de medida utilizada nas normas EN14078 e ABNT15568. A concentração de biodiesel em diesel variou de 1 a 25% v/v.

5.3.2 Preparo de amostras

Reagentes

Metanol (Grau HPLC (99,9%) – Merck).

Procedimento

Realizou-se uma extração líquido-líquido prévia, pois não é possível injetar a amostra diretamente no espectrômetro de massas. Em um frasco Eppendorf adicionou-se 100 µL de óleo e 1,0 mL de metanol. Essa mistura foi agitada em vortex (Phoenix AP-56) por 30 segundos e mantida em repouso até a separação completa das fases, então a fase metanólica foi injetada no equipamento. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

5.3.3 Obtenção dos espectros de massas

Os espectros de massas, modo positivo, foram adquiridos no espectrômetro de massas com ionização *electrospray* e analisador *íon trap* (LCQ-Fleet, Thermo-Scientific). Para a obtenção dos espectros, a fase metanólica foi injetada continuamente no espectrômetro de massas. A amostra foi bombeada por uma seringa (Hamilton 500 μL) com fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tensão aplicada para a formação do *electrospray* foi 4,5 kV e a temperatura de dessolvatação foi 275 $^{\circ}\text{C}$.

5.3.4 Tratamento dos dados

Para a realização das análises multivariadas, foi construída a matriz de dados **X**. Esta matriz é um agrupamento de vetores que representam as amostras, ou seja, cada linha traz valores medidos para cada variável de uma amostra. A variável é a razão massa/carga (m/z) de cada íon e cada valor de intensidade relativa num dado m/z forma um elemento da matriz. O processamento quimiométrico foi realizado utilizando os *softwares* PLS Toolbox v. 6.5 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, EUA) e Matlab v. 7.9 (The Mathworks Inc., Natick, MA, EUA).

5.4 Resultados

No espectro de massas do diesel puro (Figura 36), é possível observar séries homólogas. As séries homólogas são sequências de moléculas orgânicas pertencentes a uma função química, cujas cadeias carbônicas diferem entre si por um valor constante de massa molar. No espectro de massas do biodiesel puro (Figura 37) os íons não foram identificados.

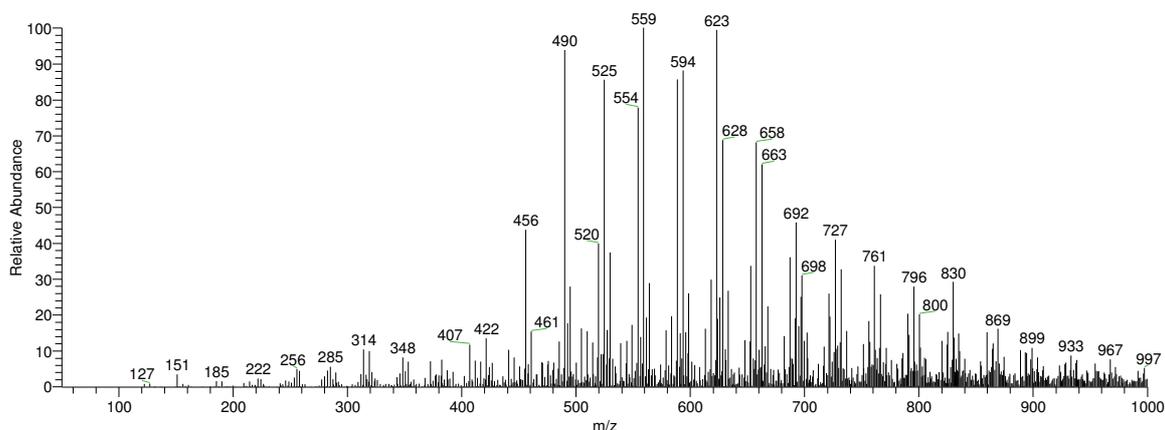


Figura 36: ESI(+)-MS referente à amostra de diesel.

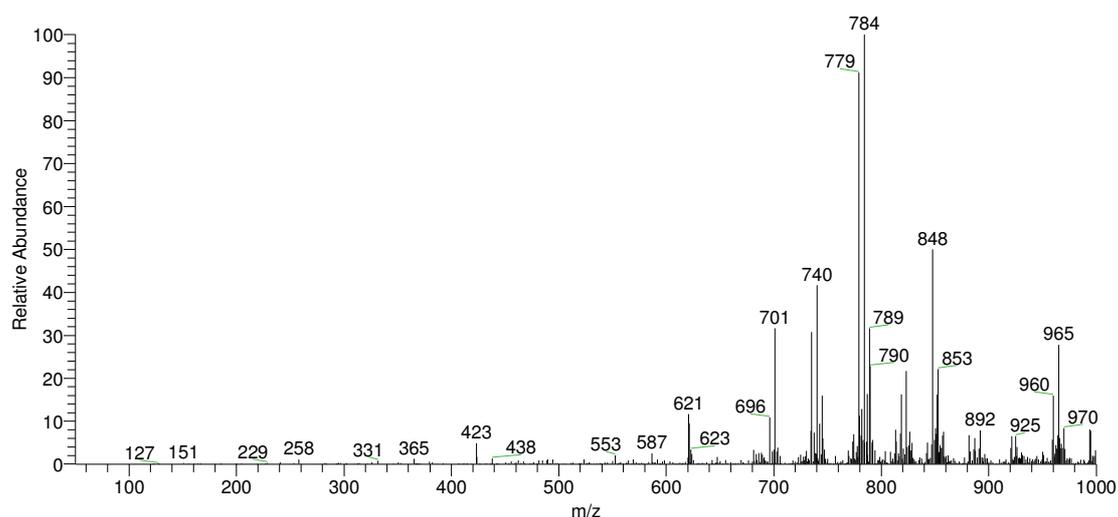


Figura 37: ESI(+)-MS referente à amostra de biodiesel.

Amostras utilizadas para a construção dos modelos

Para a construção do modelo de calibração utilizou-se as 35 amostras de misturas com concentração de 1 a 25 % v/v. O limite superior foi 25 % v/v para que o modelo ficasse acima do B20, pois esta mistura está em fase de testes pela ANP [100]. As adulterações foram programadas para que houvesse mais amostras com concentrações na faixa de 4,5 – 5,5 % v/v, pois o foco eram as amostras B5, com uma variação de 0,5 % nas

concentrações, o que é permitido pela legislação [110]. Com isso, o planejamento englobou quatro amostras abaixo do limite aceitável (1 a 4 % v/v, com incrementos de 1 % v/v), 16 amostras dentro do limite (quatro amostras de 4,5 % v/v, oito amostras de 5 % v/v e quatro amostras de 5,5 % v/v), 15 amostras acima do limite (10 amostras com concentrações de 6 a 15 % v/v, com incrementos de 1 % v/v e cinco amostras com concentrações de 17 a 25 % v/v, com incrementos de 2 % v/v). Das 35 amostras preparadas, 11 (duas abaixo de 4,5 % v/v, cinco dentro do limite 4,5-5,5 % v/v e quatro acima de 5,5 % v/v) foram separadas para o conjunto de validação. Todas as extrações foram feitas em triplicata.

5.4.1 Quantificação de biodiesel em diesel

Para a construção do melhor modelo, os dados foram centrados na média. Durante a otimização do modelo foi retirado um *outlier* do conjunto de calibração [48,49] e outro do conjunto de validação [50]. Quatro VLs foram selecionadas através de validação cruzada por blocos contínuos (com nove divisões) e o melhor modelo explicou 98 % da variância dos dados em **Y** e 80 % em **X**. O RMSEC calculado para o modelo foi 0,70 % v/v e o RMSEP foi 0,81 % v/v. Os gráficos de ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos dos conjuntos de calibração e validação, juntamente com as barras de erro, são apresentados na Figura 38.

Na tabela 23 estão apresentados os erros de previsão para o conjunto de validação, sendo que o maior erro foi 43%.

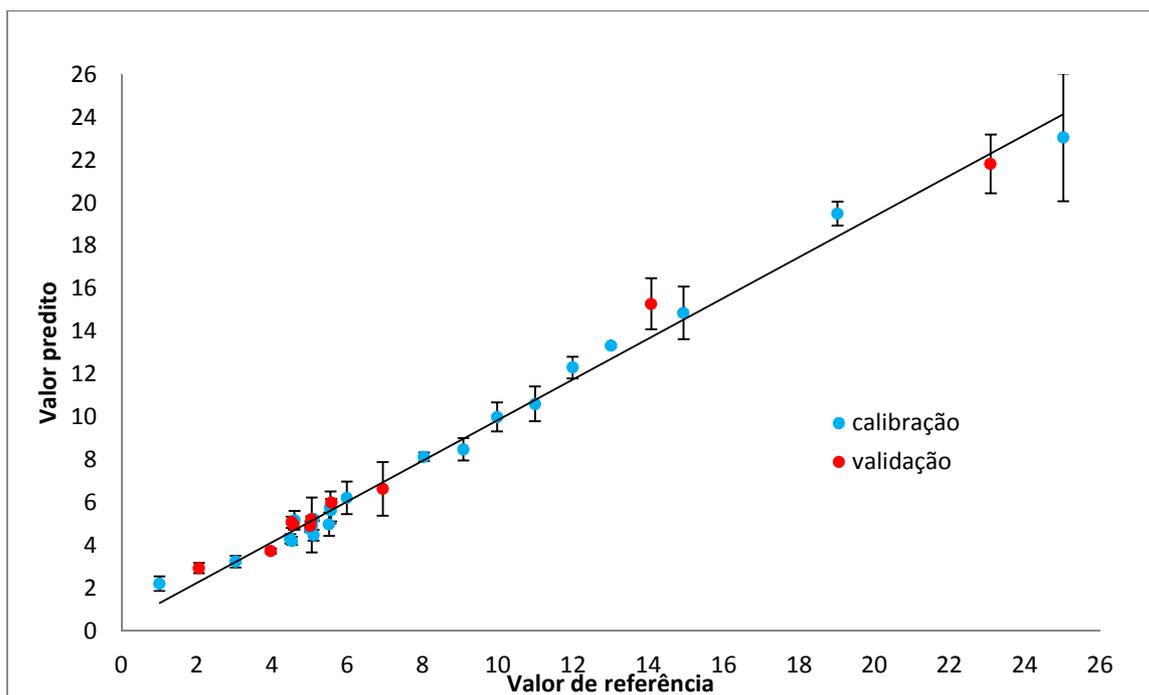


Figura 38: Ajuste dos valores preditos vs. valores de referência dos conjuntos de calibração e validação para o modelo de quantificação de biodiesel em diesel construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Tabela 23: Valores de referência, valores preditos e erros relativos para as amostras do conjunto de validação do modelo de quantificação de biodiesel em diesel construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Valor de Referência (% v/v)	Valor Predito (% v/v)	Erro relativo (%)
2,06	2,94	42,6
3,97	3,75	-5,7
4,52	5,09	12,5
4,58	4,96	8,4
5,02	4,92	-1,9
5,05	5,22	3,5
5,58	6,00	7,5
6,94	6,65	-4,3
14,07	15,28	8,6
23,08	21,83	-5,4

Validação do modelo construído para quantificação de biodiesel em diesel

O modelo construído para a quantificação de biodiesel em diesel foi validado por meio de estimativas de figuras de mérito.

A linearidade foi avaliada pelo ajuste dos valores de referência *versus* valores preditos e por testes estatísticos que comprovaram a aleatoriedade dos resíduos dos modelos. Como pode ser observado na Tabela 24, o modelo apresentou excelente ajuste, com r superior a 0,99. De acordo com o teste de Ryan-Joiner, os resíduos seguem uma distribuição normal a um nível de 99 % de confiança. De acordo com os testes Brown-Forsythe e Durbin-Watson, os resíduos do modelo são homocedásticos e independentes a um nível de 95% de confiança (Tabela 24).

A avaliação de erros sistemáticos foi feita de acordo com a norma da ASTM [57] e, como pode ser visto na Tabela 24, não existe indício de erros sistemáticos.

A precisão foi avaliada no nível de repetitividade através da estimativa do CV (%) das triplicatas de quatro níveis de concentração, 3 % v/v, 5 % v/v, 10 % v/v e 19 % v/v. Os valores de CV (%) das amostras foram 8,46 %, 6,33 %, 6,09 % e 2,87 %, respectivamente (Tabela 24).

A veracidade do modelo foi avaliada através dos valores de RMSEC (0,70 % v/v), RMSEP (0,81 % v/v) e dos erros relativos das amostras dos conjuntos de validação (Tabelas 23 e 24). Além disso, calculou-se a média dos valores absolutos dos erros (10,05 %), apresentada na Tabela 24.

Estimou-se também a seletividade do modelo (0,30), que indica que 30 % do sinal analítico foi usado para a quantificação de biodiesel em diesel (Tabela 24).

A sensibilidade e sensibilidade analítica (γ) foram estimadas. Para o cálculo da γ foi necessário a estimativa do ruído instrumental ($\epsilon = 1,908$). O inverso da sensibilidade analítica fornece a diferença mínima (0,3 % v/v), entre concentrações que pode ser discriminado pelo método, com este valor (γ^{-1}) é possível calcular o LD e LQ (Tabela 24). Os valores de LD e LQ calculados foram 1,0 e 3,1 % v/v), respectivamente.

Os valores de RPD foram calculados, para os conjuntos de calibração (3,06) e validação (7,83), conforme a Tabela 24.

Após a validação do modelo, podem-se fazer comparações com outros métodos, encontrados na literatura. Vale ressaltar que neste trabalho foi realizada uma validação completa, ausente nos trabalhos já publicados.

Em três dos artigos citados inicialmente, nos quais os autores utilizaram dados de infravermelho [105-107], os únicos parâmetros avaliados foram linearidade (R^2), veracidade (RMSEC, RMSECV, RMSEP e erro médio), sendo que os dois últimos avaliaram a presença de erro sistemático. No primeiro trabalho [105], os dados espectrais foram autoescalados, pré-processamento não recomendado para este tipo de dados, mas obteve-se um ótimo ajuste dos valores preditos *versus* valores de referência ($R^2=0,9996$) e ótimos valores de RMSECV e RMSEP, os quais variaram de 0,21 a 0,18 % v/v e 0,16 a 0,32 % v/v, respectivamente. No segundo trabalho [106], os autores usaram dados de infravermelho médio e próximo com alguns pré-processamentos para comparação dos resultados. Os melhores modelos foram obtidos com dados de infravermelho próximo, com RMSEC variando de 0,195 a 0,9521 % v/v e RMSEP variando de 0,269 a 2,111 % v/v. No terceiro trabalho [107], os autores prepararam as misturas diesel/biodiesel utilizando biodiesel de diferentes origens; as concentrações de biodiesel variaram de 0,5 a 100 % m/m. Dois modelos, ambos com 10 VLs, foram construídos utilizando espectros de infravermelho médio e próximo, e os resultados obtidos foram: R^2 (99,99 e 100), RMSEP (0,202 e 0,061 % m/m) e valor médio de CV % (0,80 e 0,24%).

Outro trabalho, no qual os autores utilizaram dados de ressonância magnética nuclear [108] para construir modelos PLS e PCR, também obteve bons resultados, mas os autores concluíram que os métodos foram adequados para quantificação de amostras com concentrações superiores a 2 % v/v.

E, finalmente, no trabalho em que modelos PLS foram construídos a partir de dados de ESI(+)-MS [8], os autores testaram vários pré-tratamentos nos dados espectrais; os modelos construídos apresentaram RMSEC (0,001 a 0,42 % v/v), RMSECV (0,67 a 1,04 % v/v) e RMSEP (0,51 a 1,11 % v/v), valores que demonstram sua boa qualidade, mas o uso dos diferentes pré-tratamentos não foi justificado.

É possível, então, a comparação dos valores de RMSEC (0,70 % v/v) e RMSEP (0,81 % v/v) do modelo construído no presente trabalho com os parâmetros dos modelos

encontrados na literatura, chegando-se a conclusão que seu desempenho é comparável com o dos outros modelos já publicados.

Tabela 24: Figuras de mérito para validação do modelo de quantificação de biodiesel em diesel construído a partir de dados de ESI(+)-MS.

Parâmetro	Testes	Valores calculados				Limites
Linearidade	Normalidade	R = 0,9609				R > 0,9528 ^a
	Homocedasticidade	p = 0,4821				p > 0,05
	Independência	1,10				1,51-2,49
	r	0,9952				
Erro Sistemático	Viés (<i>Bias</i>)	t = 0,80			t < 2,22	
Exatidão	RMSEC %m/m	0,70				
	RMSEP %m/m	0,81				
	Erro relativo médio %	10,05				
Precisão	CV%	8,46	6,33	6,09	2,87	
Seletividade	...	0,30				
Sensibilidade (% v/v) ⁻¹	...	6,24				
Sensibilidade analítica γ (% v/v) ⁻¹	...	3,27				
1/ γ	...	0,3				
LD %m/m	...	1,0				
LQ %m/m	...	3,1				
RPD	RPD calibração	3,06				
	RPD validação	7,83				

5.5 Conclusões parciais

Os dados provenientes dos ESI(+)-MS de amostras de diesel b (misturas diesel/biodiesel) foram utilizados para a construção de um modelo de calibração

multivariada, o qual foi validado pelo cálculo de figuras de mérito. O modelo construído foi considerado linear, exato, com boa capacidade preditiva e sem evidências de erros sistemáticos, foram calculados também os limites de detecção e quantificação, valores que atendem ao objetivo.

Além disso, o método é rápido, não exige maiores tratamentos das amostras e gera poucas quantidades de resíduos.

Capítulo 6 - Conclusão final

A espectrometria de massas mostrou ser uma técnica valiosa para o controle de qualidade de azeite de oliva extra virgem e diesel b, especialmente quando associada à ferramentas quimiométricas.

Dados de ESI-MS foram usados na construção de um modelo PLS2-DA. O modelo classificou corretamente amostras de azeite de oliva, de qualidades diferentes e adulteradas, mesmo quando esta adulteração é muito baixa, ao nível de 0,5 % m/m. A técnica também pode ser utilizada como fonte de dados para a construção de modelos de calibração multivariada para quantificar diversos óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem, com baixos erros de previsão, mesmo em amostras com baixos teores de adulterante.

Dados de ESI-HRMS também foram utilizados para construção de modelos PLS para quantificação de óleo de girassol em azeite de oliva extra virgem. Os modelos mostraram eficiência comparável àqueles construídos com dados de baixa resolução. Deve-se ressaltar, no entanto, que os modelos construídos com dados de alta resolução têm a vantagem da identificação inequívoca dos íons (variáveis).

Dados de EASI(+)-MS foram usados para construção de um modelo PLS para quantificar óleo girassol em azeite de oliva extra virgem, o qual apresentou desempenho semelhante àquele gerado por ESI(+)-MS. Isso demonstra que a técnica EASI-MS pode ser aplicada no controle de qualidade de azeite de oliva extra virgem, o que representa grande vantagem por se tratar de uma análise extremamente rápida. Todos os modelos construídos,

com dados de ESI-MS, ESI-HRMS e EASI-MS, foram validados, provando que podem ser utilizados por outros analistas no controle de qualidade de azeite de oliva extra virgem.

A espectrometria de massas com ionização *electrospray* também foi utilizada com sucesso para quantificar biodiesel em diesel. Assim como no caso anterior, os modelos de calibração multivariada foram validados através do cálculo de figuras de mérito, com potencial possibilidade de aplicação para o controle de qualidade de diesel b.

Todos os trabalhos propostos contribuíram de forma significativa para a construção do conhecimento na área de concentração escolhida e agora um controle de qualidade semelhante pode ser aplicado em outras matrizes.

No trabalho foi possível desenvolver e validar métodos de quantificação multivariados utilizando técnicas nunca antes utilizadas para tal fim, o que torna o trabalho aqui desenvolvido, um trabalho inédito e pioneiro. Essa característica permitirá que o presente trabalho sirva de referência para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

Capítulo 7 – Referencias Bibliográficas

1. Cienfuegos, F., Vaitsman, D., *Análise Instrumental*, ed. Interciencias. Vol. único. **2000**, Rio de Janeiro.
2. Wang, Y. H., Qiu, C., Wang, D. W., Hu, Z. F., Yu, B. Y., Zhu, D. N., *Identification of multiple constituents in the traditional Chinese medicine formula Sheng-Mai San and rat plasma after oral administration by HPLC–DAD–MS/MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **54**, 1110-1127, **2011**.
3. Ortega, N., Maria-Paz Romero, M. P., Alba Macià, A., Jordi Reguant, J., Neus Anglès, N., José-Ramón Morelló, J. R., Maria-Jose Motilva, M. J., *Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples*. Journal of Food Composition and Analysis, **23**, 298-305, **2010**.
4. Karioti, A., Fani, E., Vincieri, F.F., Bilia, A. R., *Analysis and stability of the constituents of Curcuma longa and Harpagophytum procumbens tinctures by*

- HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **55**, 479-486, **2011**.
5. Lee, J. H., Lee, J. S., Park, S., Kim, H. K., Jeong, W. Y., Choi, J. Y., Sung, N. J., Lee, W. S., Lim, C. S., Kim, G. S., Shin, S. C., *Characterisation of flavonoids in Orostachys japonicus A. Berger using HPLC-MS/MS: Contribution to the overall antioxidant effect*. Food Chemistry, **124**, 1627-1633, **2011**.
 6. de Souza, P. P., Oliveira, L. C. A., Catharino, R. R., Eberlin, M. N., Augusti, D. V., Siebald, H. G. L., Augusti, R., *Brazilian cachaça: "Single shot" typification of fresh alembic and industrial samples via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting*. Food Chemistry, **115**, 1064-1068, **2009**.
 7. Cao, H., Huang, H., Xu, W., Chen, D., Yu, J., Li, J., Li, L., *Fecal metabolome profiling of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **691**, 68-75, **2011**.
 8. Prates, R. G. D., Augusti, R., Fortes, I. C. P., *Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Multivariate Calibration Analysis: A Combined Protocol To Quantify Biodiesel in Blends with Petrodiesel*. Energy & Fuels, **24**, 3183-3188, **2010**.
 9. Silverstein, R. M., Webster, F. X., *Identificação Espectrométrica de compostos Orgânicos*, LTC, **2000**, Rio de Janeiro.
 10. van der Werf, I. D., Calvano, C. D., Palmisano, F., Sabbatini, L., *A simple protocol for Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis of lipids and proteins in single microsamples of paintings*. Analytica Chimica Acta, **718**, 1-10, **2012**.
 11. Venter, A., Nefliu, M., Cooks, R. G., *Ambient desorption ionization mass spectrometry*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, **27**, 284-290, **2008**.
 12. Alberici, R. M., Simas, R. C., Sanvido, G. B., Romão, W., Lalli, P. M., Benassi, M., Cunha, I. B. S., Eberlin, M. N., *Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world"*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **398**, 265-294, **2010**.

13. Yamashita, M., Fenn, J. B., *Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme*. Journal of Physical Chemistry, **88**, 4451 - 4459, **1984**.
14. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M., *Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules*. Science, **246**, 64-71, **1989**.
15. Crotti, A. E. M., Vessecchi, R., Lopes, J. L. C., Lopes, N. P., *Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular*. Quimica Nova, **29**, 287-292, **2006**.
16. Lordeiro, R. A., *Construção de uma fonte EASI-MS (Easy Ambient Sonic-Spray Ionization) para análise direta de superfícies e sua aplicação em amostras de interesse forense.*, Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte, p. 78, **2011**.
17. Mauri, P., Pietta, P., *Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **23**, 61-68, **2000**.
18. Cooper, H. J., Marshall, A. G., *Electrospray ionization Fourier transform mass spectrometric analysis of wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **49**, 5710-5718, **2001**.
19. Araújo, A. S., da Rocha, L. L., Tomazela, D. M., Sawaya, A. C., Almeida, R. R., Catharino, R. R., Eberlin, M. N., *Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer*. Analyst, **130**, 884-889, **2005**.
20. Møller, J. K., Catharino, R. R., Eberlin, M. N., *Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity*. Analyst, **130**, 890-897, **2005**.
21. Møller, J.K.S., Catharino, R. R., Eberlin, M. N., *Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils: Spices from the Labiatae family*. Food Chemistry, **100**, 1283-1288, **2007**.
22. Wu, Z., Rodgers, R. P., Marshall, A. G., *Characterization of vegetable oils: Detailed compositional fingerprints derived from electrospray ionization Fourier*

- transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **52**, 5322-5328, **2004**.
23. Catharino, R. R., Haddad, R., Cabrini, L. G., Cunha, I. B. S., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N., *Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: Classification, quality, adulteration, and aging*. Analytical Chemistry, **77**, 7429-7433, **2005**.
 24. Ruiz-Samblás, C., Tres, A., Koot, A., Ruth, S. M. V., González-Casado, A., Cuadros-Rodríguez, L., *Proton transfer reaction-mass spectrometry volatile organic compound fingerprinting for monovarietal extra virgin olive oil identification*. Food Chemistry, **134**, 589-596, **2012**.
 25. Eide, I., Zahlsen, K., *Chemical Fingerprinting of Biodiesel Using Electrospray Mass Spectrometry and Chemometrics: Characterization, Discrimination, Identification, and Quantification in Petrodiesel*. Energy Fuels, **21**, 3702–3708, **2007**.
 26. Eide, I., Zahlsen, K., Kummernes, H., Neverdal, G., *Identification and Quantification of Surfactants in Oil Using the Novel Method for Chemical Fingerprinting Based on Electrospray Mass Spectrometry and Chemometrics*. Energy Fuels, **20**, 1161-1164, **2006**.
 27. Yang, L., Bennett, R., Strum, J., Ellsworth, B. B., Hamilton, D., Tomlinson, M., Wolf, R. W., Housley, M., Roberts, B. A., Welsh, J., Jackson, B. J., Wood, S. G., Banka, C. L., Thulin, C. D., Linford, M. R., *Screening phosphatidylcholine biomarkers in mouse liver extracts from a hypercholesterolemia study using ESI-MS and chemometrics*. Anal. Bioanal. Chem., **393**, 643–654, **2009**.
 28. Garrett, R., Vaz, B. G., Hovell, A. M. C., Eberlin, M. N., Rezende, C. M., *Arabica and Robusta Coffees: Identification of Major Polar Compounds and Quantification of Blends by Direct-Infusion Electrospray Ionization–Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **60**, 4253-4258, **2012**.
 29. Hirabayashi, A., Sakairi, M., Koizumi, H., *Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, **66**, 4557-4559, **1994**.

30. Hirabayashi, A., Sakairi, M., Koizumi, H., *Sonic Spray Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, , **67**, 2878-2882, **1995**.
31. Hirabayashi, A., Hirabayashi, Y., Sakairi, M., Koizumi, H., *Multiply-charged Ion Formation by Sonic Spray*. Rapid Communication in Mass Spectrometry, **10**, 1703-1705, **1996**.
32. Haddad, R., Sparrapan, R., Eberlin, M. N., *Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry*, Rapid Communication in Mass Spectrometry, , **20**, 2901-2905, **2006**.
33. Haddad, R., Sparrapan, R., Kotiaho, T., Eberlin, M. N., *Easy Ambient Sonic Spray Ionization-Membrane Interface Mass Spectrometry for Direct Analysis of Solution Constituents*. Analytical Chemistry, **80**, 898-903, **2008**.
34. Haddad, R., Catharino, R. R., Marques, L. A., Eberlin, M. N., *Perfume fingerprinting by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: nearly instantaneous typification and counterfeit detection*. Rapid Communication in Mass Spectrometry, **22**, 3662-3666, **2008**.
35. Saraiva, S. A., Abdelnur, P. V., Catharino, R. R., Nunes, G., Eberlin, M. N., *Fabric softeners: nearly instantaneous characterization and quality control of cationic surfactants by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*. Rapid Communication in Mass Spectrometry, **23**, 357-362, **2009**.
36. Alberici, R. M., Simas, R. C., de Souza, V., de Sá, G. F., Daroda, R. J., Eberlin, M. N., *Analysis of fuels via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*. Analytical Chimica Acta, **659**, 15-22, **2010**.
37. Riccio, M. F., Sawaya, A. C. H. F., Abdelnur, P. V., Saraiva, S. A., Haddad, R., Eberlin, M. N., Catharino, R. R., *Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometric of olive oils: Quality control and certification of geographical origin*. Analytical Letters, **44**, 1489-1497, **2011**.
38. Schalley, C. A., *Supramolecular chemistry goes gas phase: the mass spectrometric examination of noncovalent interactions in host-guest chemistry and molecular recognition*. International Journal of Mass Spectrometry, **194**, 11-39, **2000**.

39. Lanças, F. M. A., *Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas*. Scientia Chromatographica, **5**, 27-46, 2013
40. Ferreira, M. M. C., Antunes, A. M., Melgo, M. S., Volpe, P. L. O., *Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial*. Quimica Nova, **22**, 724-731, **1999**.
41. Neto, B. B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E., *25 anos de quimiometria no Brasil*. Quimica Nova, **29**, 1401-1406, **2006**.
42. Bruns, R. E., Faigle, J. F. G. *Quimiometria*. Quimica Nova, **8**, 84-99, **1985**.
43. de Sena, M. M., Frighetto, R. T. S., Valarini, P. J., Poppi, R. J., *Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos*. Quimica Nova, **23**, 547-556, **2000**.
44. Valderrama, P., Braga, J. W. B., Poppi, R. J., *Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada*. Quimica Nova, **32**, 1278-1287, **2009**.
45. Trygg, J. *Everything you need to know about Orthogonal Signal Correction (OSC) filters - and how they can improve interpretation of your data*. Homepage of Chemometrics, <http://www.acc.umu.se/~tnkjtg/Chemometrics/Editorial>.
46. Wold, S., Anttia, H., Lindgren, F., Öhmanc, J., *Orthogonal signal correction of near-infrared spectra*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **44**, 175-185, **1998**.
47. Sjöblom, J., Svensson, O., Josefson, M., Kullberg, H., Wold, S., *An evaluation of orthogonal signal correction applied to calibration transfer of near infrared spectra*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **44**, 229-244, **1998**.
48. Ferreira, M. H., Braga, J. W. B., de Sena, M. M., *Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy*. Microchemical Journal, **109**, 158-164, **2013**.
49. Valderrama, P., Braga, J. W. B., Poppi, R. J., *Variable selection, outlier detection, and figures of merit estimation in a partial least-squares regression multivariate calibration model. A case study for the determination of quality parameters in the alcohol industry by near-infrared spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **55**, 8331-8338, **2007**.

50. de Souza, S.V.C., Junqueira, R.G., *A procedure to assess linearity by ordinary least squares method*. *Analytica Chimica Acta*, **552**, 25-35, **2005**.
51. Pataca, L. C. M., *Análises de mel e própolis utilizando métodos Quimiométricos de Classificação e Calibração*. Tese, Universidade Estadual de Campinas: Campinas, p. 97, **2006**.
52. Wise, B. M., Gallagher, N. B., Bro, R., Shaver, J. M., Windig, W., Koch, R. S., *PLS_Toolbox 5.0 for use with MATLAB™*, Eigenvector Research Inc., Wenatchee,
53. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), *Manual de Garantia da Qualidade*, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, **2011**.
54. Food and Agriculture Organization (FAO), *Validation of analytical methods for food control*, Report of a Joint FAO/IAEA, Expert Consultation, FAO Food and Nutrition Paper No. 68, Rome, **1998**.
55. European Community, EC Directive 657. *Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*, Official Journal, L221, 8–36, Brussels, **2002**.
56. Thompson, M., Ellison, S. L. R., Wood, R., *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*. *Pure and Applied Chemistry*, **74**, 835-855, **2002**.
57. Lorber, A., *Error Propagation and Figures of Merit for Quantification by Solving Matrix Equations*. *Analytical Chemistry*, **58**, 1167-1172, **1986**.
58. Silva, M. A. M. Ferreira, M. H. Braga, J. W. B. Sena, M. M., *Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy*. *Talanta*, **89**, 342-351, **2012**.
59. *Manual Book of ASTM Standards; Standards practices for infrared, multivariate, quantitative analysis, E1655*, ASTM International. Vol. 03.06. 2000, west Conshohocken.

60. Williams, P., *Implementation of near-infrared technology*. In: P. Williams and K. Norris (eds.), *Near- Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, 2nd ed., American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, USA, **2001**.
61. Baccouri, O., Bendini, A., Cerretani, L., Guerfel, M., Baccouri, B., Lercker, G., Zarrouk, M., Miled, D. D. B., *Comparative study on volatile compounds from Tunisian and Sicilian monovarietal virgin olive oils*. *Food Chemistry*, **111**, 322-328, **2008**.
62. Fasciotti, M., Pereira Netto, A. D., *Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC–APCI–MS–MS*. *Talanta*, **81**, 1116-1125, **2010**.
63. Solomons, G., Fryhle, G., *Química Orgânica*, LTC, Rio de Janeiro, **2002**.
64. www.codexalimentarius.org/input/download/.../CXS_033e.pdf
Acesso 18/05/2014.
65. Ouni, Y., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M., *Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC–ESI–TOF MS method*. *Food Chemistry*, **127**, 1263-1267, **2011**.
66. Kachouri, F., Hamdi, M., *Enhancement of polyphenols in olive oil by contact with fermented olive mill wastewater by Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry*, **39**, 841–845, **2004**.
67. 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.*, Tese, Universidade Federal de Lavras, p. 89, **2006**.
68. www.codexalimentarius.org/input/download/.../CXS_210e.pdf
Acesso 18/05/2014.
69. <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/regutec.htm>
Acesso 18/05/2014.
70. <http://www.internationaloliveoil.org/>. Acesso 07/12/2011.
71. Christopoulou, E., Lazaraki, M., Komaitis, M., Kaselimis, K., *Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils*. *Food Chemistry*, **84**, 463 – 474, **2004**.

72. Vaclavik, L., Cajka, T., Htbek, V., Hajslova, J., *Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment*. *Analytica Chimica Acta*, **645**, 56-63, **2009**.
73. de la Mata-Espinosa, P., Bosque-Sendra, J. M., Bro, R., Cuadros-Rodríguez, L., *Olive oil quantification of edible vegetable oil blends using triacylglycerols chromatographic fingerprints and chemometric tools* *Talanta*, **85**, 177-182, **2011**.
74. Monfreda, M., Gobbi, L., Grippa, A., *Blends of olive oil and sunflower oil: Characterisation and olive oil quantification using fatty acid composition and chemometric tools*. *Food Chemistry*, **134**, 2283-2290, **2012**.
75. Monfreda, M., Gobbi, L., Grippa, A., *Blends of olive oil and seeds oils: Characterisation and olive oil quantification using fatty acids composition and chemometric tools. Part II*. *Food Chemistry*, **145**, 584-592, **2014**.
76. Ruiz-Samblás, C., Marini, F., Cuadros-Rodríguez, L., González-Casado, A., *Quantification of blending of olive oils and edible vegetable oils by triacylglycerol fingerprint gas chromatography and chemometric tools*. *Journal of Chromatography B*, **910**, 71-77, **2012**.
77. de la Mata, P., Dominguez-Vidal, A., Bosque-Sendra, J. M., Ruiz-Medina, A., Cuadros-Rodríguez, L., Ayora-Cañada, M. J., *Olive oil assessment in edible oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics*. *Food Control*, **23**, 449-455, **2012**.
78. Smejkalova, D., Piccolo, A., *High-power gradient diffusion NMR spectroscopy for the rapid assessment of extra-virgin olive oil adulteration*. *Food Chemistry*, **118**, 153 - 158, **2010**.
79. Sinelli, N., Cerretani, L., Di Egidio, V., Bendini, A., Casiraghi, E., *Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity*. *Food Research International*, **43**, 369 - 375, **2010**.
80. Rohman, A., Che Man, Y. B., *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil*. *Food Research International*, **43**, 886-892, **2010**.

81. Gurdeniz, G., Ozen, B., *Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data*. Food Chemistry, **116**, 519-525, **2009**.
82. Öztürk, B., Yalçın, A., Özdemir, D., *Determination of olive oil adulteration with vegetable oils by near infrared spectroscopy coupled with multivariate calibration*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, **18**, 191-201, **2010**.
83. Catharino, R. R., Haddad, R., Cabrini, L. G., Cunha, I. B. S., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N., *Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: Classification, quality, adulteration, and aging*. Analytical Chemistry, **77**, 7429-7433, **2005**.
84. Law, W. S., Chen, H. W., Balabin, R., Berchtold, C., Meier, L., Zenobi, R., *Rapid fingerprinting and classification of extra virgin olive oil by microjet sampling and extractive electrospray ionization mass spectrometry*. Analyst, **135**, 773-778, **2010**.
85. Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., *Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil*. Clinical Chemistry, **46**, 976 - 9788, **2000**.
86. Gómez-Ariza, J. L., Arias-Borrego, A., García-Barrera, T., Beltran, R., *Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication*. Talanta, **70**, 859 - 869, **2006**.
87. Simas, R. C., *Caracterização de óleos vegetais e petróleo por espectrometria de massas em condições ambientes e com alta exatidão e resolução*. Tese, Universidade Estadual de Campinas, p. 150, **2010**.
88. Negroni, M., D'Agostina, A., Arnoldi, A., *Effects of Olive, Canola, and Sunflower Oils on the Formation of Volatiles from the Maillard Reaction of Lysine with Xylose and Glucos*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **49**, 439-445, **2001**.
89. Kennard, R. W., Stone, L. A., *Computer aided design of experiments*. Technometrics, **11**, 137 - 148, **1969**.
90. Trullols, E., Ruisánchez, I., Rius, F. X., *Validation of qualitative analytical methods*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, **23**, 137 - 145, **2004**.

91. Braga, J. W. B., Pastore, T. C. M., Coradin, V. T. R., Camargos, J. A. A., Silva, A. R., *The use of near infrared spectroscopy to identify solid wood specimens of Swietenia macrophylla (CITES Apendix II)*. Journal-International Association of Wood Anatomists, **32**, 285 - 297, **2011**.
92. Teixeira, L. S. G., Oliveira, F. S., Santos, H. C., Cordeiro, P. W. L., Almeida, S. Q., *Multivariate calibration in Fourier transform infrared spectrometry as a tool to detect adulterations in Brazilian gasoline*. Fuel, **87**, 346-352, **2008**.
93. Silva, M. A. M., Ferreira, M. H., Braga, J. W. B., Sena, M. M., *Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy*. Talanta, **89**, 342-351, **2012**.
94. Botelho, B. G., Mendes, B. A. P., Sena, M. M., *Development and Analytical Validation of Robust Near-Infrared Multivariate Calibration Models for the Quality Inspection Control of Mozzarella Cheese*. Food Analytical Methods, **6**, 881-891, **2013**.
95. van Galen P. M., *Mass Spectrometry (A guide for novel users)*. Nijmegen University, **2005**.
96. Corgozinho, C. N. C., Barbeira, P. J. S. *Quantificação de biodiesel em BX por espectrofluorimetria sincronizada e calibração multivariada*, 6º PDPETRO, **2011**.
97. Resolução ANP Nº 24 de 28/7/2009 – DOU 29/7/2009 disponível em <http://www.anp.gov.br>, acesso em 02/07/2014.
98. <http://blog.planalto.gov.br/dilma-anuncia-medidas-para-aumentar-o-percentual-de-biodiesel-no-oleo-diesel/> acesso 02/07/ 2014.
99. <http://reporterbrasil.org.br/2014/06/petrobras-biocombustivel-reve-investimentos-em-meio-a-ampliacao-de-producao-de-biodiesel/> acesso 02/07/ 2014.
100. <http://www.dilma.com.br/site/noticias/view/dilma-anuncia-medidas-para-aumentar-o-percentual-de-biodiesel-no-oleo-diese>. Acesso 02/07/ 2014.
101. <http://www.ebc.com.br/2012/11/petrobras-conclui-testes-de-desempenho-com-combustivel-que-usa-20-de-biodiesel-no-diesel>. Acesso 02/07/ 2014.
102. BS EN 14078:2009 - *Liquid petroleum products. Determination of fatty acid methyl esters (FAME) in middle distillates. Infrared spectroscopy method*, **2010**.

103. *PMQC- Boletim de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis* – disponível em <http://www.anp.gov.br>, Acesso em 02/07/2014.
104. Vasconcelos, F. V. C., *Uso da região espectral de sobretons para determinação do teor de biodiesel e classificação de misturas diesel/biodiesel adulteradas com óleo vegetal*. Dissertação, Universidade Federal da Paraíba, p. 93, **2011**.
105. Ferrão, M. F., Viera, M. S., Pazos, R. E. P., Fachini, D., Gerbase, A. E., Marder, L., *Simultaneous determination of quality parameters of biodiesel/diesel blends using HATR-FTIR spectra and PLS, iPLS or siPLS regressions*. *Fuel*, **90**, 701-706, **2011**.
106. Gaydou, V., Kister, J., Dupuy, N., *Evaluation of multiblock NIR/MIR PLS predictive models to detect adulteration of diesel/biodiesel blends by vegetal oil*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **106**, 190-197, **2011**.
107. Oliveira, J. S., Montalvão, R., Daher, L., Suarez, P. A., Rubim, J. C., *Determination of methyl ester contents in biodiesel blends by FTIR-ATR and FTNIR spectroscopies*. *Talanta*, **69**, 1278-1284, **2006**.
108. Monteiro, M. R., Ambrozin, A. R., da Silva, M. S., Boffo, E. F., Pereira-Filho, E. R., Lião, L. M., Ferreira, A. G., *Evaluation of biodiesel–diesel blends quality using ¹H NMR and chemometrics*. *Talanta*, **78**, 660-664, **2009**.
109. Pierce, K. M., Schale, S. P., *Predicting percent composition of blends of biodiesel and conventional diesel using gas chromatography–mass spectrometry, comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry, and partial least squares analysis*. *Talanta*, **83**, 1254-1259, **2011**.
110. Resolução ANP Nº 50, de 23/12/2013 – DOU 24/12/2013 – disponível em <http://www.anp.gov.br>, acesso em 02/07/2014.