



Caracterização de óleos vegetais e azeites através de espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR)

Brigite Raquel Cardoso de Araújo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar

Orientador: Doutor José Carlos de Carvalho Rodrigues

Co-orientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Co-orientador: Engenheira Paula Isabel Barradas Arês

Júri:

Presidente: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor José Carlos de Carvalho Rodrigues, Investigador Auxiliar do Instituto de Investigação Científica Tropical.

Lisboa, 2012

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi possível devido ao apoio e colaboração de diversas pessoas a quem eu quero expressar o meu mais sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, agradeço à Sovena, nomeadamente às Engenheiras Paula Arês e Paula Lopes, a possibilidade de realização deste estágio académico. Agradeço também à Ana Maria, Cátia Ribeiro, Fábio Travessa e Filipa Nabeiro pela compreensão, dedicação e tempo disponibilizado no esclarecimento de dúvidas e discussão de ideias que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada a todos os colaboradores da Sovena que tive a oportunidade de conhecer e que, de certa forma, contribuíram para a execução do presente trabalho e no meu crescimento pessoal.

Agradeço à Professora Luísa Louro e ao Professor Miguel Mourato por me terem ajudado a encontrar o local para realização do estágio académico e pela disponibilidade e compreensão no início desta etapa.

Agradeço ao Professor José Carlos Rodrigues por ter aceite coordenar este estágio e pela confiança transmitida. Obrigada pelo seu acompanhamento ao longo do trabalho, por todo o apoio, disponibilidade, conhecimentos transmitidos e pelas críticas e sugestões que contribuíram para a realização e melhoria desta dissertação.

Agradeço aos meus amigos por me terem apoiado nesta fase tão importante para mim: obrigada pela vossa amizade, por todos os bons momentos de descontração que me proporcionaram e também por me ouvirem.

Por último, agradeço aos meus familiares. Um especial agradecimento aos meus pais e às minhas irmãs por acreditarem em mim, por todo o carinho, apoio, confiança, paciência, compreensão e incentivo ao longo desta caminhada.

A todos vós, o meu sincero obrigada!

Resumo

Este trabalho teve como objectivo a aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) na caracterização de óleos de soja e girassol refinados, azeite virgem extra e azeite.

Em primeiro lugar, validaram-se os modelos fornecidos pela *Bruker*, fabricante do equipamento. Estes modelos são referentes à composição em ácidos gordos e acidez de óleos e azeites, do índice de iodo para óleos e índice de peróxidos, absorvâncias no ultravioleta (232 e 270 nm), β -sitosterol e esteróis totais para azeites.

Paralelamente desenvolveram-se modelos de calibração individuais para os óleos (composição em ácidos gordos, índice de iodo, índice de anisidina e absorvâncias no ultravioleta (230 e 270 nm) e para os azeites (acidez, composição em ácidos gordos, β -sitosterol, esteróis totais, absorvância a 232 nm, eritrodiol e uvaol).

Foram também desenvolvidos dois modelos de calibração para quantificação de estigmastadienos em azeites virgem extra, de modo a detectar e quantificar a contaminação com óleo de soja ou girassol refinados. Os dois modelos são promissores - girassol ($r^2 = 0,94$; RMSECV = 0,013 ppm; RPD = 3,95) e soja ($r^2 = 0,70$; RMSECV = 0,054 ppm; RPD = 1,82). Contudo, será necessário proceder à validação externa dos modelos para confirmar estes resultados.

Palavras - chave: óleo de soja, óleo de girassol, azeite, FT-NIR, parâmetros de qualidade.

Abstract

The main goal of the present work was the application of near infrared spectroscopy (NIR) in the characterization of soybean oil, sunflower oil, extra virgin olive oil and olive oil.

Firstly, the models provided by *Bruker*, the equipment manufacturer, were validated. These models are related to the fatty acid composition and acidity for oils and olive oils, iodine value for oils and peroxide value, ultraviolet absorbance (232 and 270 nm), β -sitosterol and total sterols in olive oils.

Simultaneously calibration models were developed for the individual oils (fatty acid composition, iodine value, anisidine value and the ultraviolet absorbance (230 and 270 nm) and olive oils (acidity, fatty acid composition, β -sitosterol, total sterol, absorbance at 232 nm, erythrodiol and uvaol).

Also two calibration models were developed for the quantification of stigmastadienes in extra virgin olive oils, to detect and quantify the presence of soybean oil or sunflower oil. Both models proved promising – sunflower oil ($r^2 = 0,94$; RMSECV = 0,013 ppm; RPD = 3,95) and soybean oil ($r^2 = 0,70$; RMSECV = 0,054 ppm; RPD = 1,82). However, it is necessary to analyze a greater number of samples to carry out an external validation.

Key - words: soybean oil, sunflower oil, olive oil, FT-NIR, quality parameters.

Extended abstract

In food industry there is a growing concern for the quality control of foodstuffs as well as the development of faster and more efficient techniques for this purpose, such as near infrared spectroscopy (NIR). The main goal of the present work was the application of NIR in the characterization of soybean oil, sunflower oil, extra virgin olive oil and olive oil.

Firstly, the generic models provided by *Bruker*, the equipment manufacturer, were validated.

For the soybean oil, the models for C18:1 ($r^2 = 0,97$; RMSEP = 0,26%; RPD = 4,6), C18:2 ($r^2 = 0,93$; RMSEP = 0,37%; RPD = 2,9), C18:3 ($r^2 = 0,97$; RMSEP = 0,10%; RPD = 4,6) and iodine value ($r^2 = 0,91$; RMSEP = 0,61; RPD = 3,0) showed high values of r^2 and RPD, indicating good predictive ability of the models. The models for acidity ($r^2 = 0,0001$; RMSEP = 0,01%; RPD = 0,9) and C16:0 ($r^2 = 0,39$; RMSEP = 0,17%; RPD = 1,2) are not suitable for quantification of these two parameters. The model for C18:0 ($r^2 = 0,81$; RMSEP = 0,23%; RPD = 1,5) also can be used due to their high r^2 .

In the case of sunflower oil, only the model for C18:1 ($r^2 = 0,95$; RMSEP = 0,24%; RPD = 3,1) gave good predictions results for these parameter. The models for acidity, C16:0, C16:1, C18:0, C18:2, C18:3 and iodine value showed unsatisfactory results.

For the extra virgin olive oil, the models that showed predictive ability were related to C16:0 ($r^2 = 0,86$; RMSEP = 0,76; RPD = 2,4), C18:1 ($r^2 = 0,94$; RMSEP = 1,20%; RPD = 3,2) and C18:2 ($r^2 = 0,95$; RMSEP = 0,51; RPD = 4,1). The models for acidity, C16:1, C18:0, C18:3, β - sitosterol, total sterols, peroxide value, K232 and K270 showed poor predictive capacity.

For the olive oil, only two models showed predictive ability, the acidity ($r^2 = 0,93$; RMSEP = 0,03; RPD = 3,3) and C18:2 ($r^2 = 0,91$; RMSEP = 0,22; RPD = 3,2). The models for C16:0, C18:0, C18:1, C18:3, β - sitosterol, sterol total, peroxide value, K232 and K270 showed a poor predictive capacity (r^2 values between 0,02 and 0,49 and RPD values less than 1,3).

Simultaneously, calibration models were developed for the individual oils (soybean oil and sunflower oil) and olive oils (extra virgin olive oil and olive oil).

For soybean oil, the models for C18:0 ($r^2 = 0,96$; RMSEP = 0,08%; RPD = 5,4), C18:1 ($r^2 = 1,0$; RMSEP = 0,09%; RPD = 14,6), C18:2 ($r^2 = 0,98$; RMSEP = 0,16%; RPD = 7,5), C18:3 ($r^2 = 0,99$; RMSEP = 0,06%; RPD = 9,0), iodine value ($r^2 = 0,98$; RMSEP = 0,26; RPD = 8,0)

and K270 ($r^2 = 0,93$; RMSEP = 0,12; RPD = 3,8) showed predictive ability. The calibrations models developed for C16:0, C16:1, anisidine value and K230 showed unsatisfactory results.

In case of sunflower oil, the models for C16:0 ($r^2 = 0,84$; RMSEP = 0,07%; RPD = 2,5), C16:1 ($r^2 = 0,86$; RMSEP = 0,05%; RPD = 2,7), C18:0 ($r^2 = 0,89$; RMSEP = 0,06%; RPD = 3,1), C18:1 ($r^2 = 0,98$; RMSEP = 0,08%; RPD = 7,2), C18:2 ($r^2 = 0,93$; RMSEP = 0,22%; RPD = 3,7), iodine value ($r^2 = 0,90$; RMSEP = 0,28; RPD = 3,1) and K230 ($r^2 = 0,88$; RMSEP = 0,12; RPD = 2,9) gave good prediction results. The calibration models developed for the C18:3, anisidine value and K270 are not suitable for predicting these parameters.

In case of extra virgin olive oil, the models for acidity ($r^2 = 0,91$; RMSEP = 0,01%; RPD = 3,4), C16:0 ($r^2 = 0,87$; RMSEP = 0,46%; RPD = 2,9), C16:1 ($r^2 = 0,92$; RMSEP = 0,09%; RPD = 3,5), C18:0 ($r^2 = 0,93$; RMSEP = 0,11%; RPD = 3,7), C18:1 ($r^2 = 0,94$; RMSEP = 0,68%; RPD = 4,2) and C18:2 ($r^2 = 0,99$; RMSEP = 0,16%; RPD = 9,1) showed a good predictive ability. Moreover, the calibration models for the total sterols, K232 and erythrodiol and uvaol are not suitable for predicting these parameters.

The calibration models developed for olive oil which showed a good predictive models were acidity ($r^2 = 0,98$; RMSEP = 0,01%; RPD = 7,2) and C18:2 ($r^2 = 0,98$; RMSEP = 0,09%; RPD = 6,6). The calibration models for the parameters C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, β -sitosterol, sterol total, K232 and erythrodiol and uvaol are not suitable for predicting these parameters.

Also two calibration models were developed for the quantification of stigmastadienes in extra virgin olive oils, to detect and quantify the presence of soybean oil or sunflower oil. Both models proved promising – sunflower oil ($r^2 = 0,94$; RMSECV = 0,013 ppm; RPD = 3,95) and soybean oil ($r^2 = 0,70$; RMSECV = 0,054 ppm; RPD = 1,82). However, it is necessary to analyze a greater number of samples to carry out an external validation.

Not all of the calibration models developed showed suitable results, however it is concluded that NIR spectroscopy is a useful tool to control vegetable oils and olive oils quality.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Extended abstract.....	iv
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xv
Introdução.....	1
1. Revisão bibliográfica.....	2
1.1. Óleos vegetais.....	2
1.1.1. Composição química dos óleos vegetais	2
1.2. Azeite	3
1.2.1. Composição química do azeite	5
1.3. Degradação dos óleos e gorduras	6
1.3.1. Hidrólise	7
1.3.2. Oxidação não-enzimática	7
1.3.2.1. Auto-oxidação.....	7
1.3.2.2. Foto-oxidação.....	8
1.3.3. Oxidação enzimática	9
1.4. Parâmetros de avaliação da qualidade e estado de degradação dos óleos vegetais e azeites	9
1.5. Espectroscopia de Infravermelho Próximo.....	12
1.5.1. História	12
1.5.2. Espectroscopia de infravermelho próximo	12
1.5.3. Equipamento NIR com transformada de Fourier (FT-NIR).....	14
1.6. Quimiometria	16
1.6.1. Pré-tratamento espectral	16
1.6.2. Calibração multivariada	17
1.6.2.1. Análise de Componentes Principais (PCA).....	17
1.6.2.2. Regressão por Componentes Principais (PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	19
1.6.3. Calibração e validação do modelo	20

2.	Material e métodos	22
2.1.	Amostras	22
2.2.	Métodos de referência	22
2.3.	Aquisição dos espectros	22
2.4.	Validação dos modelos <i>Bruker</i>	22
2.5.	Calibração e validação de modelos	23
2.6.	Deteção de amostras desviantes (<i>outlier</i> e <i>outsiders</i>)	24
3.	Resultados e discussão	25
3.1.	Validação dos modelos <i>Bruker</i>	25
3.2.	Calibração e validação de modelos	29
3.2.1.	Óleo de soja refinado	29
3.2.1.1.	Ácido palmítico (C16:0)	31
3.2.1.2.	Ácido palmitoleico (C16:1)	32
3.2.1.3.	Ácido esteárico (C18:0)	33
3.2.1.4.	Ácido oleico (C18:1)	34
3.2.1.5.	Ácido linoleico (C18:2)	35
3.2.1.6.	Ácido linolénico (C18:3)	36
3.2.1.7.	Índice de iodo	37
3.2.1.8.	Índice de anisidina	38
3.2.1.9.	Absorvância no ultravioleta a 230 nm (K230)	39
3.2.1.10.	Absorvância no ultravioleta a 270 nm (K270)	40
3.2.2.	Óleo de girassol refinado	41
3.2.2.1.	Ácido palmítico (C16:0)	43
3.2.2.2.	Ácido palmitoleico (C16:1)	43
3.2.2.3.	Ácido esteárico (C18:0)	44
3.2.2.4.	Ácido oleico (C18:1)	45
3.2.2.5.	Ácido linoleico (C18:2)	46
3.2.2.6.	Ácido linolénico (C18:3)	47
3.2.2.7.	Índice de iodo	48
3.2.2.8.	Índice de anisidina	49
3.2.2.9.	Absorvância no ultravioleta a 230 nm (K230)	50
3.2.2.10.	Absorvância no ultravioleta a 270 nm (K270)	51
3.2.3.	Azeite virgem extra	51
3.2.3.1.	Acidez	54

3.2.3.2.	Ácido palmítico (C16:0)	54
3.2.3.3.	Ácido palmitoleico (C16:1)	55
3.2.3.4.	Ácido esteárico (C18:0)	56
3.2.3.5.	Ácido oleico (C18:1)	57
3.2.3.6.	Ácido linoleico (C18:2).....	58
3.2.3.7.	Esteróis Totais.....	59
3.2.3.8.	Absorvância no ultravioleta a 232 nm (K232)	60
3.2.3.9.	Eritrodiol e uvaol.....	61
3.2.4.	Azeite	62
3.2.4.1.	Acidez	64
3.2.4.2.	Ácido palmítico (C16:0)	65
3.2.4.3.	Ácido palmitoleico (C16:1)	66
3.2.4.4.	Ácido esteárico (C18:0)	67
3.2.4.5.	Ácido oleico (C18:1)	68
3.2.4.6.	Ácido linoleico (C18:2).....	69
3.2.4.7.	β – sitosterol	70
3.2.4.8.	Esteróis Totais.....	71
3.2.4.9.	Absorvância no ultravioleta a 232 nm (K232)	72
3.2.4.10.	Eritrodiol e uvaol.....	73
3.3.	Desenvolvimento de um modelo de calibração para quantificação de estigmastadienos em azeites virgens extra	74
3.3.1.	Modelo de calibração desenvolvido com amostras de azeite virgem extra contaminado com óleo de girassol refinado	74
3.3.2.	Modelo de calibração desenvolvido com amostras de azeite virgem extra contaminado com óleo de soja refinado.....	76
4.	Conclusões/ Perspectivas futuras.....	78
5.	Referências bibliográficas.....	80
6.	Anexos	85

Índice de figuras

Figura 1 - Representação da hidrólise completa de um triacilglicerol.....	7
Figura 2 - Espectro electromagnético.	13
Figura 3 - Modos de vibração fundamental.....	13
Figura 4 - Principais bandas de absorção do espectro NIR.	14
Figura 5 - Representação esquemática do interferómetro de Michaelson e do espectro resultante após aplicação da transformada de Fourier.	15
Figura 6 - Representação de uma componente principal para duas variáveis x_1 e x_2 . A – Representação dos vectores loadings. B – Representação dos vectores <i>scores</i> das amostras de 1 a 6 na direcção da componente principal.	18
Figura 7 - Espectros NIR referentes às amostras de óleo de soja refinado e respectiva região espectral de interesse (assinalada a branco) para a determinação dos parâmetros em estudo.....	29
Figura 8 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:0 (%) para o óleo de soja refinado.	32
Figura 9 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:1 (%) para o óleo de soja refinado.	33
Figura 10 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:0 (%) para o óleo de soja refinado.....	34
Figura 11 – Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:1 (%) para o óleo de soja refinado.....	35
Figura 12 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:2 (%) para o óleo de soja refinado.....	36
Figura 13 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:3 (%) para o óleo de soja refinado.....	37

Figura 14 – Validação externa do modelo referente ao parâmetro índice de iodo para o óleo de soja refinado.....	38
Figura 15 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro índice de anisidina para o óleo de soja refinado.	39
Figura 16 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K230 para o óleo de soja refinado.....	40
Figura 17 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K270 para o óleo de soja refinado.....	41
Figura 18 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:0 (%) para o óleo de girassol refinado.	43
Figura 19 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:1 (%) para o óleo de girassol refinado.	44
Figura 20 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:0 (%) para o óleo de girassol refinado.	45
Figura 21 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:1 (%) para o óleo de girassol refinado.	46
Figura 22 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:2 (%) para o óleo de girassol refinado.	47
Figura 23 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:3 (%) para o óleo de girassol refinado.	48
Figura 24 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro índice de iodo para o óleo de girassol refinado.	49
Figura 25 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro índice de anisidina para o óleo de girassol refinado.....	50
Figura 26 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K230 para o óleo de girassol refinado.	50

Figura 27 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K270 para o óleo de girassol refinado.	51
Figura 28 - Espectros NIR referentes às amostras de azeite virgem extra e respectiva região espectral de interesse (assinalada a branco) para a determinação dos parâmetros em estudo.....	52
Figura 29 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro acidez (%) para o azeite virgem extra.....	54
Figura 30 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:0 (%) para o azeite virgem extra.....	55
Figura 31 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:1 (%) para o azeite virgem extra.....	56
Figura 32 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:0 (%) para o azeite virgem extra.....	57
Figura 33 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:1 (%) para o azeite virgem extra.....	58
Figura 34 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:2 (%) para o azeite virgem extra.....	59
Figura 35 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro esteróis totais (ppm) para o azeite virgem extra.....	60
Figura 36 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K232 para o azeite virgem extra.....	61
Figura 37 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro eritrodiol e uvaol (%) para o azeite virgem extra.....	62
Figura 38 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro acidez (%) para o azeite.....	65
Figura 39 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:0 (%) para o azeite.....	66

Figura 40 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:1 (%) para o azeite.....	67
Figura 41 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:0 (%) para o azeite.....	68
Figura 42 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:1 (%) para o azeite.....	69
Figura 43 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:2 (%) para o azeite.....	70
Figura 44 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro β - sitosterol (%) para o azeite.....	71
Figura 45 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro esteróis totais (ppm) para o azeite.....	72
Figura 46 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K232 para o azeite.....	73
Figura 47 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro eritrodiol e uvaol (%) para o azeite.....	73
Figura 48 - Validação cruzada referente à quantificação de estigmastadieno (ppm) em amostras de azeite virgem extra contaminadas com óleo de girassol refinado.....	75
Figura 49 - Validação cruzada referente à quantificação de estigmastadieno (ppm) em amostras de azeite virgem extra contaminadas com óleo de soja refinado.	77

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição em ácidos gordos dos dois óleos vegetais.....	3
Tabela 2 - Composição em ácidos gordos do azeite virgem e azeite.....	5
Tabela 3 - Composição em esteróis do azeite.....	6
Tabela 4 - Limites máximos para os parâmetros de avaliação da qualidade e estado de degradação dos óleos vegetais em estudo.....	10
Tabela 5 - Limites máximos para os parâmetros de avaliação da qualidade e estado de degradação dos azeites.....	11
Tabela 6 - Resultados estatísticos dos modelos fornecidos pela <i>Bruker</i>	23
Tabela 7 - Resultados estatísticos referentes à validação externa dos modelos genéricos aplicados ao óleo de soja refinado.....	25
Tabela 8 - Resultados estatísticos referentes à validação externa dos modelos genéricos aplicados ao óleo de girassol refinado.....	26
Tabela 9 - Resultados estatísticas referentes à validação externa dos modelos genéricos aplicados ao azeite virgem extra.....	27
Tabela 10 - Estatísticas da validação externa dos modelos genéricos aplicados ao azeite.....	27
Tabela 11 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada dos parâmetros C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, índice de iodo, índice de anisidina, K230 e K270 para o óleo de soja refinado.....	30
Tabela 12 - Resultados estatísticos obtidos na validação externa dos parâmetros C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, índice de iodo, índice de anisidina, K230 e K270 para o óleo de soja refinado.....	31
Tabela 13 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada dos parâmetros C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, índice de iodo, índice de anisidina, K230 e K270 para o óleo de girassol refinado.....	42

Tabela 14 - Resultados estatísticos obtidos na validação externa dos parâmetros C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, índice de iodo, índice de anisidina, K230 e K270 para o óleo de girassol refinado. 42

Tabela 15 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada dos parâmetros referentes à acidez, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, esteróis totais, K232 e eritrodiol e uvaol para o azeite virgem extra..... 53

Tabela 16 - Resultados estatísticos obtidos na validação externa dos parâmetros referentes à acidez, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, esteróis totais, K232 e eritrodiol e uvaol para o azeite virgem extra. 53

Tabela 17 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada dos parâmetros referentes à acidez, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, β – sitosterol, esteróis totais, K232 e eritrodiol e uvaol para o azeite. 63

Tabela 18 - Resultados estatísticos obtidos na validação externa dos parâmetros referentes à acidez, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, β – sitosterol, esteróis totais, K232 e eritrodiol e uvaol para o azeite. 64

Tabela 19 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada referente à quantificação de estigmastadieno (ppm) em amostras de azeite virgem extra contaminadas com óleo de girassol refinado..... 75

Tabela 20 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada referente à quantificação de estigmastadieno (ppm) em amostras de azeite virgem extra contaminadas com óleo de soja refinado. 76

Lista de abreviaturas

1st Der – *First Derivative* – Primeira derivada

2nd Der – *Second Derivative* – Segunda derivada

FIR – Infravermelho longínquo

FT-IR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

FT-NIR – Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier

IV – Infravermelho

MIR – Infravermelho médio

MSC – *Multiplicative Scatter Correction* – Correção multiplicativa de dispersão

NIR – Infravermelho próximo

PC – *Principal Component* – Componente principal

PCA – *Principal Component Analysis* – Análise de componentes principais

PCR – *Principal Component Regression* – Regressão por componentes principais

PLS - *Partial Least Squares* – Regressão por mínimos quadrados parciais

Rk – número de factores PLS

RMSEP – *Root Mean Square Error of Prediction* – Erro quadrático médio de predição

RMESCV – *Root Mean Square Error of Cross Validation* – Erro quadrático médio da validação cruzada

RPD – *Ratio Performance Deviation* – Razão entre o desvio padrão das amostras e o erro (desvio padrão) do modelo

SLS – *Substraction of a Straight Line* – Correção da linha de base

SNV – *Standard Normal Variate* – Normalização vectorial

Introdução

Na indústria alimentar, a qualidade e segurança alimentar assumem um papel de grande importância, estando relacionada não só com a saúde e satisfação do consumidor, mas também com o desenvolvimento e progresso da indústria. Deste modo, surge a necessidade de desenvolvimento de técnicas mais rápidas e eficientes para avaliação da qualidade dos produtos, como é o caso da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) (Cen *et al.*, 2007).

A espectroscopia NIR verificou-se ser uma técnica bem implementada no sector agrícola durante décadas e actualmente tem ganho grande importância na indústria alimentar (Behemer, s.d.). Esta técnica tem sido amplamente utilizada em análises quantitativas de constituintes alimentares, tais como humidade, proteína, glúcidos e lípidos (Takamura *et al.*, 1995). A aplicação da espectroscopia NIR tornou-se muito comum em óleos e gorduras em estudos de qualidade e composição (Marquez *et al.*, 2005).

Muitos dos trabalhos desenvolvidos relativamente à aplicabilidade da espectroscopia NIR em análises de óleos assentam essencialmente na classificação e discriminação de diferentes tipos de óleo, bem como na detecção de adulteração dos óleos, especialmente no caso dos azeites virgens (Li *et al.*, 2000). A espectroscopia NIR tem sido utilizada também na determinação da acidez, índice de iodo e na composição em ácidos gordos de óleos e gorduras (Yildiz *et al.*, 2001). Mais especificamente nos azeites virgens, a espectroscopia NIR tem sido utilizada na monitorização *on-line* de carotenóides e pigmentos de clorofila (Marquez *et al.*, 2005).

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma técnica importante no controlo da qualidade e processo de monitorização da indústria, sendo uma técnica não destrutiva e de relativo baixo custo, tendo em conta a redução dos custos com reagentes, e redução dos tempos de análise (Armenta *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 1998).

Assim sendo, o presente trabalho teve como principais objectivos verificar a aplicabilidade da espectroscopia NIR na caracterização de óleos vegetais (soja e girassol refinados) e azeites (virgem extra e azeite) para controlo da qualidade.

1. Revisão bibliográfica

1.1. Óleos vegetais

Os óleos vegetais são uma importante fonte de energia na dieta humana. Além deste facto, são muito importantes nas propriedades funcionais de muitos alimentos, conferindo-lhes *flavour* e palatabilidade. Muitas aplicações técnicas dos óleos vegetais nos alimentos dependem das suas propriedades físicas e químicas (Chen *et al.*, 1995).

Entende-se por óleo vegetal a gordura vegetal líquida à temperatura de 20 °C. O óleo de soja, obtido através do processo de refinação do óleo extraído da semente de *Glycine max* (L).Merr., e o óleo de girassol, obtido através do processo de refinação do óleo extraído da semente *Helianthus annus* L., são dois dos óleos vegetais destinados à alimentação humana. As gorduras e os óleos vegetais destinados à alimentação humana devem ser provenientes de frutos ou sementes em condições de facultar um produto bromatologicamente aceitável, apresentar-se em conveniente estado de conservação, isento de substâncias ou matérias estranhas à sua normal composição bem como de microrganismos patogénicos ou de substâncias destes derivados em níveis susceptíveis de prejudicar a saúde do consumidor (Decreto de lei nº 106/2005).

1.1.1. Composição química dos óleos vegetais

Os óleos vegetais são constituídos maioritariamente (97 – 99%) por acilgliceróis (monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis) e ácidos gordos livres. Em menor quantidade (1 – 3%) encontram-se os álcoois superiores, ceras, esteróis, fosfolípidos, hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), entre outros.

Na **Tabela 1** está discriminada a composição em ácidos gordos dos dois óleos vegetais sobre o qual incide o presente trabalho, o óleo de soja e o de girassol.

Tabela 1 - Composição em ácidos gordos dos dois óleos vegetais.

Fonte: Codex Stan 210 – 1999, 2009.

Ácidos gordos	Limites máximos (%)	
	Óleo de soja	Óleo de girassol
C6:0 (ácido caprónico)	ND	ND
C8:0 (ácido caprílico)	ND	ND
C10:0 (ácido cáprico)	ND	ND
C12:0 (ácido laurico)	ND - 0,1	ND - 0,1
C14:0 (ácido mirístico)	ND - 0,2	ND - 0,2
C16:0 (ácido palmítico)	8,0 – 13,5	5,0 – 7,6
C16:1 (ácido palmitoleico)	ND - 0,2	ND - 0,3
C17:0 (ácido margárico)	ND - 0,1	ND - 0,2
C17:1 (ácido margaroleico)	ND - 0,1	ND - 0,1
C18:0 (ácido esteárico)	2,0 – 5,4	2,7 – 6,5
C18:1 (ácido oleico)	17,0 – 30,0	14,0 – 39,4
C18:2 (ácido linoleico)	48,0 – 59,0	48,3 – 74
C18:3 (ácido linolénico)	4,5 – 11,0	ND - 0,3
C20:0 (ácido araquídico)	0,1 – 0,6	0,1 – 0,5
C20:1 (ácido gadoleico)	ND - 0,5	ND - 0,3
C20:2 (ácido eicosadienóico)	ND - 0,1	ND
C22:0 (ácido beénico)	ND - 0,7	0,3 – 1,5
C22:1 (ácido erúxico)	ND - 0,3	ND - 0,3
C22:2 (ácido docosadienóico)	ND	ND - 0,3
C24:0 (ácido lignocérico)	ND - 0,5	ND - 0,5
C24:1 (ácido lignoceroleico)	ND	ND

ND – Não detectado.

Tal como se pode observar na **Tabela 1**, estes dois óleos diferem essencialmente na percentagem de ácido linolénico (C18:3). O óleo de soja apresenta um teor em ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados inferior e um teor de ácidos gordos saturados mais elevado quando comparado ao óleo de girassol.

1.2. Azeite

De acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI), a designação de azeite é exclusiva ao óleo proveniente unicamente dos frutos da oliveira (*Olea europea* L.), com exclusão dos óleos obtidos por solvente ou por procedimentos de reesterificação, bem como de toda a mistura com óleos de outra natureza.

Para obter um azeite virgem de qualidade é necessário partir de azeitonas maduras e sãs. O grau de maturação dos frutos também é um factor importante que contribui para a qualidade do produto final. Outros factores como a variedade das azeitonas, as condições de colheita, bem como o transporte, armazenamento e o sistema de

extracção do azeite são fundamentais para garantir a qualidade do produto (Boskou, 1998).

De acordo com o Regulamento (CE) nº 865/2004 do Conselho de 29 de Abril de 2004, o azeite pode ser classificado da seguinte forma:

1. Azeites Virgens – azeites obtidos a partir do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o azeite e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de acção química ou bioquímica, ou por processos de reesterificação e qualquer mistura com óleos de outra natureza. Os azeites virgens de acordo com as suas características podem ser denominados exclusivamente de acordo com as seguintes categorias:

1.1. Azeite virgem extra – azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8 g por 100 g e com as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

1.2. Azeite virgem – azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 2 g por 100 g e com as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

1.3. Azeite lampante – azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, superior a 2 g por 100 g e com as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

2. Azeite refinado – azeite obtido por refinação de azeite virgem, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,3 g por 100 g e com outras características conformes com as previstas para esta categoria.

3. Azeite (contém azeite refinado e azeite virgem) – obtido por loteamento de azeite refinado e de azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g e com outras características conformes com as previstas para esta categoria.

1.2.1. Composição química do azeite

Quimicamente, o azeite é constituído por duas fracções: uma saponificável e outra insaponificável. A fracção saponificável, insolúvel em água, é constituída essencialmente por triacilgliceróis e ácidos gordos livres, componentes maioritários, e também por componentes menores, como por exemplo, os fosfolípidos. A fracção insaponificável, solúvel em água, representa 0,5 a 1,5% da composição total do azeite e compreende hidrocarbonetos, esteróis, ceras, álcoois, substâncias corantes e aromáticas, vitaminas, tocoferóis e polifenóis (Gouveia, 1995). Esta fracção é importante para a estabilidade, sabor e aroma do azeite (Boskou, 1998).

Na **Tabela 2** é apresentada a composição em ácidos gordos do azeite virgem e do azeite (contém azeite virgem e azeite refinado).

Tabela 2 - Composição em ácidos gordos do azeite virgem e azeite.

Fonte: Codex Stan 33- 1981, 2009; Conselho Oleícola Internacional, 2008.

Ácidos gordos	Limites máximos (%)	
	Azeite virgem	Azeite (contém azeite virgem e azeite refinado)
C14:0 (ácido mirístico)	≤ 0,05	≤ 0,05
C16:0 (ácido palmítico)	7,5 – 20,0	7,5 – 20,0
C16:1 (ácido palmitoleico)	0,3 – 3,5	0,3 – 3,5
C17:0 (ácido margárico)	≤ 0,3	≤ 0,3
C17:1 (ácido margaroleico)	≤ 0,3	≤ 0,3
C18:0 (ácido esteárico)	0,5 – 5,0	0,5 – 5,0
C18:1 (ácido oleico)	55,0 – 83,0	55,0 – 83,0
C18:2 (ácido linoleico)	3,5 – 21,0	3,5 – 21,0
C18:3 (ácido linolénico)	≤ 1,0	≤ 1,0
C20:0 (ácido araquídico)	≤ 0,6	≤ 0,6
C20:1 (ácido gadoleico)	≤ 0,4	≤ 0,4
C22:0 (ácido beénico)	≤ 0,2	≤ 0,2
C24:0 (ácido lignocérico)	≤ 0,2	≤ 0,2
C18:1 (Trans)	≤ 0,05	≤ 0,2
C18:2 + C18:3 (Trans)	≤ 0,05	≤ 0,3

A composição qualitativa, em ácidos gordos, dos diversos azeites mantém-se constante, apenas variando a percentagem entre eles, devido a factores como a variedade, a localização geográfica, a altitude, as condições climáticas, o período de colheita, entre outros (Gouveia, 1995).

O azeite caracteriza-se pelo seu elevado teor em ácidos gordos monoinsaturados, presentes em proporções que variam entre 55 e 80% do total dos ácidos gordos. Os ácidos gordos polinsaturados representam 4 a 20% e os ácidos gordos saturados 5 a 15% do total (Gouveia, 1995).

O ácido gordo de maior relevo no azeite é o oleico (C18:1), representando 55 a 83% do total dos ácidos gordos. Outros ácidos gordos importantes são o palmítico (C16:0), o palmitoleico (C16:1), o esteárico (C18:0) e o linoleico (C18:2) (Gouveia, 1995).

Os esteróis, constituintes da fracção insaponificável, são muito importantes, pois estão relacionados com a qualidade do azeite e são utilizados para comprovar a sua autenticidade (Boskou, 1998). A composição em esteróis do azeite está representada na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Composição em esteróis do azeite.

Fonte: Conselho Oleícola Internacional, 2008.

Esteróis	Limites máximos (%)
Colesterol	≤ 0,5
Brassicasterol	≤ 0,1
Campesterol	≤ 4,0
Estigmasterol	< Campesterol
Δ-7-estigmasterol	≤ 0,5
β-sitosterol + Δ-5-avenasterol + Δ-5-23-estigmastadienol + clerosterol + sitostanol + Δ-5-24-estigmastadienol	≥ 93

O componente esterólico principal do azeite é o β-sitosterol, que representa a soma de vários esteróis (β-sitosterol + Δ-5-avenasterol + Δ-5-23-estigmastadienol + clerosterol + sitostanol + Δ-5-24-estigmastadienol), constituindo entre 75 a 90% da fracção total de esteróis (Boskou, 1998; Gouveia, 1995). Um azeite deverá ter no mínimo 1000 mg kg⁻¹ de esteróis totais.

1.3. Degradação dos óleos e gorduras

Tanto os óleos de soja e girassol refinados como os azeites sofrem reacções de degradação. A oxidação é a principal causa de modificação da qualidade dos óleos e gorduras, influenciando sobre o cheiro, sabor, aspecto, textura, cor, etc (Gouveia, 1995).

A degradação pode ocorrer mediante diversas vias de acordo com o meio e os agentes catalisadores: hidrólise, oxidação não-enzimática (auto-oxidação e foto-oxidação) e oxidação enzimática (Comandini *et al.*, 2009; Frega *et al.*, 1999).

1.3.1. Hidrólise

Os triacilgliceróis, presentes nos óleos e gorduras, são ésteres de glicerol com três moléculas de ácidos gordos, os quais ao serem hidrolisados originam diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos gordos livres e glicerol (Chakrabarty, 2003; Shakhashiri, 2007). Na **Figura 1** está representada a hidrólise completa de um triacilglicerol.

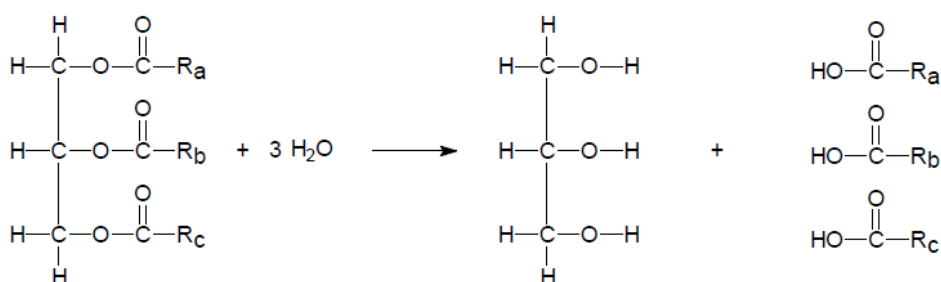


Figura 1 - Representação da hidrólise completa de um triacilglicerol.

Fonte: Shakhashiri, 2007.

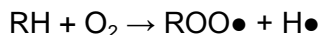
A hidrólise promove o aumento do grau de acidez devido à ocorrência de ácidos gordos livres nos óleos e gorduras (Gouveia, 1995).

1.3.2. Oxidação não-enzimática

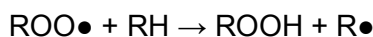
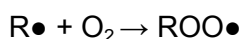
1.3.2.1. Auto-oxidação

A auto-oxidação é o principal mecanismo de oxidação de óleos e gorduras, tratando-se de um processo dinâmico e evolutivo ao longo do tempo. Este processo divide-se em três grupos de reacções: iniciação, propagação e conclusão. Estes três grupos de reacções, com excepção do início da oxidação, desenvolvem-se em simultâneo (Gouveia, 1995).

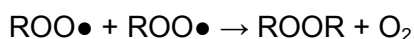
Na primeira etapa, ocorre a formação de radicais livres a partir de ácidos gordos insaturados (RH), não podendo ser evitadas pela adição de antioxidantes. Estas reacções têm uma energia de activação elevada, sendo facilitadas pela acção da temperatura, luz e vestígios de metais (Gouveia, 1995).



A propagação realiza-se em duas etapas. Na primeira há a formação de um radical peróxido livre (ROO•) e na segunda, fase determinante da reacção, esse radical livre reage com um ácido gordo insaturado, formando-se assim radicais alquilo livres (R•), altamente reactivos, que prosseguirão a reacção e hidroperóxidos (ROOH) (compostos primários de oxidação) (Gouveia, 1995).

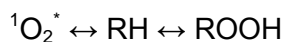
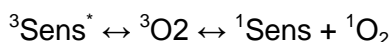


Numa terceira etapa, os radicais livres formados associam-se formando compostos estáveis, de baixa massa molar, responsáveis pelo odor a ranço, como aldeídos, álcoois, cetonas, furanonas, lactonas, ésteres, hidrocarbonetos, entre outros compostos secundários de oxidação (RR, ROOR, ROOR + O₂) (Choe *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2006; Gunstone, 2004).



1.3.2.2. Foto-oxidação

A foto-oxidação é um mecanismo que envolve a participação de fotossensibilizadores (agente catalisador) e do singleto de oxigénio (agente oxidante) como intermediário reactivo. Os compostos fotossensibilizadores presentes nos óleos, como as clorofilas, na presença de um fotão luminoso passam de um estado de singleto fundamental (¹Sens) a um estado singleto excitado (¹Sens *) e, em seguida, por transição electrónica, a um estado tripleto excitado (³Sens *). Através de uma transferência de energia do agente sensibilizador, no seu estado tripleto excitado, para o oxigénio, no seu estado fundamental (³O₂), forma-se oxigénio singleto (¹O₂). Este oxigénio singleto reage directamente com as ligações duplas dos ácidos gordos insaturados (RH), formando hidroperóxidos (ROOH) (Boskou, 1998; Gouveia, 1995).



1.3.3. Oxidação enzimática

A degradação de óleos e gorduras pode ocorrer também por via enzimática, nomeadamente pela acção da lipoxigenase. Esta enzima actua ao nível dos ácidos gordos insaturados, levando à formação de peróxidos e hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas. Estes compostos podem posteriormente entrar em reacções degradativas e formar, por exemplo, aldeídos e álcoois, os quais são responsáveis pelo *flavour* desagradável dos óleos e gorduras (Gunstone, 2004).

1.4. Parâmetros de avaliação da qualidade e estado de degradação dos óleos vegetais e azeites

A determinação da estabilidade oxidativa e dos produtos resultantes da oxidação são essenciais para a avaliação do período de vida útil, aceitabilidade e qualidade nutricional do produto (Yildiz *et al.*, 2001).

A determinação do perfil de ácidos gordos é um parâmetro importante tanto nos óleos vegetais como nos azeites, sendo essencial para avaliar a qualidade do produto, uma vez que é característico de cada óleo ou gordura. Para além do perfil de ácidos gordos, existe um conjunto de parâmetros que permite avaliar a qualidade dos óleos e dos azeites, fornecendo informação relativa ao seu estado de degradação.

Para os azeites são quatro os parâmetros principais que definem a sua qualidade e avaliam o seu estado de degradação: acidez, índice de peróxidos, absorvância no ultravioleta (K232 e K270) e características organolépticas (Granados, 2000). As características organolépticas dos azeites englobam um conjunto de sensações que são detectadas pelos órgãos dos sentidos, como o aspecto, a cor, o cheiro e sabor (Gouveia, 1995; Granados, 2000).

Nos óleos vegetais, os parâmetros utilizados para avaliar a sua qualidade e estado de degradação são essencialmente a acidez, índice de peróxidos, absorvância no ultravioleta (K230 e K270) e índice de anisidina.

A acidez mede a quantidade de ácidos gordos livres, expressa em ácido oleico. Trata-se de um parâmetro negativo, já que a partir de certos limites constitui um inconveniente para uso alimentar do produto (Granados, 2000).

O índice de peróxidos permite avaliar o estado inicial de oxidação, indicando também o estado de deterioração que podem ter sofrido certos componentes de interesse nutricional, como é o caso da vitamina E (Granados, 2000). Por sua vez, o índice de anisidina é utilizado para controlar os produtos secundários de oxidação nos óleos vegetais, nomeadamente os aldeídos (Yildiz *et al.*, 2000).

As absorvâncias no ultravioleta podem ser utilizadas como um critério de qualidade e autentificação e são utilizadas para detectar a presença de compostos resultantes do processo de oxidação (Boskou, 1998; Granados, 2000). A oxidação de ácidos gordos insaturados potencia a formação de peróxidos, compostos primários de oxidação que absorvem radiação a um comprimento de onda de 230 nm, e o deslocamento das ligações duplas carbono-carbono, formando-se assim dienos conjugados (compostos que absorvem radiação a um comprimento de onda de 232 nm). Os produtos de oxidação secundária como os aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, entre outros, absorvem a radiação num comprimento de onda mais elevado, entre os 268 e 270 nm.

Nas **Tabelas 4 e 5** estão discriminados os limites máximos de cada parâmetro mencionado anteriormente para os óleos de soja e girassol refinados e azeites, respectivamente.

Tabela 4 - Limites máximos para os parâmetros de avaliação da qualidade e estado de degradação dos óleos vegetais em estudo.

Fonte: Codex Stan 210 – 1999, 2009.

Parâmetro	Óleo de soja refinado	Óleo de girassol refinado
Acidez (%)	≤ 0,6	≤ 0,6
Índice de peróxidos (mg O ₂ /kg)	≤ 10,0	≤ 10,0
K230	≤ 7,0	≤ 7,0
K270	≤ 2,0	≤ 2,0
Índice de anisidina	≤ 10,0	≤ 10,0

Tabela 5 - Limites máximos para os parâmetros de avaliação da qualidade e estado de degradação dos azeites.

Fonte: Codex Stan 33- 1981, 2009.

Parâmetro	Azeite virgem extra	Azeite (contém azeite refinado e azeite)
Acidez (%)	≤ 0,8	≤ 1,0
Índice de peróxidos (mg O ₂ /kg)	≤ 20,0	≤ 15,0
K232	≤ 2,5	-
K270	≤ 0,22	≤ 0,9

Os azeites apresentam uma posição privilegiada entre os óleos comestíveis, devido ao seu *flavour*, estabilidade e benefícios para a saúde. Além disto, produz-se em áreas muito restritas, principalmente nos países mediterrânicos, e consome-se directamente sem necessidade de purificação ou refinação. Trata-se de um produto caro e por estes motivos é comum adulterá-lo com óleos mais baratos (Boskou, 1998). Assim sendo, o controlo deste produto é muito rigoroso. Existem então dois parâmetros importantes que são utilizados para averiguar a genuinidade do produto: a concentração de estigmastadienos e a percentagem de eritrodiol e uvaol presente no produto.

O estigmastadieno é um hidrocarboneto que apenas se encontra nos óleos e azeites refinados e forma-se a partir do β -sitosterol durante o processo de refinação, especialmente na etapa de descoloração, devido às temperaturas elevadas (superiores a 160 °C). A determinação deste parâmetro é utilizado para detectar a presença de óleos refinados no azeite virgem extra (Boskou, 1998; López-Villalta, 1999). O valor máximo admitido de estigmastadienos em azeites virgens e virgens extra é de 0,10 mg kg⁻¹ (Regulamento (CE) n.º 702/2007).

O eritrodiol e uvaol são diálcoois triterpénicos e a sua percentagem em relação à fracção total de esteróis é uma medida para comprovar a genuinidade de um azeite virgem extra, ou seja, é uma forma de verificar se ocorreu adição de óleo de bagaço de azeitona, uma vez que estes apresentam uma concentração de diálcoois triterpénicos superior quando comparado com azeites virgens extra (Boskou, 1998). O valor máximo admitido de eritrodiol e uvaol em azeites virgens extra e azeite (constituído por azeite virgem e azeite refinado) é de 4,5% (Regulamento (CE) n.º 702/2007).

1.5. Espectroscopia de Infravermelho Próximo

1.5.1. História

A descoberta da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) deveu-se a Frederick William Herschel, astrónomo inglês, no ano de 1800. Herschel investigou a contribuição de cada cor do espectro visível no aumento da temperatura de uma substância quando exposta a esta mesma radiação. Para tal, utilizou um prisma transparente que decompunha a radiação e verificou que ocorria um aumento inesperado da temperatura ao colocar o termómetro acima da região vermelha do espectro (Pasquini, 2003).

Apesar de ter sido a primeira radiação fora do visível a ser descoberta, só em 1960 começou realmente a ser utilizada graças ao trabalho de Karl Norris na caracterização de produtos agrícolas. Após as potencialidades da técnica terem sido demonstradas, verificou-se um acelerado desenvolvimento instrumental associado a um melhoramento na aquisição de dados espectrais e do seu tratamento, bem como a aplicação da quimiometria e análise multivariada para reunião da informação e seu uso adequado (Pasquini, 2003).

A espectroscopia NIR tornou-se uma técnica muito popular para uma vasta gama de análises em diversas indústrias, tais como, alimentar, agrícola, farmacêutica, petrolífera, têxtil, cosmética, entre outras, devendo-se o seu sucesso ao facto de ser uma técnica rápida, precisa e não destrutiva (Siesler *et al.*, 2002). Além disto, é uma técnica de baixo custo por análise, pouco exigente em termos de preparação das amostras, apresenta um elevado grau de reprodutibilidade, capaz de analisar vários parâmetros em simultâneo e, como não necessita de reagentes, não produz desperdícios (Rodrigues, 2007).

1.5.2. Espectroscopia de infravermelho próximo

O espectro electromagnético cobre uma vasta gama de comprimentos de onda, desde as ondas rádio até aos raios gama. A região de infravermelho (IV) encontra-se entre as gamas do visível e de microondas, subdividindo-se em infravermelho próximo (NIR) (12500 a 4000 cm^{-1}), infravermelho médio (MIR) (4000 a 400 cm^{-1}) e infravermelho longínquo (FIR) (400 a 5 cm^{-1}) (**Figura 2**).

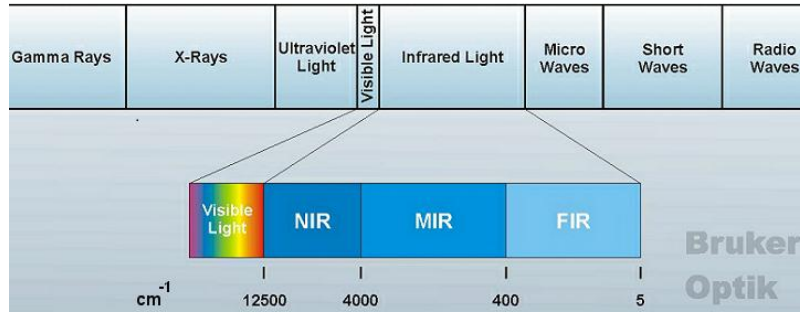


Figura 2 - Espectro electromagnético.

Fonte: Bruker Optik.

A espectroscopia de infravermelho próximo ($12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) corresponde aos sobretons e combinações de banda das vibrações fundamentais que ocorrem no infravermelho médio ($4000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$) das ligações C-H, O-H, N-H e S-H, isto é, heteroátomos de H. As principais vibrações que ocorrem no MIR são o alongamento, alteração da distância internuclear das ligações, e a deformação, alteração do ângulo das ligações (Figura 3).

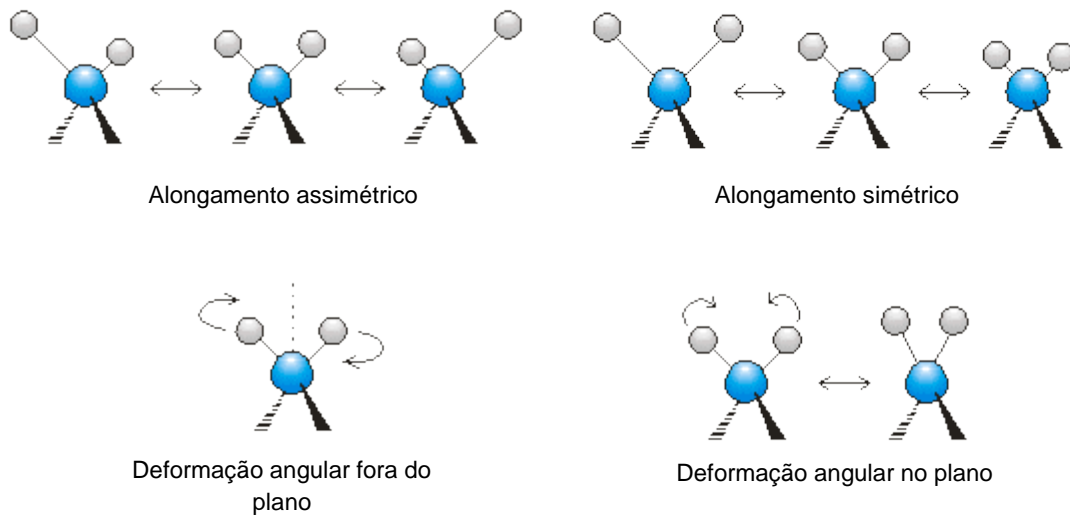


Figura 3 - Modos de vibração fundamental.

emitida pela fonte luminosa passa pelo divisor de feixe (*beamsplitter*), sendo dividida em dois feixes iguais. Um desses feixes segue em direção ao espelho fixo, é reflectido para o divisor de feixe e encaminhado para o detector. O mesmo acontece com o outro feixe que parte também do *beamsplitter* para o espelho móvel, a radiação é reflectida novamente e parte desta segue para o detector.

A energia que chega ao detector corresponde à soma destes dois feixes, os quais se recombinam ao passarem outra vez pelo *beamsplitter*. Como resultado da alteração do percurso óptico, devido ao movimento do espelho móvel, obtém-se o interferograma, isto é, um gráfico de energia em função do retardamento do percurso óptico. A informação contida no interferograma pode ser convertida num espectro (energia em função dos comprimentos de onda) através da transformada de Fourier (Burn *et al.*, 2001; Perkins, 1986).

Na **Figura 5** está representado um esquema do funcionamento do interferómetro de Michelson do espectrofotómetro FT-NIR.

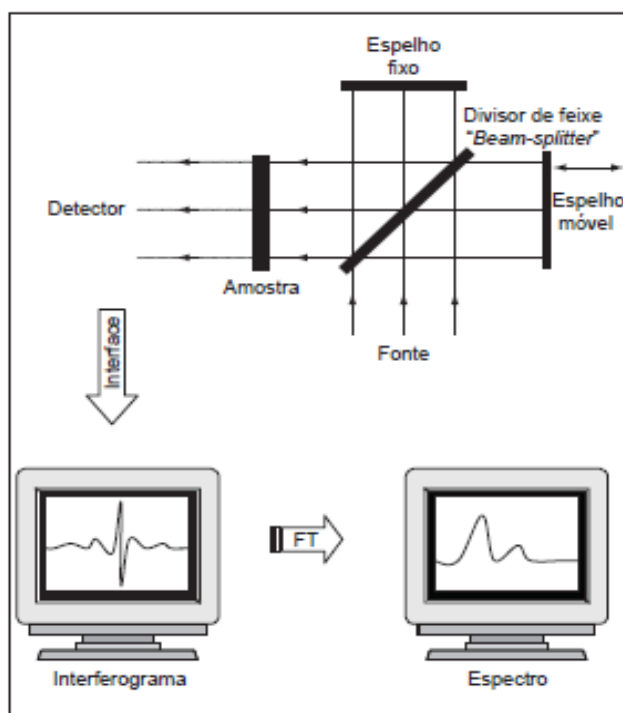


Figura 5 - Representação esquemática do interferómetro de Michaelson e do espectro resultante após aplicação da transformada de Fourier.

Fonte: Helfer *et al.*, 2006

Os dados obtidos através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) correspondem aos espectros da amostra subtraídos a um espectro de

fundo (*background*), de modo a retirar ao espectro da amostra a contribuição da célula e do meio ambiente. Cada espectro é representado por um vector que consiste num conjunto de valores de transmitância (ou absorvância) determinados a diferentes comprimentos de onda para uma determinada amostra (Costa, 2007).

A informação contida nos espectros NIR é multivariada, um espectro pode conter, dependendo da região seleccionada, mais de mil variáveis. Por outro lado, esta informação não é selectiva, composta por bandas largas e sobrepostas e é influenciada por um conjunto de variáveis físicas, químicas e estruturais das amostras. Desta forma, para se extrair informação útil dos espectros NIR é necessário recorrer à análise multivariada (Rodrigues, 2007).

1.6. Quimiometria

A Quimiometria é a ciência que aplica métodos matemáticos e estatísticos em ciência química, permitindo assim a obtenção de informação de um dado sistema químico (Naes *et al.*, 2002).

Com o desenvolvimento de técnicas instrumentais e a introdução de microprocessadores e microcomputadores no laboratório químico, tornou-se necessário o tratamento de dados mais complexo do ponto de vista matemático e estatístico de modo a estabelecer a relação entre os sinais obtidos e os resultados desejados.

As análises quantitativas que apresentam geralmente complexidade na sua realização, tornando-se morosas, estão a ser cada vez mais substituídas por técnicas mais rápidas, como é o caso da espectroscopia de IV.

1.6.1. Pré-tratamento espectral

Os espectros, para além da informação química das amostras, contêm também informação física que é influenciada pela densidade da amostra, temperatura, viscosidade, etc. Esta informação física constitui ruído, o qual tem de ser removido para se proceder ao estabelecimento de calibrações da composição química do material. Para isso, os espectros são tratados matematicamente, sendo este processo conhecido por pré-tratamento espectral.

Os pré-tratamentos mais utilizados em espectroscopia incluem a correcção da linha de base (SLS), correcção multiplicativa de dispersão (MSC), derivadas (1ª e 2ª ordem), normalização vectorial (SNV) e combinações destes. O pré-tratamento óptimo deve ser encontrado empiricamente testando todos eles e comparando os resultados (Rodrigues, 2007).

1.6.2. Calibração multivariada

A calibração multivariada permite estabelecer um modelo matemático que relaciona um conjunto de dados adquiridos de forma rápida, como é o caso da espectroscopia NIR, e um outro conjunto de dados obtidos laboratorialmente (Naes *et al.*, 2002).

Para fazer uso da informação obtida através da espectroscopia NIR existe um conjunto de ferramentas de quimiometria, destacando-se a regressão linear múltipla, regressão por componentes principais, regressão por mínimos quadrados parciais e análise de componentes principais.

De seguida apresenta-se uma breve descrição da análise de componentes principais, regressão por mínimos quadrados parciais e regressão por componentes principais.

1.6.2.1. Análise em Componentes Principais (PCA)

A análise em componentes principais ou *Principal Component Analysis* (PCA) é uma das ferramentas mais utilizadas na análise dos espectros NIR. A PCA permite reduzir um espaço com muitas variáveis (um espectro contém mais de 500 variáveis), do qual é difícil extrair informação, num espaço mais pequeno constituído pelas componentes principais, mantendo o máximo da informação original. A PCA permite ainda identificar diferenças, similaridades e outras relações de interesse entre amostras, bem como identificar amostras anómalas (*outliers*, desviantes) ou subgrupos (Naes *et al.*, 2002).

Através deste método é possível organizar uma vasta gama de informação numa matriz X formada por n linhas (amostras) e m colunas (espectros). A matriz X é decomposta no produto das matrizes *scores* (t) e *loadings* (p) e na matriz que contém os resíduos (E) (**Equação 1**), estimando-se assim novas variáveis, designadas de componentes principais ou PC's.

$$X = T \times P^T + E$$

Equação 1

Na **Figura 6** está ilustrado o significado dos vectores t (vectores *scores*) e p (vectores *loadings*) no plano bidimensional com duas variáveis, x_1 e x_2 . Na **Figura 6A** está representada a componente principal que é a recta que explica a maior variabilidade das amostras da **Figura 6B**. Os vectores *scores* são as projecções das amostras na direcção da componente principal e os vectores *loadings* são os cosenos dos ângulos formados entre a componente principal e cada variável.

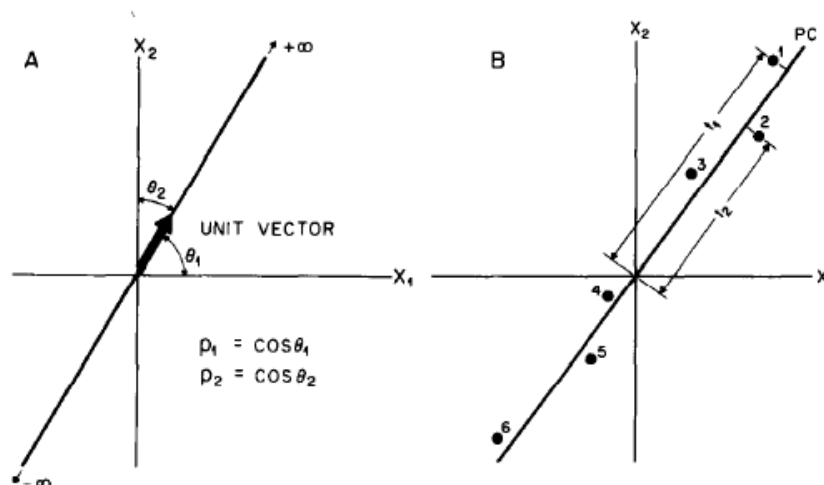


Figura 6 - Representação de uma componente principal para duas variáveis x_1 e x_2 . **A** – Representação dos vectores *loadings*. **B** – Representação dos vectores *scores* das amostras de 1 a 6 na direcção da componente principal.

Fonte: Geladi *et al.*, 1986.

As componentes principais são combinações lineares das variáveis originais e ortogonais entre si. As PC's são obtidas por ordem decrescente de informação estatística, ou seja, a primeira componente principal é o vector próprio associado ao valor próprio mais elevado, a segunda componente principal é o vector próprio corresponde ao segundo valor próprio mais elevado, e assim sucessivamente (Naes *et al.*, 2002).

O número mínimo de componentes principais pode ser estimado através de vários métodos, sendo o mais comum a validação cruzada (Wiberg, 2004).

1.6.2.2. Regressão por Componentes Principais (PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Tanto a regressão por componentes principais (*Principal Component Regression* – PCR), como a regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least-Square Regression* – PLS) são dois métodos cujo objectivo é determinar combinações lineares (componentes ou factores) do conjunto de valores de X e utilizar apenas essas combinações para o estabelecimento da equação de regressão (Naes *et al.*, 2002). Ambos os métodos determinam novas variáveis preditoras, mas de formas distintas.

O método PCR baseia-se na regressão linear múltipla, usando como variáveis regressoras as componentes principais (PC's) (Geladi *et al.*, 1986; Naes *et al.*, 2002). Neste caso, apenas a informação contida dos espectros (matriz X) e as PC's determinadas pela PCA são utilizadas na determinação das novas variáveis preditoras.

No caso do método PLS, para a determinação das novas variáveis preditoras é necessário ter em conta não só a informação contida nos espectros (matriz X), como também os valores de concentração (matriz Y). No processamento matemático são determinadas duas matrizes que traduzem as variações nos dois conjuntos de dados, sendo posteriormente gerados os seus vectores próprios, também designados de factores PLS. Estes vectores podem ser utilizados na predição das concentrações, uma vez que contêm toda a informação relevante para o sistema em estudo. A vantagem assenta no facto de que toda a informação importante fica comprimida e pode ser utilizada na calibração (Conzen, 2006).

O primeiro factor caracteriza-se por apresentar as principais alterações observadas no espectro NIR, o qual têm grande importância no modelo de calibração. Com o aumento do número de factores, apenas pequenas alterações na estrutura são caracterizadas. Um reduzido número de factores caracteriza importantes alterações na estrutura espectral, enquanto um elevado número de factores caracteriza essencialmente distúrbios causados pelo ruído (Conzen, 2006).

1.6.3. Calibração e validação do modelo

O modelo de calibração consiste no estabelecimento de uma correlação entre os resultados espectrais com a composição de uma dada substância, procurando obter a melhor correlação possível entre os dados (Conzen, 2006).

O número de amostras utilizado no modelo de calibração é importante e depende muito da sua complexidade e variabilidade, variando entre 50 a 100 amostras. Para produzir um modelo robusto deve-se verificar variabilidade nas concentrações da substância em interesse, bem como apresentar uma distribuição uniforme entre os extremos da gama de valores (Pasquini, 2003). As amostras de calibração devem ser representativas das amostras a analisar futuramente (Wiedemann *et al.*, 1998).

Para o estabelecimento do modelo é necessário definir a região espectral, o pré-tratamento e o número de factores PLS. Isto é realizado através da validação cruzada (*cross validation*). A validação cruzada é uma técnica baseada apenas no conjunto de dados de calibração. Neste caso, é retirada uma amostra de um conjunto de n amostras, sendo as restantes $n-1$ amostras utilizadas para obter um modelo para predição dos valores da amostra excluída. Repete-se o procedimento até que todas as amostras tenham sido excluídas uma vez e os seus valores preditos (Naes *et al.*, 2002). A comparação dos resultados preditos com os valores de referência permitem calcular o coeficiente de determinação (r^2) e o erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV - *Root Mean Squared Error of Cross Validation*) (**Equação 2**). Quanto menor o valor de RMSEC, melhor o modelo (Conzen, 2006).

$$RMSECV = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i \text{ referência} - y_i \text{ previsto})^2} \quad \text{Equação 2}$$

A selecção do número óptimo de factores é crucial para a qualidade do modelo PLS. Um modelo com menos factores do que o necessário (*underfitting*) origina resultados pouco satisfatórios, uma vez que a informação do modelo é insuficiente. Por outro lado, um número excessivo de factores (*overfitting*) normalmente contém ruído e, portanto, o modelo também é insatisfatório (Conzen, 2006).

A validação cruzada tem sido utilizada como género de validação interna do modelo nos casos em que o número de amostras é limitado, inferior a 50 amostras, não sendo possível realizar uma verdadeira validação (externa) do modelo. No entanto, estes modelos devem ser usados com cautela até se proceder à sua validação.

A validação externa consiste na predição dos valores dos parâmetros de novas amostras, usando cada um dos modelos, e correlacionar esses valores com os valores obtidos pelos métodos de referência. A utilização de novas amostras, ditas independentes por não terem sido utilizadas na modelação, é crucial para a validação dos modelos. A selecção das amostras é feita de modo a cobrir o intervalo de variação para o parâmetro em causa. A avaliação destes modelos é realizada através do coeficiente de determinação (r^2), erro médio quadrático da predição (RMSEP - *Root Mean Squared Error of Prediction*) e RPD (*Ratio Performance Deviation*).

O coeficiente de determinação (r^2) indica a proporção da variabilidade de y que é explicada pela regressão. O seu valor varia entre 0 e 1, sendo a recta de regressão perfeita quando $r^2 = 1$.

O erro quadrático médio da predição (RMSEP) corresponde à raiz quadrada do somatório do quadrado dos desvios (valor predito - valor de referência) divididos pelo número de amostras (**Equação 3**) (Naes *et al.*, 2002). RMSEP é uma medida quantitativa da precisão da previsão do modelo no caso da validação externa e quanto menor este erro melhor será a qualidade do modelo (Conzen, 2006).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i \text{ referência} - y_i \text{ previsto})^2} \quad \text{Equação 3}$$

Por forma a comparar a *performance* relativa dos modelos também se usa a estatística RPD que corresponde à razão entre o erro quadrático médio da predição (RMSEP) e o desvio padrão das amostras de validação (**Equação 4**). Os modelos com $RPD \geq 2,5$ são úteis para a triagem de amostras e com $RPD > 5$ podem ser usados no controlo de qualidade (Williams *et al.*, 1993).

$$RPD = \frac{\text{Desvio Padrão}}{RMSEP} \quad \text{Equação 4}$$

2. Material e métodos

2.1. Amostras

Neste trabalho utilizaram-se amostras de óleos refinados (soja e girassol), azeite virgem extra e azeite utilizadas no controlo de qualidade do produto. No total foram utilizadas 642 amostras, das quais 89 são de óleo de soja refinado, 209 de óleo de girassol refinado, 208 de azeite virgem extra e 136 de azeite, analisadas de acordo com os métodos de referência e com os padrões de qualidade da *Sovena Portugal Consumer Goods S.A.*

2.2. Métodos de referência

No **Anexo I** encontra-se a descrição sumária de cada um dos métodos de referência utilizados na determinação de cada parâmetro (acidez, índice de peróxidos, absorvâncias no ultravioleta, índice de anisidina, índice de iodo, composição em ácidos gordos, composição em esteróis, estigmastadienos, eritrodiol e uvaol).

2.3. Aquisição dos espectros

Para cada amostra foram obtidos espectros em duplicado num espectrofotómetro FT-NIR, modelo MPA (*Multi Purpose Analyzer*) da *Bruker Optic GmbH Germany* com detector InGaAs (índio-gálio-arsénio), região espectral entre 12500 a 4000 cm^{-1} , resolução de 8 cm^{-1} , 32 acumulações por espectro a uma temperatura de 55 °C, num vial com 8 mm de percurso óptico. Antes da leitura das amostras no espectrofotómetro NIR, estas foram mantidas a uma temperatura de 55 ± 1 °C. Uma vez que as amostras são líquidas e translúcidas, não foi necessário qualquer tipo de pré-tratamento das mesmas, sendo utilizado cerca de 1mL de amostra.

2.4. Validação dos modelos *Bruker*

Os modelos fornecidos pela *Bruker* foram obtidos para cada parâmetro utilizando amostras de óleos e azeites simultaneamente. Para estes modelos a *Bruker* forneceu resultados da validação externa para alguns parâmetros e para outros parâmetros apenas os resultados da calibração (**Tabela 6**). Para os parâmetros relativos ao β – sitosterol, esteróis totais, índice de peróxidos e absorvâncias no ultravioleta (232 e 270 nm) a *Bruker* não forneceu nenhuma informação.

Tabela 6 - Resultados estatísticos dos modelos fornecidos pela *Bruker*.

Parâmetro	r ²	RMSE	RPD	Rk	Resultados
Acidez (%)	0,99	0,02	13,3	18	Validação
C16:0 (%)	0,98	0,52	7,6	25	Validação
C16:1 (%)	0,86	0,02	2,7	20	Calibração
C18:0 (%)	0,98	0,04	7,0	20	Calibração
C18:1 (%)	1,00	0,51	30,4	18	Calibração
C18:2 (%)	1,00	0,53	45,0	18	Validação
C18:3 (%)	1,00	0,15	19,3	14	Validação
Índ. iodo	0,95	0,40	4,3	6	Calibração

Estes modelos fornecidos pela *Bruker* foram validados individualmente para cada tipo de óleo e azeite para os seguintes parâmetros: óleos de soja e girassol refinados - acidez, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 e índice de iodo; azeite virgem extra e azeite - acidez, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, β - sitosterol, esteróis totais, índice de peróxidos e absorvâncias no ultravioleta (232 e 270 nm).

2.5. Calibração e validação de modelos

Procedeu-se também ao desenvolvimento de modelos de calibração, individualmente para cada tipo de óleo e azeite, para diversos parâmetros: óleos de soja e girassol refinados - ácidos gordos (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3), índice de iodo, índice de anisidina e absorvâncias no ultravioleta (230 e 270 nm); azeite virgem extra - acidez, ácidos gordos (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2), esteróis totais, absorvância no ultravioleta (232 nm), eritrodiol e uvaol. Para o azeite foram desenvolvidos modelos de calibração para os mesmos parâmetros que o azeite virgem extra e para o β - sitosterol. No caso do azeite virgem extra procedeu-se ainda ao desenvolvimento de dois modelos de calibração para a quantificação de estigmastadienos.

Os modelos de calibração foram desenvolvidos pelo método da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), usando o *software Bruker OPUS Quant 2 vs. 7.0 (Bruker Optics, Ettlingen, Germany)*, correlacionando os parâmetros de interesse com os respectivos espectros. Para o efeito, testaram-se diferentes combinações de regiões espectrais e de pré-tratamento usando a opção *optimize* do Quant2. O número de componentes PLS (rank) foi obtido por validação cruzada. Nos casos em que se obteve mais do que um modelo de boa qualidade para um determinado parâmetro, os

modelos foram seleccionados comparando os resultados estatísticos da validação cruzada (r^2 , RMSECV e RPD).

Estes modelos foram então validados com novas amostras e a sua *performance* avaliada (r^2 , RMSEP e RPD).

2.6. Detecção de amostras desviantes (*outlier* e *outsiders*)

A distância de Mahalanobis é utilizada como diagnóstico para a detecção de amostras desviantes, quer no caso em que o espectro é diferente dos de calibração (*outlier*), quer quando o valor predito fica fora do intervalo de valores das amostras de calibração (*outsider*). O limite para a distância de Mahalanobis é determinado com base na distribuição de todos os espectros de calibração, calculando a média e o desvio padrão. Assumindo uma distribuição normal define-se um limite (*one-sided*) que cobre a probabilidade de 99,999%.

3. Resultados e discussão

3.1. Validação dos modelos *Bruker*

Nesta primeira parte do trabalho procedeu-se à validação externa dos modelos genéricos desenvolvidos pela *Bruker* para cada um dos produtos em estudo (óleo de soja e girassol refinados, azeite virgem extra e azeite).

Na **Tabela 7** são apresentadas as estatísticas de validação externa relativamente ao óleo de soja refinado.

Tabela 7 - Resultados estatísticos referentes à validação externa dos modelos genéricos aplicados ao óleo de soja refinado.

Soja Refinada	Validação externa			
	Parâmetros	N. ^o amostras	r^2	RMSEP
Acidez (%)	88	0,00	0,01	0,9
C16:0 (%)	89	0,39	0,17	1,2
C18:0 (%)	89	0,81	0,23	1,5
C18:1 (%)	87	0,97	0,26	4,6
C18:2 (%)	86	0,93	0,37	2,9
C18:3 (%)	89	0,97	0,10	4,6
Índice de iodo	86	0,91	0,61	3,0

De acordo com a análise da **Tabela 7**, verifica-se que os modelos da *Bruker* para a acidez e ácido palmítico (C16:0) não são adequados para a determinação destes dois parâmetros em óleo de soja refinado. Além de apresentarem um coeficiente de determinação (r^2) muito reduzido, 0,00 e 0,39 para a acidez e C16:0, respectivamente, também o valor de RPD é bastante baixo. Este resultado mostra bem a importância de validar os modelos com um subconjunto de amostras para as quais se pretende utilizar os modelos. Os restantes parâmetros apresentam valores de r^2 entre 0,81 e 0,97, valores considerados elevados, e os respectivos valores de RPD, com excepção do C18:0 (RPD = 1,5), indicam que os modelos podem ser utilizados para a triagem de amostras (RPD \geq 2,5).

No caso do óleo de girassol refinado, de acordo com a **Tabela 8**, constata-se que os modelos, à excepção do modelo referente à acidez, apresentam resultados estatísticos inferiores quando comparados com os resultados obtidos para o óleo de soja refinado.

Tabela 8 - Resultados estatísticos referentes à validação externa dos modelos genéricos aplicados ao óleo de girassol refinado.

Parâmetros	Validação externa			
	N. ^o amostras	r ²	RMSEP	RPD
Acidez (%)	209	0,21	0,01	1,1
C16:0 (%)	209	0,39	0,29	0,8
C16:1 (%)	208	0,71	0,02	0,8
C18:0 (%)	209	0,33	0,19	0,9
C18:1 (%)	209	0,95	0,24	3,1
C18:2 (%)	209	0,89	0,46	1,9
C18:3 (%)	185	0,20	0,04	0,6
Índice de iodo	208	0,58	0,69	1,2

Analisando a referida tabela, verifica-se que apenas o modelo relativo ao C18:1 ($r^2 = 0,95$; RPD = 3,1) é adequado, embora o modelo C18:2 também possa ser usado ($r^2 = 0,89$; RPD = 1,9). Para estes modelos a *Bruker* não apresentou resultados de validação, apenas os de calibração (**Tabela 6**). Como se pode verificar, os valores apresentados de RPD de 30 e 45, não reflectem de todo a capacidade preditiva dos modelos para estimar amostras de óleo de girassol refinado. No entanto, é de realçar que o erro da validação (**Tabela 8**) é inferior ao erro da calibração da *Bruker* (**Tabela 6**). Os restantes parâmetros apresentam valores de r^2 entre 0,20 e 0,71 e valores de RPD inferiores a 1,2, denotando a fraca relação existente entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência.

Na **Tabela 9** são apresentados os resultados estatísticos referentes à validação externa para o azeite virgem extra.

Tabela 9 - Resultados estatísticas referentes à validação externa dos modelos genéricos aplicados ao azeite virgem extra.

Azeite Virgem Extra	Validação externa			
	Parâmetros	N. ^o amostras	r ²	RMSEP
Acidez (%)	205	0,73	0,03	1,4
C16:0 (%)	199	0,86	0,76	2,4
C18:0 (%)	205	0,82	0,25	1,8
C18:1 (%)	202	0,94	1,20	3,2
C18:2 (%)	206	0,95	0,51	4,1
C18:3 (%)	206	0,25	0,06	1,0
β - sitosterol (%)	206	0,05	0,52	0,9
Esteróis Totais (ppm)	205	0,37	126,17	1,1
Índice de peróxidos (meq O ₂ / kg)	206	0,02	1,79	0,9
K232	206	0,17	0,27	0,6
K270	206	0,03	0,04	0,4

Como se pode observar, os modelos que apresentaram os melhores resultados estatísticos são os referentes ao C16:0 ($r^2 = 0,86$; RPD = 2,4), C18:1 ($r^2 = 0,94$; RPD = 3,2) e C18:2 ($r^2 = 0,95$; RPD = 4,1), que são adequados para a triagem das amostras. Os modelos para o C18:0 e para a acidez também podem ser utilizados, mas os restantes modelos (C18:3, β-sitosterol, esteróis totais, índice de peróxidos, K232 e K270) não são adequados para avaliar os respectivos parâmetros em azeite virgem extra.

Na **Tabela 10** são apresentados os resultados estatísticos relativamente à validação externa para o azeite.

Tabela 10 - Estatísticas da validação externa dos modelos genéricos aplicados ao azeite.

Azeite	Validação externa			
	Parâmetros	N. ^o amostras	r ²	RMSEP
Acidez (%)	136	0,93	0,03	3,3
C16:0 (%)	136	0,14	0,74	1,0
C18:0 (%)	136	0,38	0,20	1,0
C18:1 (%)	136	0,49	0,93	1,3
C18:2 (%)	130	0,91	0,22	3,2
C18:3 (%)	136	0,02	0,06	0,9
β - sitosterol (%)	136	0,11	0,30	0,9
Esteróis Totais (ppm)	136	0,35	99,7	1,2
Índ.Peróxidos (meq O ₂ / kg)	136	0,06	2,01	0,6
K232	134	0,08	0,34	0,7
K270	134	0,13	0,08	0,4

Em relação ao azeite, os melhores modelos são os referentes à acidez e C18:2 (**Tabela 10**). O modelo da acidez, de acordo com o r^2 obtido (0,93) e o RPD (3,3), apresenta melhores resultados para o azeite do que para o azeite virgem extra ($r^2 = 0,73$; RPD = 1,4), contudo, apresentam o mesmo RMSEP (0,03%). Por outro lado, o modelo para predição do C18:2 apresenta melhores resultados quando utilizado para o azeite virgem extra ($r^2 = 0,95$; RPD = 4,1), no entanto, o RMSEP é superior (0,51%).

No **Anexo II** são apresentados os gráficos relativos à correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência para cada parâmetro em relação a cada produto (óleo de soja e girassol refinado, azeite virgem extra e azeite).

De acordo com os resultados estatísticos apresentados pela *Bruker* (**Tabela 6**), todos os modelos deviam prever correctamente os parâmetros, independentemente do óleo ou azeite em questão. Como se verificou, os resultados obtidos com as validações efectuadas individualmente para cada tipo de óleo ou azeite (**Tabelas 7, 8, 9 e 10**), a capacidade preditiva varia com o tipo de óleo ou azeite e com o parâmetro. Por exemplo, o modelo da acidez só prediz bem para o caso do azeite, razoavelmente bem para o azeite virgem extra e prediz muito mal os óleos de soja e girassol refinados. Em parte, estes resultados podem ser explicados pelo facto da variabilidade da acidez ser mais elevada no azeite, seguida do azeite virgem extra e muito baixa para os óleos.

Os modelos relativos à acidez ($r^2 = 0,99$; RPD = 13,3) e ao C16:0 ($r^2 = 0,98$; RPD = 7,6) (**Tabela 6**) deveriam apresentar uma boa capacidade preditiva, no entanto, a validação da *Bruker* foi feita com amostras com um intervalo de variação muito alargado que incluía diferentes tipos de óleo, nomeadamente óleo de colza, óleo de girassol e soja crus e refinado. Em conclusão, os modelos genéricos, obtidos com diferentes óleos, aparentemente são muito bons, mas na prática não funcionam convenientemente para avaliar os óleos individualmente.

No **Anexo III** estão representados os gráficos relativos à correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelos métodos de referência fornecidos pela *Bruker* em relação aos resultados que constam da **Tabela 6**.

3.2. Calibração e validação de modelos

3.2.1. Óleo de soja refinado

Para o óleo de soja refinado os parâmetros para os quais se procedeu ao desenvolvimento de um modelo foram os ácidos gordos (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3), índice de iodo, índice de anisidina e absorvâncias no ultravioleta (K230 e K270). Para tal, foram analisadas 89 amostras e os espectros NIR foram obtidos em duplicado, perfazendo um total de 178 espectros NIR.

Na **Figura 7** são apresentados os espectros do óleo de soja refinado e as regiões (11500 – 6000 e 5570 – 4500 cm^{-1}) consideradas de interesse para o desenvolvimento dos modelos de calibração.

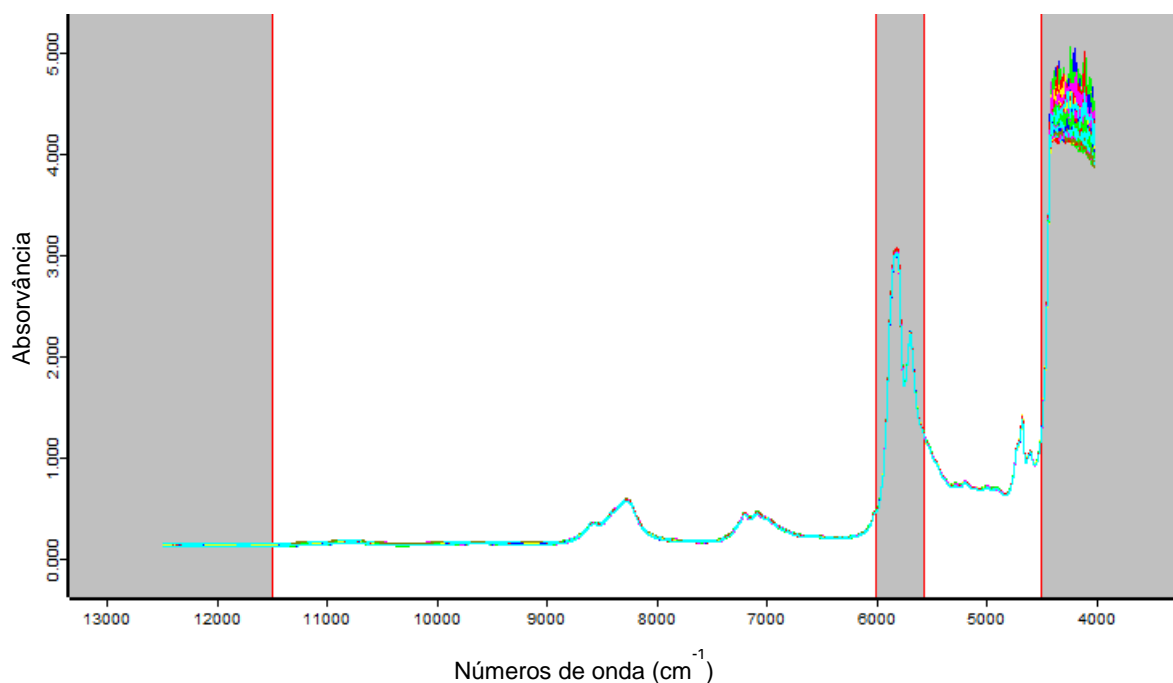


Figura 7 - Espectros NIR referentes às amostras de óleo de soja refinado e respectiva região espectral de interesse (assinalada a branco) para a determinação dos parâmetros em estudo.

Foram desenvolvidos os modelos de calibração para cada parâmetro, encontrando-se representados na **Tabela 11** os resultados obtidos para a validação cruzada, incluindo a região espectral e pré-tratamento seleccionados que geraram os melhores resultados.

Tabela 11 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada dos parâmetros C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, índice de iodo, índice de anisidina, K230 e K270 para o óleo de soja refinado.

Parâmetro	N.º amostras	Pré Trat.	Intervalo (cm ⁻¹)	Gama de calibração	r ²	RMSECV	RPD	Rk
C16:0 (%)	44	1st Der + SNV	11532,9 - 8998,8 5446,3 - 4466,6	9,74 – 11,05	0,20	0,16	1,1	2
C16:1 (%)	45	SNV	5446,3 - 4478,2	0,074 – 0,095	0,12	0,005	1,1	2
C18:0 (%)	55	1st Der + SNV	9403,8 - 6098,2	2,85 – 4,45	0,96	0,06	5,1	10
C18:1 (%)	60	1st Der + MSC	9403,8 - 7498,3 5450,2 - 4597,7	21,43 – 27,23	0,99	0,10	10,5	10
C18:2 (%)	65	1st Der + SNV	11544,5 - 8967,9 5446,3 - 4478,2	49,67 – 53,95	0,96	0,19	5,3	8
C18:3 (%)	65	1st Der + SNV	9403,8 - 7498,3 5450,2 - 4597,7	5,59 – 7,48	0,98	0,06	6,9	10
Índ.iodo	62	SNV	5446,3 - 4493,6	125,9 – 133,2	0,98	0,26	6,8	7
Índ.anisidina	65	1st Der + SNV	8987,2 - 6102	0,3 – 3,1	0,21	0,47	1,1	1
K230	65	MSC	9002,6 - 5970,9	3,8 – 5,0	0,69	0,10	1,8	12
K270	56	1stDer	7494,5 - 5986,3	1,1 – 2,8	0,96	0,07	5,3	16

Para avaliar a capacidade de predição dos modelos procedeu-se à validação externa. Na **Tabela 12** são apresentados os resultados obtidos para a validação externa dos modelos de calibração desenvolvidos.

Tabela 12 - Resultados estatísticos obtidos na validação externa dos parâmetros C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, índice de iodo, índice de anisidina, K230 e K270 para o óleo de soja refinado.

Parâmetro	N. ^o amostras	r ²	RMSEP	RPD
C16:0 (%)	41	0,23	0,13	1,1
C16:1 (%)	44	0,31	0,004	1,2
C18:0 (%)	29	0,96	0,08	5,4
C18:1 (%)	20	1,00	0,09	14,6
C18:2 (%)	19	0,98	0,16	7,5
C18:3 (%)	21	0,99	0,06	9,0
Índ.iodo	20	0,98	0,26	8,0
Índ. anisidina	21	0,13	0,60	1,1
K230	21	-	0,30	0,78
K270	21	0,93	0,12	3,8

3.2.1.1. Ácido palmítico (C16:0)

O modelo de calibração desenvolvido para o C16:0 apresentou uma fraca capacidade preditiva ($r^2 = 0,20$) e um valor de RMSECV de 0,16% (**Tabela 11**). Na validação externa do modelo (**Tabela 12**) obteve-se um baixo valor de r^2 (0,23), o que mostra a fraca correlação dos resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 8**). O valor de RMSEP obtido foi de 0,09%, ligeiramente inferior ao erro obtido na validação cruzada, e o valor de RPD foi de 1,7, valor muito reduzido que indica que o modelo não é adequado para predição deste parâmetro.

Comparando os resultados estatísticos da validação externa deste modelo com o modelo genérico ($r^2 = 0,39$; RMSEP = 0,17%; RPD = 1,2) (**Tabela 7**), verifica-se que o modelo genérico apresenta melhor correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência, contudo, nenhum dos modelos tem capacidade preditiva para este parâmetro.

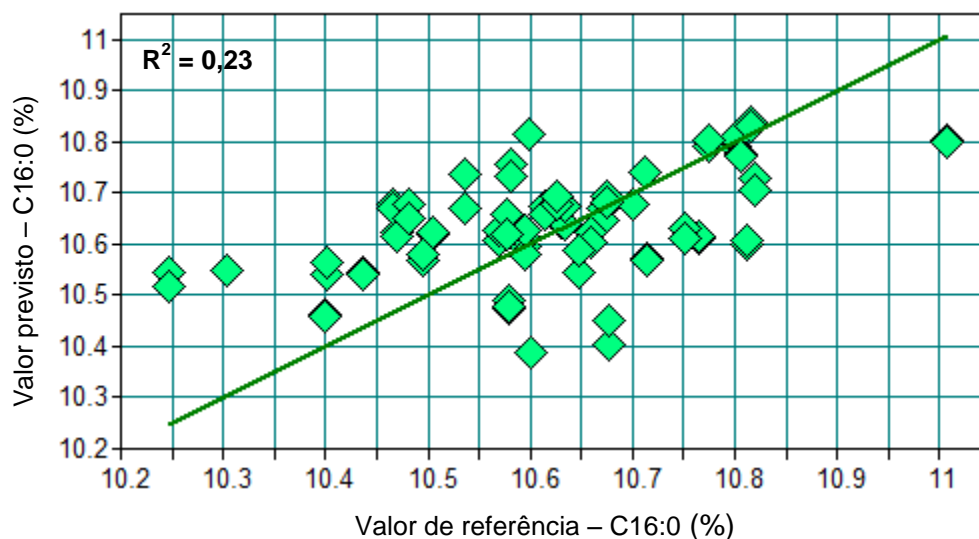


Figura 8 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:0 (%) para o óleo de soja refinado.

3.2.1.2. Ácido palmitoleico (C16:1)

No caso do parâmetro C16:1, obteve-se um r^2 muito reduzido na validação cruzada (0,12), o que demonstra a fraca capacidade preditiva do modelo, e um valor de RMSECV de 0,005% (**Tabela 11**). Na validação externa do modelo (**Tabela 12**) obteve-se um valor de r^2 de 0,31, valor superior ao obtido na validação cruzada, porém trata-se de um valor muito baixo que evidencia a fraca correlação entre os dados (**Figura 9**), e o valor de RMSECV foi de 0,004%. A fraca correlação existente entre os resultados e o baixo valor de RPD (1,2) confirmam que o modelo é desajustado para predição deste parâmetro.

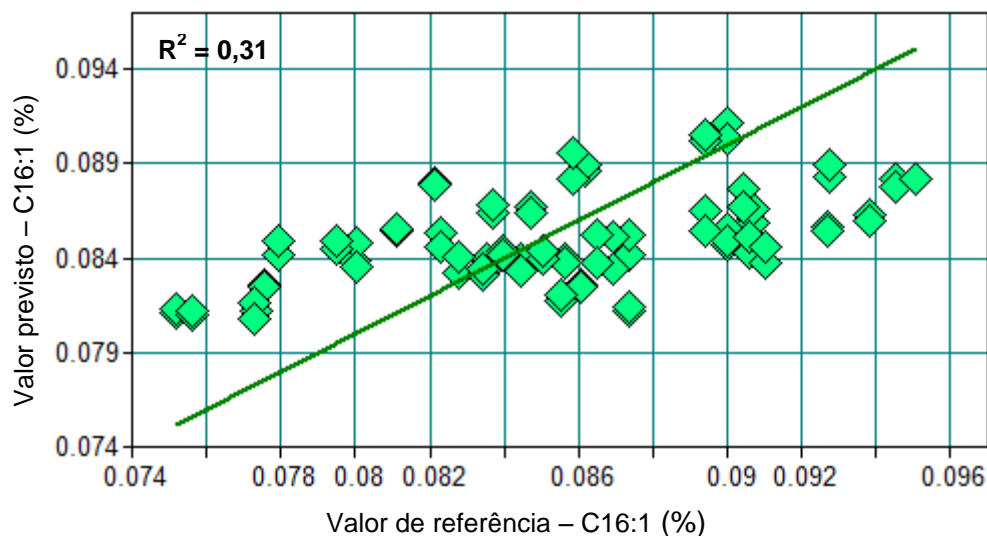


Figura 9 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:1 (%) para o óleo de soja refinado.

3.2.1.3. Ácido esteárico (C18:0)

No caso do parâmetro C18:0, os resultados obtidos na validação cruzada e validação externa foram muito semelhantes (**Tabelas 11 e 12**). Em ambos os casos obteve-se um r^2 elevado (0,96), o que denota a boa correlação existente entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 10**). O valor de RPD obtido na validação externa (5,4) significa que o modelo pode ser utilizado no controlo de qualidade (RPD > 5). O RMSECV foi de 0,06%, enquanto o RMSEP foi de 0,08%, não se verificando uma diferença significativa.

O modelo de calibração desenvolvido apenas com amostras de óleo de soja refinado apresentou melhores resultados estatísticos em comparação com o modelo genérico. Na validação externa do modelo genérico para este mesmo parâmetro, apesar de apresentar uma boa correlação entre os dados ($r^2 = 0,81$), obteve-se um valor de RMSEP de 0,23% e um baixo valor de RPD (1,5) (**Tabela 7**).

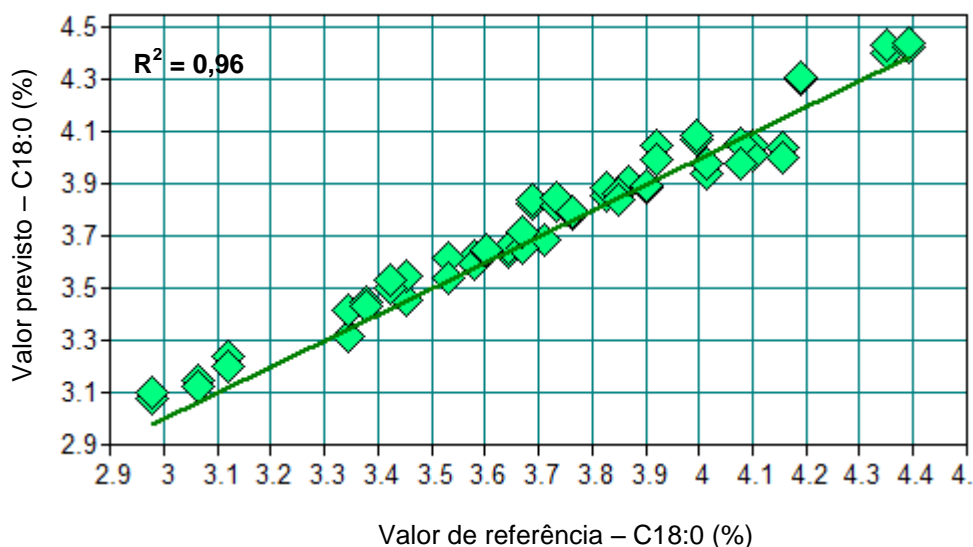


Figura 10 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:0 (%) para o óleo de soja refinado.

3.2.1.4. Ácido oleico (C18:1)

Tanto na validação cruzada como na validação externa referente ao C18:1 (**Tabelas 11 e 12**) obtiveram-se bons resultados estatísticos. Na validação cruzada obteve-se um r^2 de 0,99, o que indica que o modelo tem uma boa capacidade preditiva, e o valor de RPD foi de 10,5. Na validação externa obteve-se um r^2 de 1, revelando uma boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 11**), e o valor de RPD obtido foi de 13,7, indicando que este modelo pode ser utilizado no controle de qualidade ($RPD > 5$). O valor de RMSECV e do RMSEP foi de 0,10 e 0,09%, respectivamente.

Verifica-se também que a validação externa deste modelo apresenta melhores resultados estatísticos quando comparado com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,97$; $RMSEP = 0,26\%$; $RPD = 4,6$) (**Tabela 7**), todavia, verifica-se que o modelo genérico também é adequado para predição deste parâmetro.

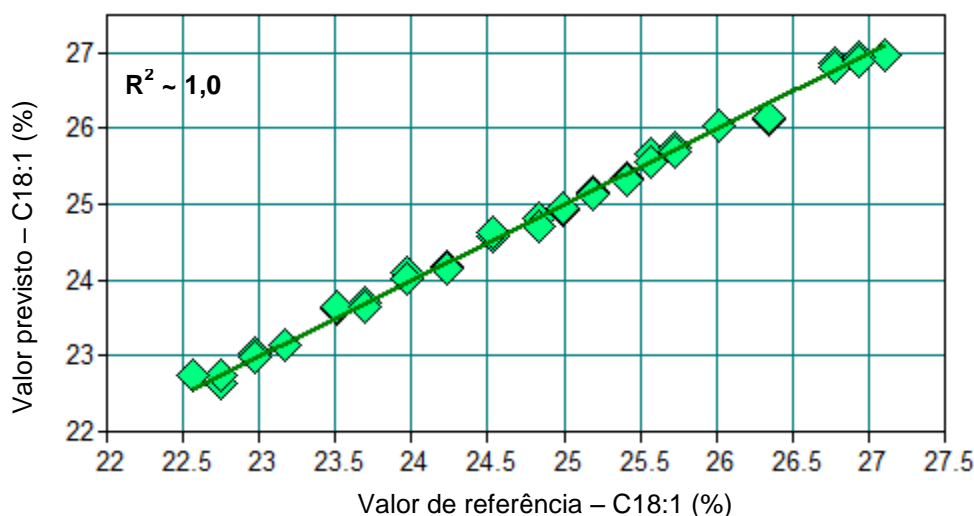


Figura 11 – Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:1 (%) para o óleo de soja refinado.

3.2.1.5. Ácido linoleico (C18:2)

No caso do parâmetro C18:2, verificou-se uma melhoria dos resultados na validação externa, tendo-se obtido um menor erro (RMSEP = 0,16 %) e um valor de r^2 (0,98) e RPD (7,5) mais elevados (**Tabela 12**) comparativamente à validação cruzada ($r^2 = 0,96$; RMSECV = 0,19%; RPD = 5,3) (**Tabela 11**). O elevado valor de r^2 obtido na validação externa indica uma boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 12**). Este modelo é adequado para utilização no controlo de qualidade, uma vez que apresenta um RPD superior a 5.

Verifica-se também que a validação externa deste modelo apresenta melhores resultados estatísticos quando comparado com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,93$; RMSEP = 0,37%; RPD = 2,9) (**Tabela 7**), apresentando estes dois modelos capacidade preditiva para o parâmetro em questão.

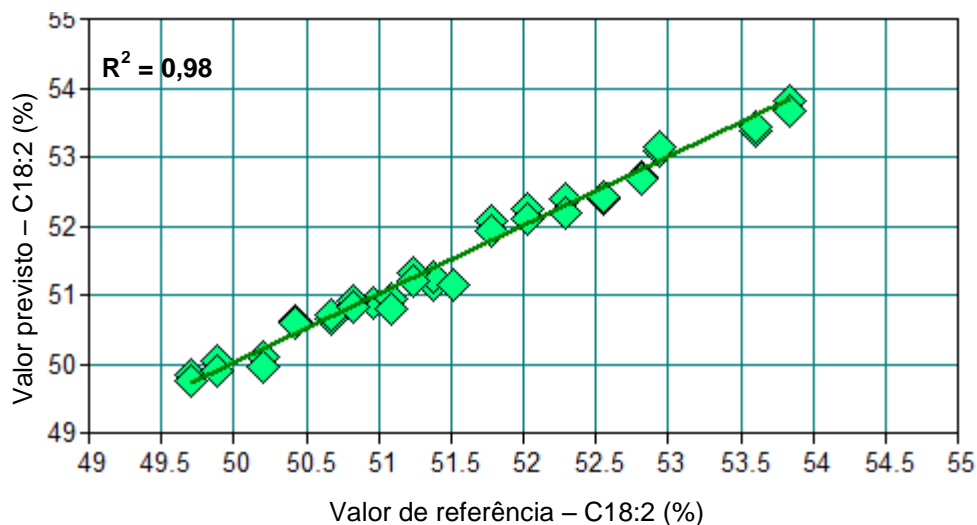


Figura 12 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:2 (%) para o óleo de soja refinado.

3.2.1.6. Ácido linolénico (C18:3)

O parâmetro C18:3 obteve na validação externa um valor de r^2 de 0,99 e um valor de RPD de 9 (**Tabela 12**), valores superiores aos obtidos na validação cruzada ($r^2 = 0,98$; RPD = 6,9) (**Tabela 11**). Estes valores comprovam a boa correlação existente entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 13**), o que mostra que este modelo é adequado para a predição deste parâmetro, podendo ser utilizado no controlo de qualidade. Tanto o valor de RMSECV como o valor de RMSEP foi de 0,06%.

Apesar deste modelo e do modelo genérico apresentarem uma boa capacidade preditiva, este modelo obteve melhores resultados estatísticos na validação externa comparativamente ao modelo genérico ($r^2 = 0,97$; RMSEP = 0,10%; RPD = 4,6) (**Tabela 7**).

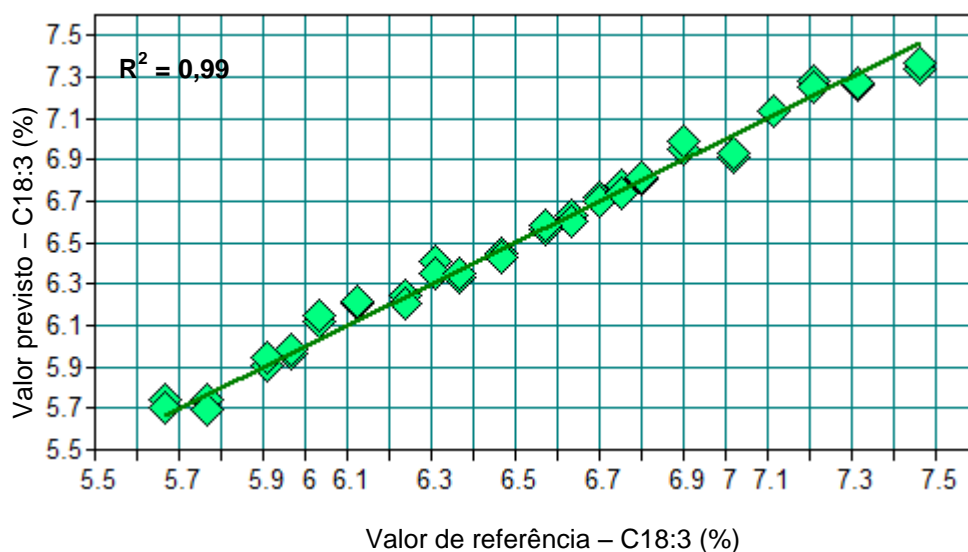


Figura 13 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:3 (%) para o óleo de soja refinado.

3.2.1.7. Índice de iodo

De acordo com os dados das **Tabelas 11** e **12**, verifica-se que o índice de iodo apresenta uma boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 14**), dado o elevado valor de r^2 (0,98) obtido na validação externa. O valor de RMSECV obtido foi o mesmo que o RMSEP (0,26), tendo-se verificado um aumento do valor de RPD da validação cruzada (6,8) para a validação externa (8). O elevado valor de r^2 e RPD confirmam a aplicabilidade deste modelo na predição deste parâmetro, que pode ser utilizado no controlo de qualidade.

Apesar deste modelo e do modelo genérico apresentarem uma boa capacidade preditiva, este modelo obteve melhores resultados estatísticos na validação externa comparativamente ao modelo genérico ($r^2 = 0,91$; RMSEP = 0,61; RPD = 3) (**Tabela 7**).

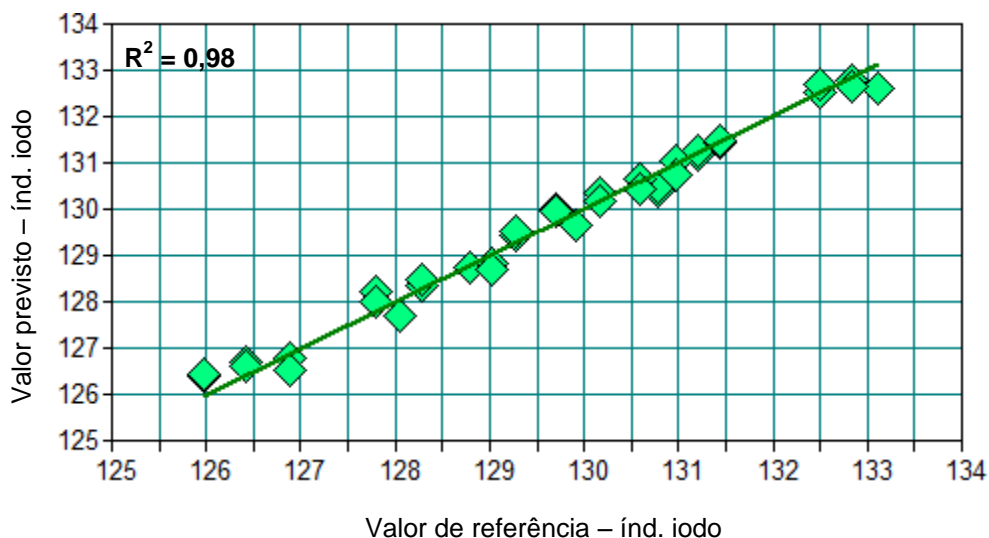


Figura 14 – Validação externa do modelo referente ao parâmetro índice de iodo para o óleo de soja refinado.

3.2.1.8. Índice de anisidina

Na validação cruzada ($r^2 = 0,21$; RMSECV = 0,47; RPD = 1,1) (**Tabela 11**) obtiveram-se melhores resultados comparativamente à validação externa ($r^2 = 0,13$; RMSEP = 0,60; RPD = 1,1) (**Tabela 12**), tendo-se verificado uma diminuição do r^2 bem como do RPD e um aumento do erro. Este modelo apresenta uma fraca capacidade preditiva, verificando-se uma fraca correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 15**), não sendo adequado para predição deste parâmetro.

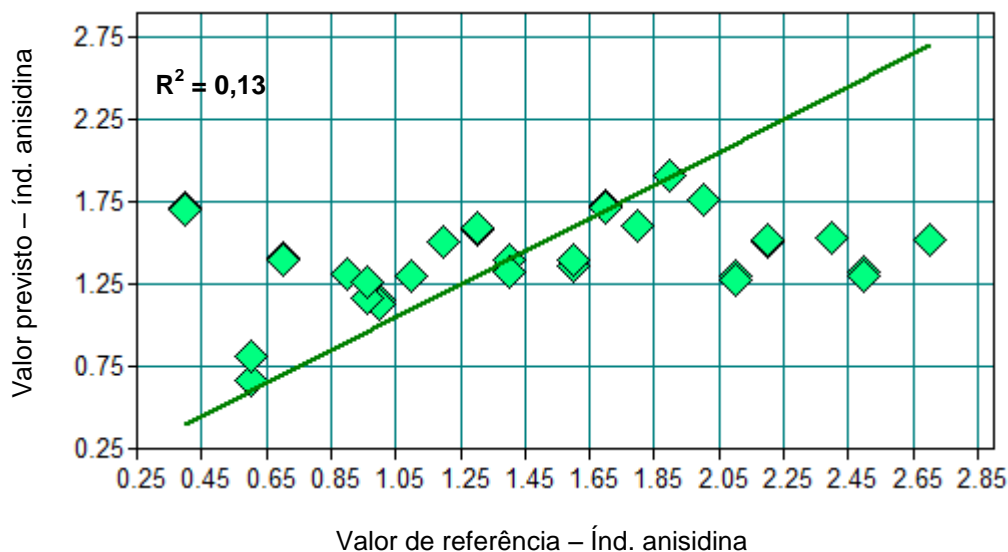


Figura 15 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro índice de anisidina para o óleo de soja refinado.

3.2.1.9. Absorvância no ultravioleta a 230 nm (K230)

O modelo de calibração resultante para o K230 apresentou um r^2 de 0,69, o que revela uma fraca capacidade preditiva, um valor de RPD de 1,8 e um valor de RMSECV de 0,10 (**Tabela 11**). Os resultados obtidos na validação cruzada diferem significativamente dos resultados obtidos na validação externa (**Tabela 12**), tendo-se verificado que não existe correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 17**). O valor de RMSEP foi de 0,30, o triplo do valor obtido na validação cruzada, e o valor de RPD obtido na validação externa foi de apenas 0,78. Este modelo não é adequado para predição deste parâmetro.

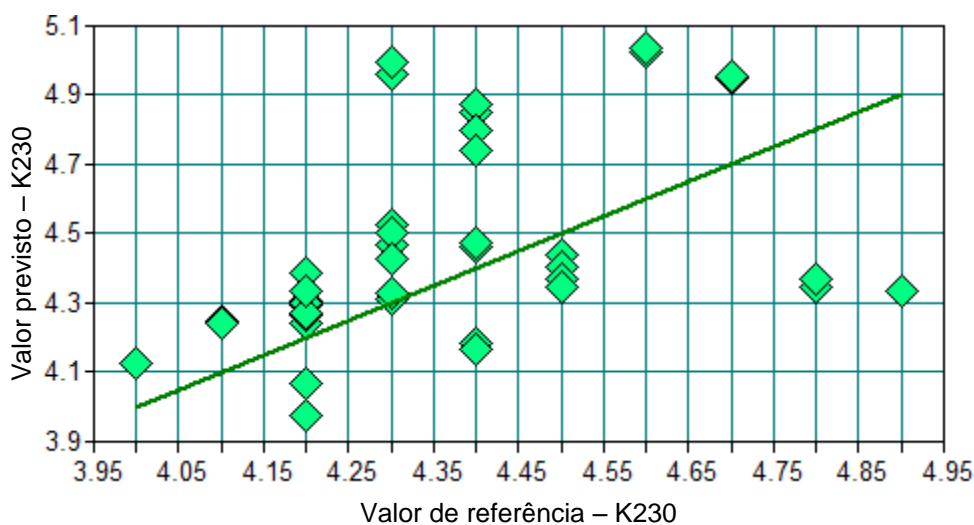


Figura 16 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K230 para o óleo de soja refinado.

3.2.1.10. Absorvância no ultravioleta a 270 nm (K270)

Com base na análise das **Tabelas 11** e **12** relativamente ao K270, verifica-se que em ambas as validações obteve-se um r^2 elevado ($r^2_{\text{val.cruzada}} = 0,96$; $r^2_{\text{val.externa}} = 0,92$), demonstrando uma elevada correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 17**). O valor de RMSEP foi de 0,12, superior ao valor de RMSECV que foi de 0,07. Verifica-se também uma diminuição do RPD, que na validação cruzada foi de 5,3 e na validação externa foi de 3,8. Este modelo apresenta uma boa capacidade preditiva, podendo ser utilizado na predição deste parâmetro.

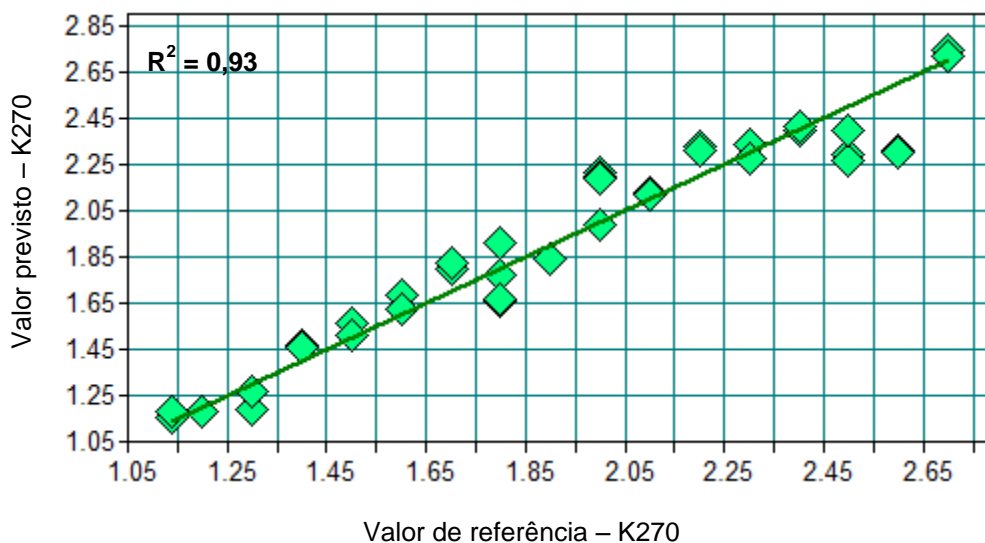


Figura 17 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K270 para o óleo de soja refinado.

3.2.2. Óleo de girassol refinado

Para o óleo de girassol refinado os parâmetros para os quais se procedeu ao desenvolvimento de um modelo foram os ácidos gordos (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3), índice de iodo, índice de anisidina e absorvâncias no ultravioleta (K230 e K270). Para tal, foram analisadas 209 amostras e os espectros NIR foram obtidos em duplicado, perfazendo um total de 418 espectros NIR.

A região espectral de interesse foi considerada a mesma utilizada para o óleo de soja refinado (11500 – 6000 e 5570 – 4500 cm^{-1}).

Foram desenvolvidos os modelos de calibração para cada parâmetro, encontrando-se representados na **Tabela 13** os resultados obtidos para a validação cruzada, incluindo a região espectral e pré-tratamento seleccionados que geraram os melhores resultados.

Tabela 13 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada dos parâmetros C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, índice de iodo, índice de anisidina, K230 e K270 para o óleo de girassol refinado.

Parâmetro	N.º amostras	Pré. Trat.	Intervalo (cm ⁻¹)	Gama de calibração	r ²	RMSECV	RPD	Rk
C16:0 (%)	114	1stDer + SNV	9411,5 - 6013,3 5450,2 - 4536	5,84 – 7,59	0,81	0,08	2,3	7
C16:1 (%)	101	SNV	9018 - 6044,2 5446,3 - 4478,2	0,074 – 0,14	0,90	0,004	3,2	10
C18:0 (%)	139	1stDer + SNV	9403,8 - 6044,2 5446,3 - 4948,7	2,99 – 3,70	0,94	0,04	4,1	12
C18:1 (%)	145	2ndDer	8451 - 7498,3 4971,9 - 4493,6	25,84 – 31,13	0,98	0,09	6,4	7
C18:2 (%)	143	1stDer + SNV	9403,8 - 6098,2	56,29 – 64,72	0,96	0,17	5,1	10
C18:3 (%)	139	1stDer + MSC	9403,8 - 6098,2 5450,2 - 4597,7	0,02 – 0,21	0,68	0,007	1,8	13
Índ.iodo	137	1stDer + SNV	9403,8 - 6098,2	125,5 – 134,7	0,88	0,25	2,9	9
Índ.anisidina	101	2ndDer	9403,8 – 6013,3	2,3 – 8,4	0,22	0,64	1,1	7
K230	127	SLS	7502,2 - 6098,2 5446,3 - 4493,6	2,3 – 5,9	0,81	0,13	2,3	11
K270	126	1stDer + MSC	9403,8 - 6098,2 5446,3 - 4509	0,8 – 4,0	0,80	0,12	2,2	12

Na **Tabela 14** são apresentados os resultados estatísticos relativos à validação externa destes parâmetros.

Tabela 14 - Resultados estatísticos obtidos na validação externa dos parâmetros C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, índice de iodo, índice de anisidina, K230 e K270 para o óleo de girassol refinado.

Parâmetro	N.º amostras	r ²	RMSEP (%)	RPD
C16:0 (%)	68	0,84	0,07	2,5
C16:1 (%)	101	0,86	0,05	2,7
C18:0 (%)	55	0,89	0,06	3,1
C18:1 (%)	54	0,98	0,08	7,2
C18:2 (%)	57	0,93	0,22	3,7
C18:3 (%)	50	0,63	0,01	1,8
Índ. iodo	54	0,90	0,28	3,1
Índ. anisidina	101	-	0,78	0,9
K230	50	0,88	0,12	2,9
K270	73	0,66	0,18	1,7

3.2.2.1. Ácido palmítico (C16:0)

De acordo com a análise das **Tabelas 13 e 14** relativamente ao C16:0, verifica-se que os resultados obtidos na validação cruzada e validação externa são muito semelhantes. O r^2 obtido na validação cruzada foi de 0,81, indicando uma boa capacidade preditiva, e um valor de RMSECV de 0,08%. Na validação externa obteve-se um r^2 de 0,84, expressando uma boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 18**), um valor de RMSEP de 0,07% e o valor de RPD obtido foi de 2,5. Deste modo, pode-se afirmar que este modelo apresenta uma boa capacidade preditiva, podendo ser utilizado para a predição dos resultados do parâmetro em questão.

Comparando os resultados estatísticos da validação externa deste modelo com os resultados estatísticos obtidos na validação externa do modelo genérico para este parâmetro, verifica-se que o modelo genérico não apresenta capacidade preditiva para o C16:0 ($r^2 = 0,39$; RMSEP = 0,29%; RPD = 0,8) (**Tabela 8**).

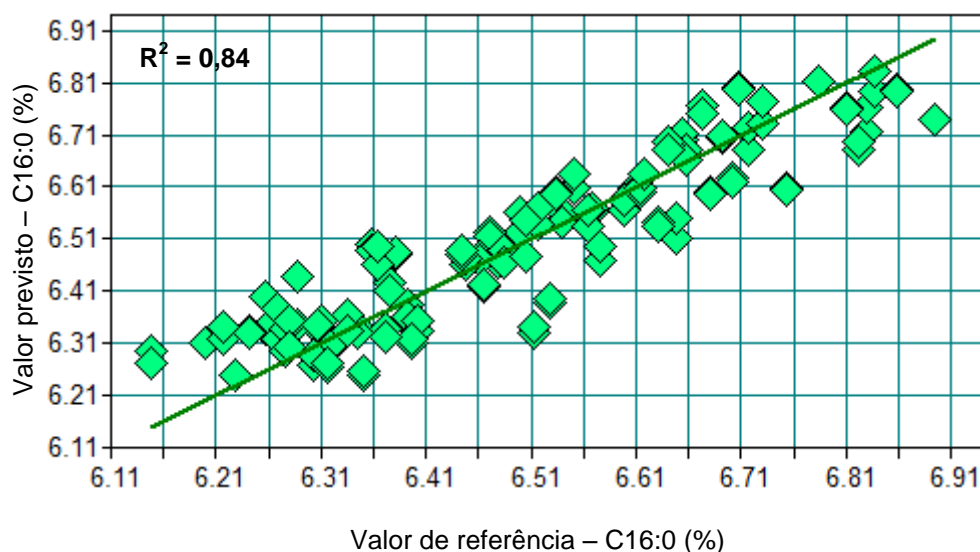


Figura 18 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:0 (%) para o óleo de girassol refinado.

3.2.2.2. Ácido palmitoleico (C16:1)

De acordo com os dados das **Tabelas 13 e 14**, na validação cruzada obteve-se um valor de r^2 de 0,90, demonstrando que o modelo tem uma boa capacidade preditiva, e

um valor de RMSECV de 0,004%. Na validação externa o r^2 obtido foi de 0,86 e o valor de RMSEP foi de 0,05%, valor significativamente superior ao erro obtido na validação cruzada. O valor de RPD obtido na validação externa foi de 2,7, valor aceitável e que significa que o modelo pode ser utilizado na triagem de amostras. Na **Figura 19** está representada a boa correlação existente entre os resultados obtidos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência. Este modelo de calibração é adequado para predição deste parâmetro.

Comparando os resultados estatísticos da validação externa deste modelo com os do modelo genérico, verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados em relação ao modelo genérico ($r^2 = 0,71$; RMSEP = 0,02%; RPD = 0,8) (**Tabela 8**).

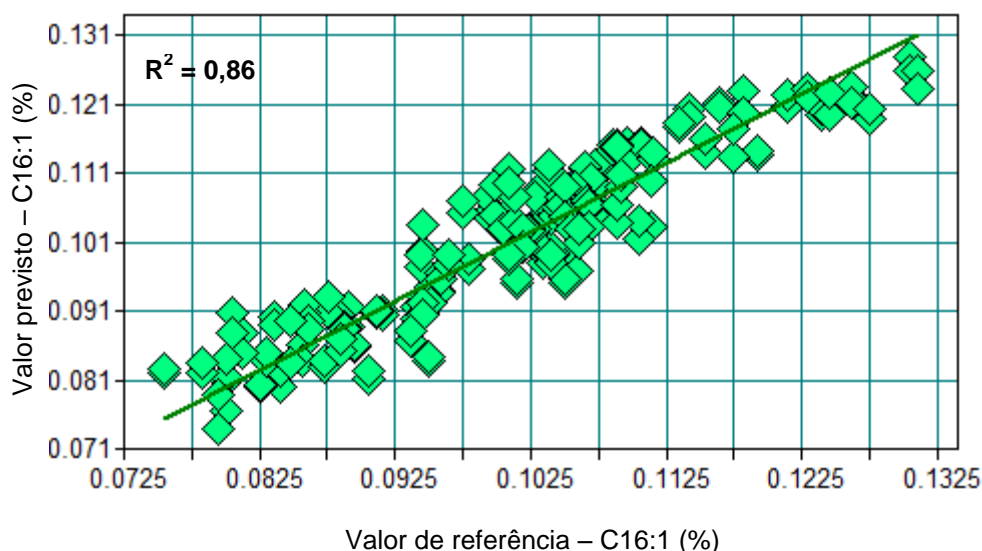


Figura 19 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:1 (%) para o óleo de girassol refinado.

3.2.2.3. Ácido esteárico (C18:0)

De acordo com os dados das **Tabelas 13 e 14**, o modelo de calibração desenvolvido para o C18:0, apesar de ter apresentado melhores resultados na validação cruzada ($r^2 = 0,94$; RMSECV = 0,04%; RPD = 4,1), na validação externa do modelo obteve-se igualmente um valor de r^2 elevado (0,90) e um valor de RPD de 3,14, o que confirma que o modelo é adequado para a predição deste parâmetro, e apresenta uma boa

correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 20**).

Comparando os resultados estatísticos da validação externa deste modelo com os do modelo genérico, verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados em relação ao modelo genérico ($r^2 = 0,33$; RMSEP = 0,19%; RPD = 0,9) (**Tabela 8**), o qual apresenta uma fraca capacidade preditiva, não sendo adequado para predição deste parâmetro.

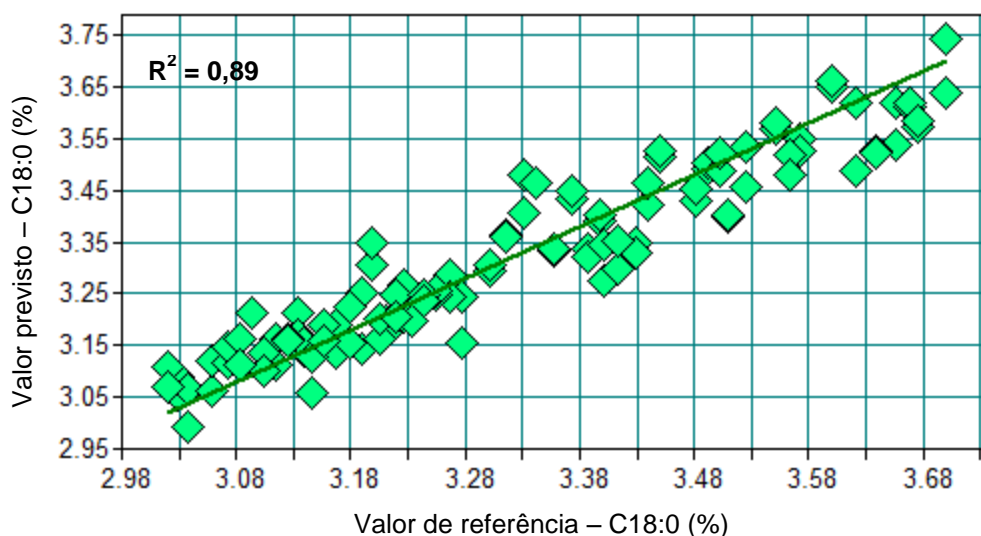


Figura 20 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:0 (%) para o óleo de girassol refinado.

3.2.2.4. Ácido oleico (C18:1)

De acordo com a análise das **Tabelas 13** e **14**, verifica-se que tanto na validação cruzada como na validação externa se obteve um valor de r^2 de 0,98, o que significa que existe uma boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 21**). Para além disso, verifica-se um aumento do valor de RPD de 6,4 (validação cruzada) para 7,2 (validação externa) e um valor de RMSEP de 0,08%, ligeiramente inferior ao RMSECV (0,09%). Este modelo revela uma boa capacidade preditiva para este parâmetro.

Comparando os resultados estatísticos deste modelo com o modelo genérico ($r^2 = 0,95$; RMSEP = 0,24%; RPD = 3,1) (**Tabela 8**), verifica-se que ambos os modelos

apresentam uma boa capacidade preditiva, no entanto, este modelo apresenta melhores resultados.

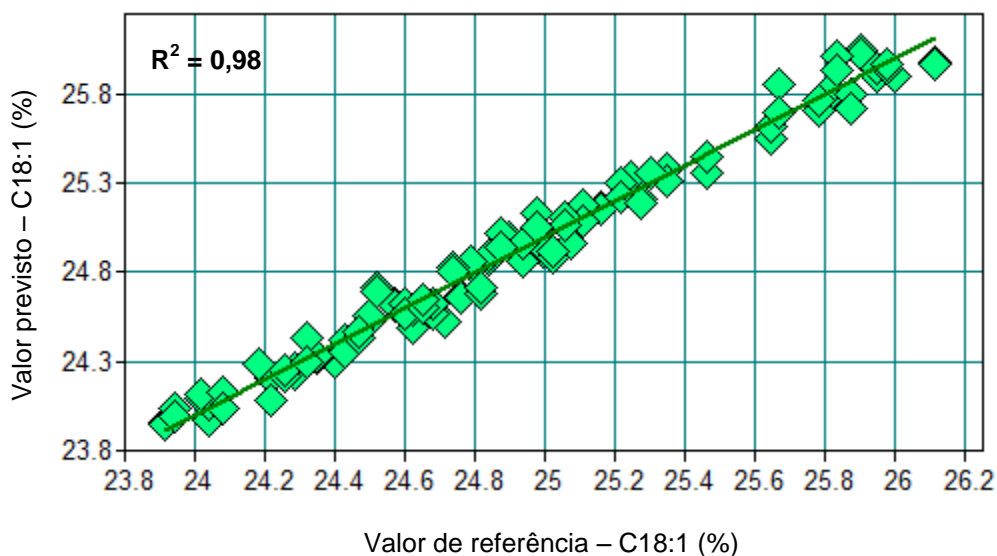


Figura 21 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:1 (%) para o óleo de girassol refinado.

3.2.2.5. Ácido linoleico (C18:2)

O modelo de calibração resultante para a quantificação do C18:2 apresentou um r^2 elevado (0,96), mostrando uma boa capacidade preditiva, e um valor de RMSECV de 0,17% (**Tabela 13**). Na validação externa do modelo (**Tabela 14**), o valor de RMSEP obtido foi de 0,22% e obteve-se um r^2 de 0,93, evidenciando uma boa correlação entre os dados (**Figura 22**), e um valor de RPD de 3,72, o que indica que o modelo é adequado para predição deste parâmetro.

Comparando os resultados estatísticos deste modelo com os do modelo genérico ($r^2 = 0,89$; RMSEP = 0,46%; RPD = 1,9) (**Tabela 8**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos.

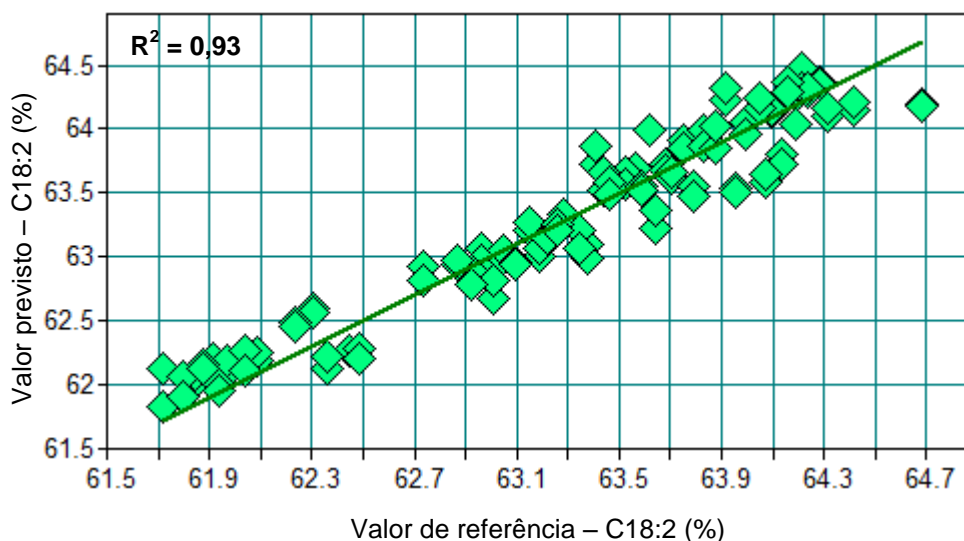


Figura 22 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:2 (%) para o óleo de girassol refinado.

3.2.2.6. Ácido linolénico (C18:3)

Para a quantificação do C18:3, o modelo de calibração resultante mostrou uma fraca capacidade preditiva ($r^2 = 0,68$) e um valor de RMSECV de 0,007% (**Tabela 13**). Na validação externa obteve-se um r^2 de apenas 0,63, um RPD de 1,8 e o valor de RMSEP obtido foi de 0,009% (**Tabela 14**). Na **Figura 23** está representada a correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência. Com base nos resultados obtidos em ambas as validações pode-se afirmar que o modelo não é adequado para predição deste parâmetro.

Comparando os resultados estatísticos da validação externa deste modelo com os do modelo genérico para este parâmetro, verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados em relação ao modelo genérico ($r^2 = 0,20$; RMSEP = 0,04%; RPD = 0,6) (**Tabela 8**), no entanto, nenhum dos modelos apresenta capacidade preditiva para este parâmetro.

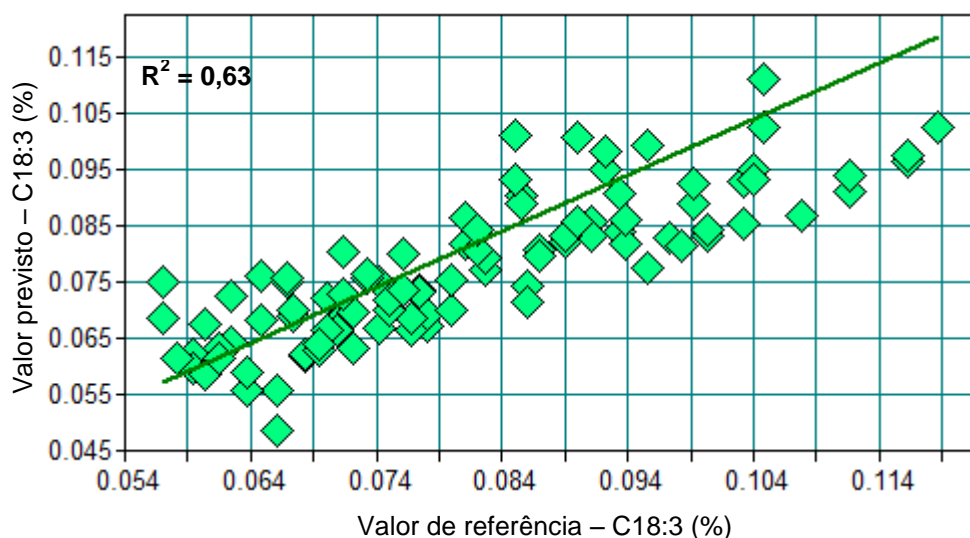


Figura 23 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:3 (%) para o óleo de girassol refinado.

3.2.2.7. Índice de iodo

O modelo da calibração relativo ao índice de iodo apresenta uma boa capacidade predita ($r^2 = 0,88$) e o valor de RMSECV obtido foi de 0,25 (**Tabela 13**). Na validação externa do modelo (**Tabela 14**) obteve-se um valor de RMSEP (0,28), ligeiramente superior ao RMSECV (0,25), um valor de r^2 de 0,90, o que indica uma boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 24**), e um valor de RPD de 3,1. Dado o elevado valor de r^2 obtido na validação externa e o valor de RPD ($\geq 2,5$), pode-se concluir que este modelo apresenta uma boa capacidade preditiva para este parâmetro.

Comparando os resultados estatísticos da validação externa deste modelo com os do modelo genérico para este parâmetro verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos em relação ao modelo genérico ($r^2 = 0,58$; RMSEP = 0,69; RPD = 1,2) (**Tabela 8**), o qual apresenta uma fraca capacidade preditiva face aos resultados obtidos.

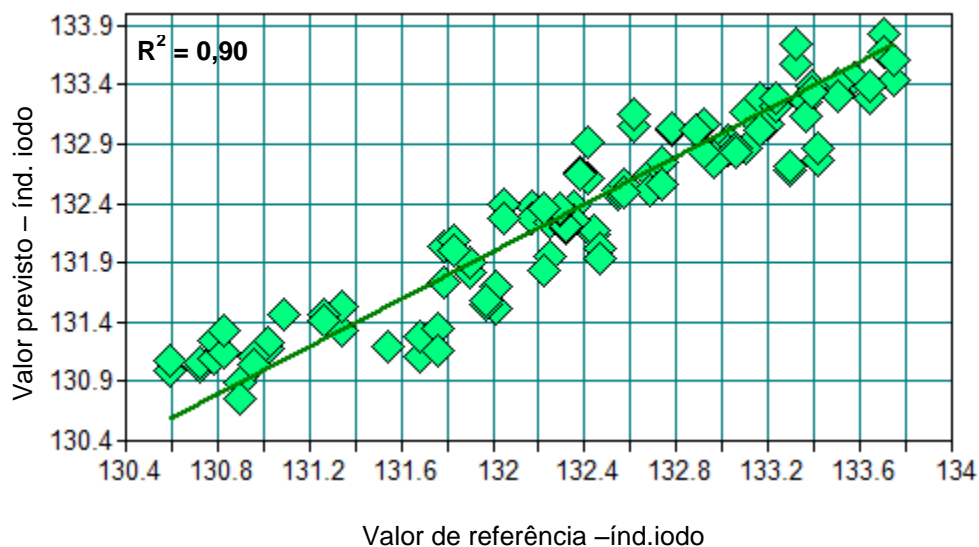


Figura 24 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro índice de iodo para o óleo de girassol refinado.

3.2.2.8. Índice de anisidina

O modelo de calibração desenvolvido para o índice de anisidina não apresenta qualquer capacidade preditiva para este parâmetro. Na validação cruzada obteve-se um r^2 de 0,22, valor considerado reduzido, e um RPD de apenas 1,1 (**Tabela 13**). Na validação externa do modelo (**Tabela 14**) verificou-se que não existe correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 25**). O valor de RPD, que avalia a *performance* do modelo, foi de 0,9, indicando que o modelo é desajustado para predição deste parâmetro.

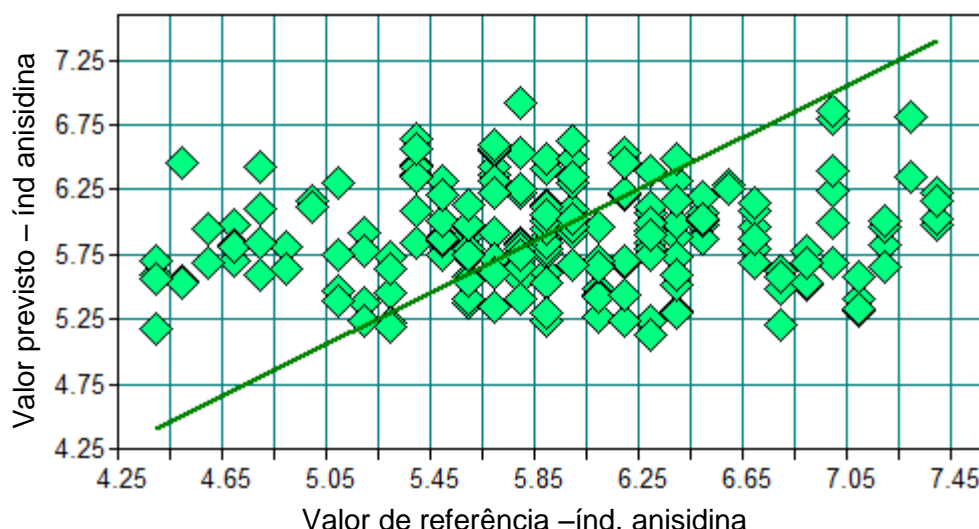


Figura 25 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro índice de anisidina para o óleo de girassol refinado.

3.2.2.9. Absorvância no ultravioleta a 230 nm (K230)

O modelo de calibração desenvolvido para o K230 apresentou uma boa capacidade preditiva, dado o elevado valor de r^2 (0,81), e obteve-se um valor de RMSECV de 0,13 (**Tabela 13**). Na validação externa do modelo (**Tabela 14**) obteve-se um r^2 de 0,88, evidenciando uma boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 26**). O valor de RMSEP foi de 0,12 e o valor de RPD foi de 2,9, confirmando uma boa capacidade preditiva deste modelo.

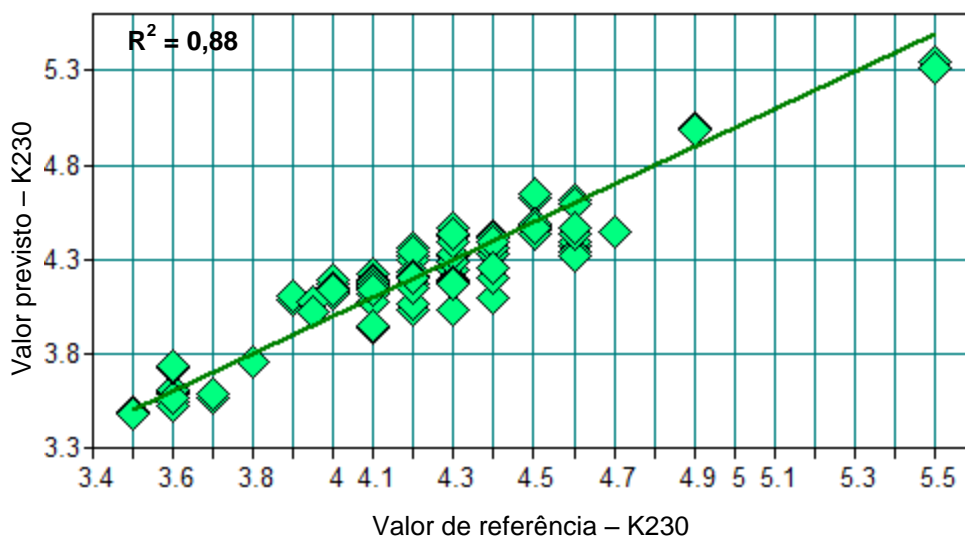


Figura 26 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K230 para o óleo de girassol refinado.

3.2.2.10. Absorvância no ultravioleta a 270 nm (K270)

Relativamente ao parâmetro K270, verifica-se que a validação cruzada (**Tabela 13**) apresenta melhores resultados estatísticos em comparação com a validação externa (**Tabela 14**). Na validação cruzada obteve-se um r^2 de 0,80, o que presumiu que o modelo à partida seria adequado à previsão deste parâmetro, e um valor de RMSECV de 0,12, contudo, verifica-se na validação externa que o modelo não é adequado para a previsão deste parâmetro, uma vez que o r^2 obtido foi de 0,66 e o valor de RPD foi de 1,7, valores considerados reduzidos. O valor de RMSEP obtido foi de 0,18, ligeiramente superior ao RMSECV. Na **Figura 27** está representada a fraca correlação existente entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência.

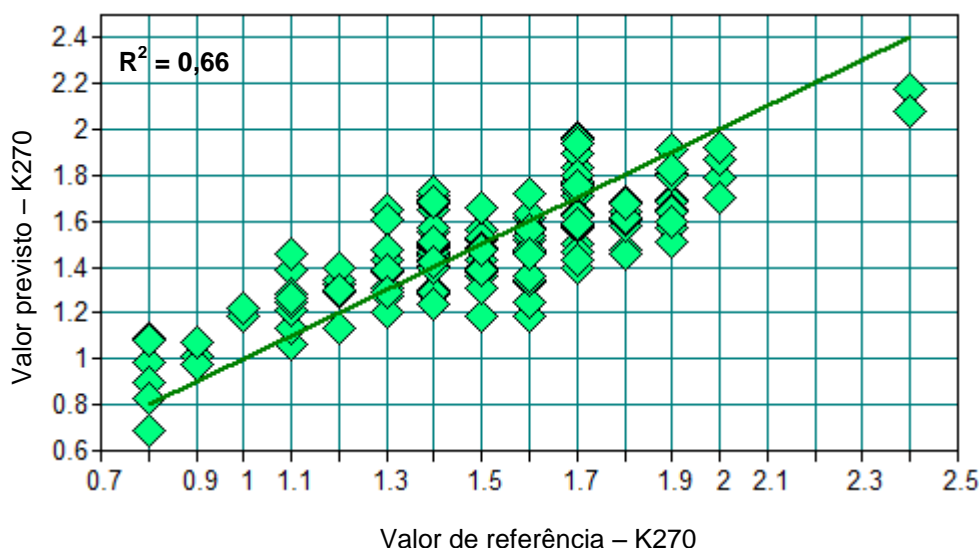


Figura 27 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K270 para o óleo de girassol refinado.

3.2.3. Azeite virgem extra

Para o azeite virgem extra, os parâmetros para os quais se procedeu ao desenvolvimento de um modelo foram os ácidos gordos (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2), β – sitosterol, esteróis totais, absorvância no ultravioleta (K232) e percentagem de eritrodio e uvaol. Para tal, foram analisadas 208 amostras e os espectros NIR foram obtidos em duplicado, perfazendo um total de 416 espectros NIR.

Na **Figura 28** são apresentados os espectros relativos ao azeite virgem extra e as regiões consideradas de interesse ($11500 - 6000$ e $5500 - 4500 \text{ cm}^{-1}$) para o desenvolvimento dos modelos de calibração.

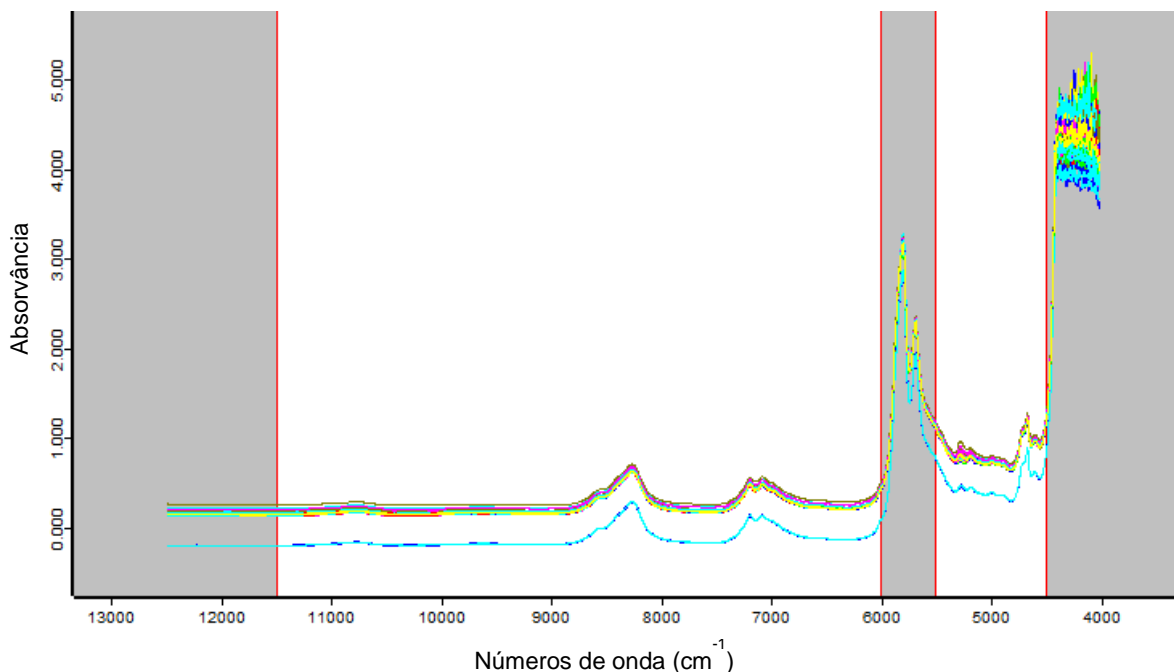


Figura 28 - Espectros NIR referentes às amostras de azeite virgem extra e respectiva região espectral de interesse (assinalada a branco) para a determinação dos parâmetros em estudo.

Foram desenvolvidos os modelos de calibração para cada parâmetro, encontrando-se representados na **Tabela 15** os resultados obtidos para a validação cruzada, incluindo a região espectral e pré-tratamento seleccionados que geraram os melhores resultados.

Tabela 15 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada dos parâmetros referentes à acidez, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, esteróis totais, K232 e eritrodiol e uvaol para o azeite virgem extra.

Parâmetro	N. ^o amostras	Pré-Trat.	Intervalo (cm ⁻¹)	Gama de calibração	r ²	RMSECV	RPD	Rk
Acidez (%)	108	1st Der + SNV	9403,8 - 6098,2 5450,2 - 4597,7	0,16 – 0,38	0,88	0,02	2,9	9
C16:0 (%)	106	1st Der + SNV	9403,8 – 6098,2	9,7 – 19,2	0,91	0,61	3,4	7
C16:1 (%)	104	1st Der + SNV	9403,8 - 7498,3 6102 – 5446,3	0,5 – 2,5	0,95	0,08	4,4	5
C18:0 (%)	115	1st Der	7502,2 - 6098,2 5450,2 - 4597,7	1,6 – 3,7	0,90	0,14	3,2	10
C18:1 (%)	103	1st Der + SNV	9403,8 - 4597,7	60,0 – 78,2	0,96	0,59	4,9	6
C18:2 (%)	93	1st Der + SNV	9403,8 - 6044,2	5,1 – 14,8	0,99	0,13	12,1	8
Esteróis Totais (ppm)	112	MSC	9403,8 - 7498,3	1250 – 1988	0,43	87,4	1,3	4
K232	102	Constant offset elimination	8451 - 7498,3 5025,9 - 4597,7	1,4 – 2,45	0,33	0,08	1,2	7
Eritrodiol + Uvaol (%)	101	1st Der	9403,8 - 7498,3 6102 - 4597,7	1,1 – 2,6	0,57	0,15	1,5	7

Após a validação cruzada, procedeu-se à realização da validação externa para cada modelo (**Tabela 16**).

Tabela 16 - Resultados estatísticos obtidos na validação externa dos parâmetros referentes à acidez, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, esteróis totais, K232 e eritrodiol e uvaol para o azeite virgem extra.

Parâmetro	N. ^o amostras	r ²	RMSEP	RPD
Acidez (%)	66	0,91	0,01	3,4
C16:0 (%)	67	0,87	0,46	2,9
C16:1 (%)	66	0,92	0,09	3,5
C18:0 (%)	62	0,93	0,11	3,7
C18:1 (%)	65	0,94	0,68	4,2
C18:2 (%)	61	0,99	0,16	9,1
Esteróis Totais (ppm)	67	0,41	90,8	1,3
K232	67	0,43	0,09	1,3
Eritrodiol + Uvaol (%)	65	0,41	0,15	1,3

3.2.3.1. Acidez

De acordo com os dados expressos na **Tabela 15**, verifica-se que o modelo de calibração desenvolvido para a acidez apresentou um r^2 de 0,88 e um valor de RMSECV de 0,02%. Na validação externa (**Tabela 16**) obteve-se um r^2 de 0,91, o que demonstra a elevada correlação existente entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 29**), e um valor de RMSEP de 0,01 %, valores próximos dos obtidos na validação cruzada, o que indica que o modelo apresenta uma boa capacidade preditiva. O valor de RPD obtido na validação externa foi de 3,4, valor aceitável e que confirma a adequabilidade deste modelo na predição deste parâmetro.

Verifica-se também que a validação externa deste modelo apresenta melhores resultados estatísticos quando comparado com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,73$; RMSEP = 0,03%; RPD = 1,4) (**Tabela 9**).

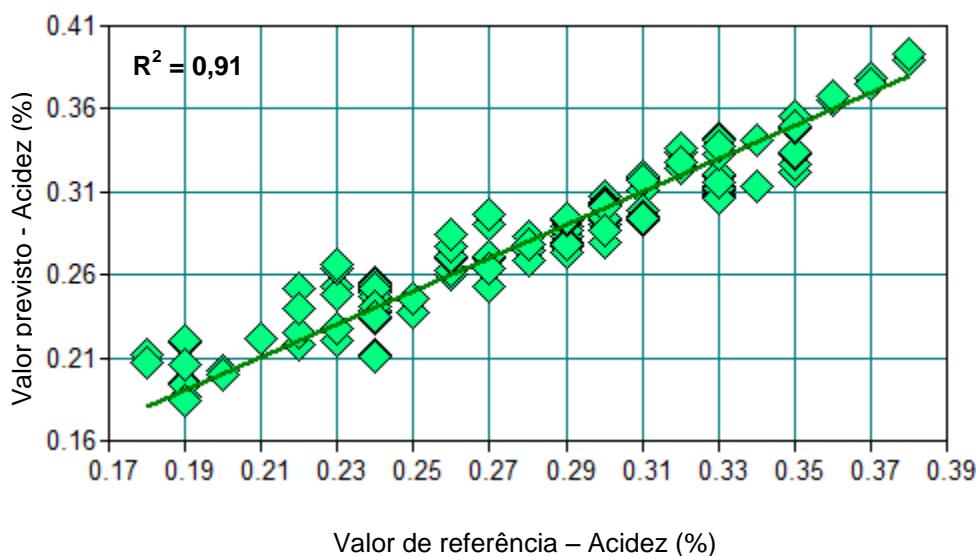


Figura 29 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro acidez (%) para o azeite virgem extra.

3.2.3.2. Ácido palmítico (C16:0)

Com base nos dados da **Tabela 15**, verifica-se que o modelo de calibração para o C16:0 apresenta uma boa capacidade preditiva dado o elevado valor de r^2 (0,91), apresentando um valor de RMSECV de 0,61%. Na validação externa deste modelo (**Tabela 16**) o r^2 foi de 0,87, evidenciando uma boa correlação entre os dados (**Figura**

30), e o valor de RMSEP foi de 0,46%, inferior ao obtido na validação cruzada. O valor de RPD obtido na validação externa foi de 2,9, o que confirma que o modelo tem uma boa capacidade preditiva.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,86$; RMSEP = 0,76; RPD = 2,4) (Tabela 9), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos.

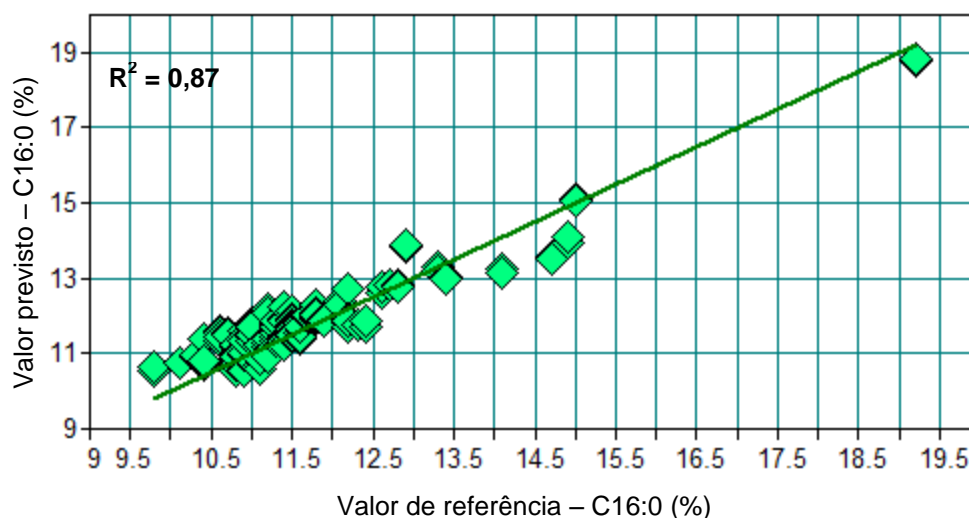


Figura 30 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:0 (%) para o azeite virgem extra.

3.2.3.3. Ácido palmitoleico (C16:1)

Analisando a Tabela 15, verifica-se que o modelo referente ao C16:1 apresenta um r^2 elevado (0,95), um valor de RMSECV de 0,08% e um valor de RPD de 4,4, denotando a boa capacidade preditiva do modelo. Na validação externa do modelo (Tabela 16), obtiveram-se resultados próximos aos da validação cruzada, tendo-se alcançado um r^2 igualmente elevado (0,92), demonstrando a boa correlação entre os dados (Figura 31), um valor de RMSEP de 0,09% e o valor de RPD de 3,5, o que comprova que este modelo tem uma boa capacidade preditiva.

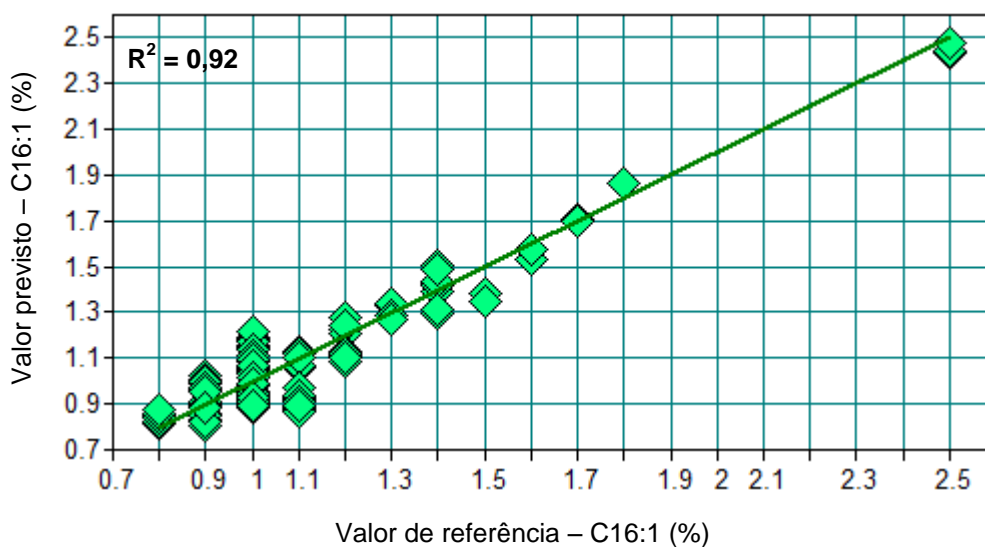


Figura 31 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:1 (%) para o azeite virgem extra.

3.2.3.4. Ácido esteárico (C18:0)

O modelo de calibração resultante para o C18:0 apresentou uma capacidade de predição elevada, dado o valor de r^2 (0,90), e o valor de RMSECV foi de 0,14% (**Tabela 15**). Na validação externa do modelo verifica-se que existe uma boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os obtidos pelo método de referência ($r^2 = 0,93$) (**Figura 32**), o que demonstra que o modelo é adequado à predição deste parâmetro, e o valor aceitável de RPD (3,7) comprova este facto. O valor de RMSEP foi de 0,11% (**Tabela 16**).

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,82$; RMSEP = 0,25%; RPD = 1,8) (**Tabela 9**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos.

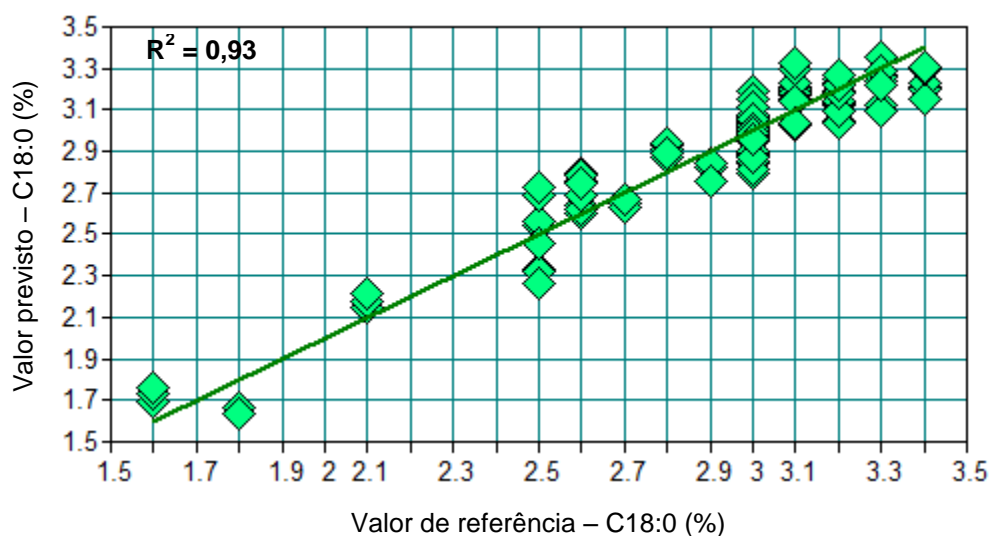


Figura 32 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:0 (%) para o azeite virgem extra.

3.2.3.5. Ácido oleico (C18:1)

O modelo de calibração para o C18:1 apresentou um coeficiente de determinação ($r^2 = 0,96$) e valor de RPD (4,9) elevados, e um valor de RMSECV de 0,59% (**Tabela 15**). A validação externa (**Tabela 16**) do modelo revelou uma boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 33**), bem como um RPD elevado (4,2), o que confirma a boa capacidade preditiva do modelo, e o valor de RMSEP obtido foi de 0,67%.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico, verifica-se que apesar de apresentarem o mesmo r^2 (0,94), o modelo genérico apresenta um RMSEP consideravelmente superior (1,20%) e um valor de RPD mais baixo (3,2) (**Tabela 9**).

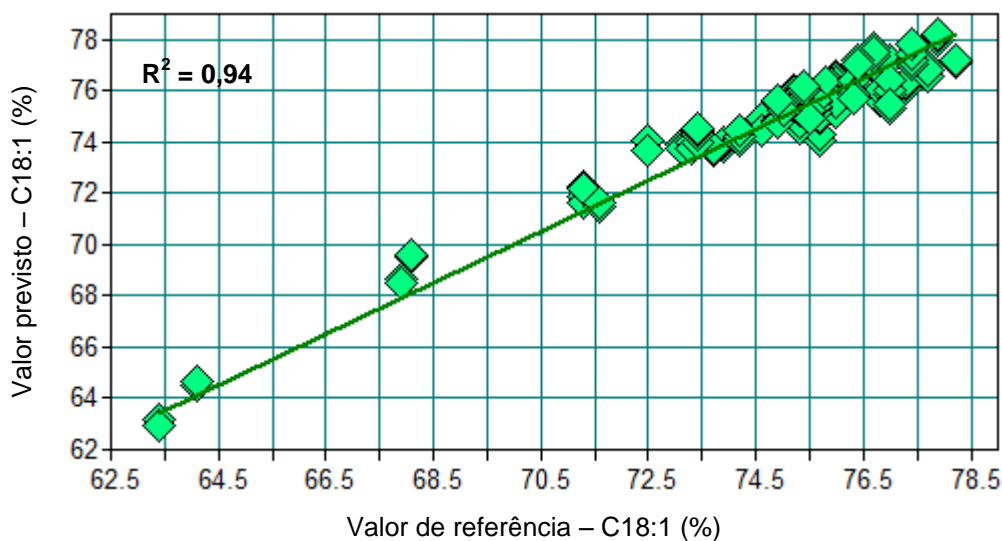


Figura 33 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:1 (%) para o azeite virgem extra.

3.2.3.6. Ácido linoleico (C18:2)

De acordo com a análise da **Tabela 15**, verifica-se que o modelo de calibração desenvolvido para o C18:2 apresenta um elevado coeficiente de determinação ($r^2 = 0,99$), bem como um valor de RPD elevado (12,1). O valor de RMSECV obtido foi de 0,13%. Na validação externa do modelo, com base nos dados **Tabela 16**, verifica-se que o r^2 é igualmente elevado (0,99), o que indica a boa correlação existente entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 34**). O valor obtido de RMSEP foi de 0,16% e o valor de RPD (9,1) embora inferior ao obtido na validação cruzada comprova a capacidade preditiva deste modelo.

Este modelo apresenta melhores resultados estatísticos na validação externa comparativamente aos resultados obtidos na validação externa do modelo genérico referente ao mesmo parâmetro ($r^2 = 0,95$; RMSEP = 0,51%; RPD = 4,1) (**Tabela 9**), apesar do modelo genérico também apresentar uma boa capacidade preditiva.

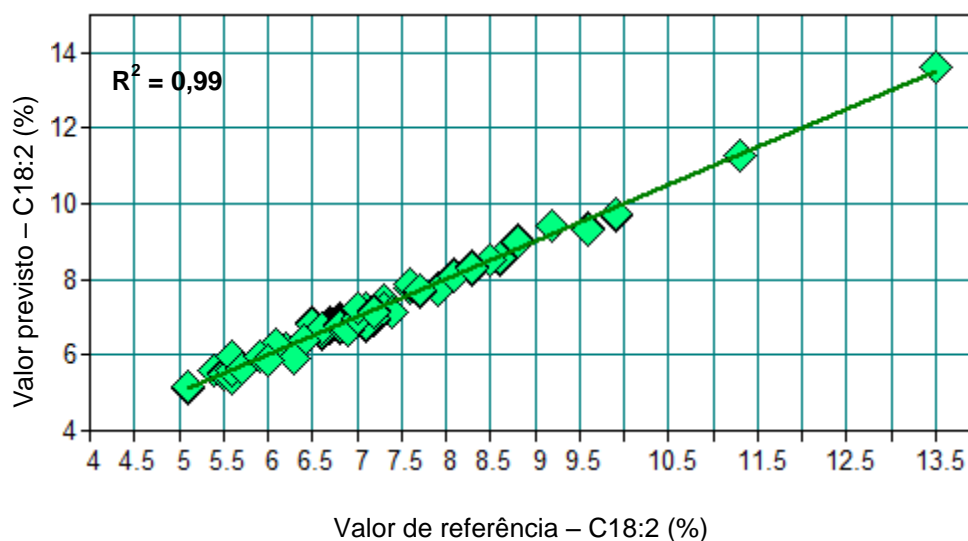


Figura 34 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:2 (%) para o azeite virgem extra.

3.2.3.7. Esteróis Totais

Para quantificação dos esteróis totais (ppm), o modelo de calibração resultante mostrou uma fraca capacidade preditiva ($r^2 = 0,43$) e um valor de RMSECV de 87,4 ppm (**Tabela 15**). A validação externa deste modelo de calibração (**Tabela 16**) apresentou uma fraca correlação ($r^2 = 0,41$), como demonstrado na **Figura 35**, e um valor de RMSEP de 83,3 ppm. O baixo valor de RPD obtido em ambas as validações ($RPD_{val.cruzada} = 1,3$; $RPD_{val.externa} = 1,4$) confirma a baixa capacidade preditiva deste modelo.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,37$, $RMSEP = 126,17$ ppm e $RPD = 1,1$) (**Tabela 9**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos, no entanto, ambos os modelos são desajustados para predição deste parâmetro.

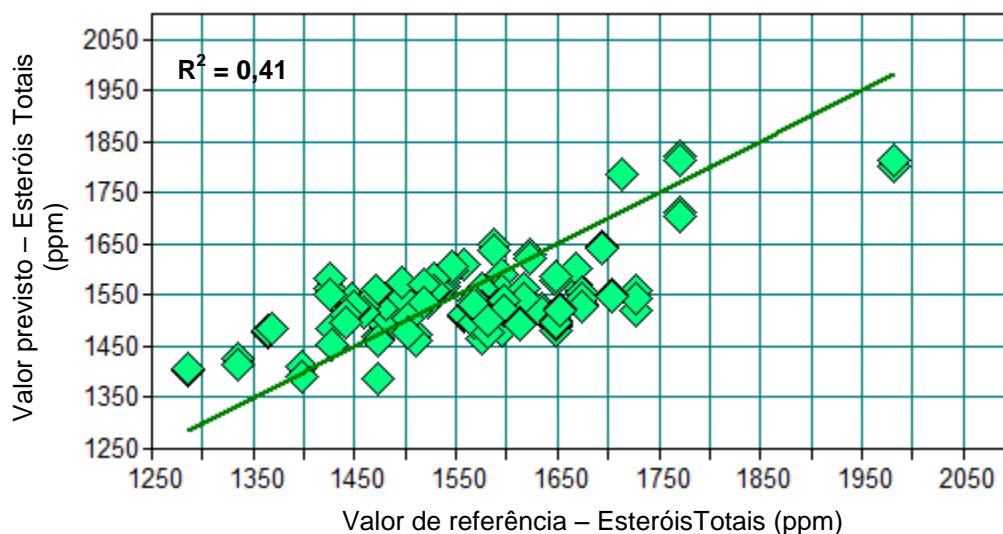


Figura 35 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro esteróis totais (ppm) para o azeite virgem extra.

3.2.3.8. Absorvância no ultravioleta a 232 nm (K232)

A leitura da absorvância permite detectar compostos resultantes do processo de oxidação, sendo o valor máximo admissível da absorvância a 232 nm de 2,5 para um azeite virgem extra. O modelo de calibração resultante para este parâmetro apresentou um baixo coeficiente de determinação ($r^2 = 0,33$) e um valor de RMSECV de 0,08 (**Tabela 15**). Na validação externa do modelo de calibração (**Tabela 16**) verificou-se um aumento do r^2 (0,43), no entanto, o baixo valor de r^2 expressa a baixa correlação entre os dados (**Figura 36**). O valor de RMSEP foi de 0,09. Tendo em conta o baixo valor de r^2 e RPD (1,3), constata-se que o modelo não é adequado para predição deste parâmetro.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,17$; RMSEP = 0,27; RPD = 0,6) (**Tabela 9**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos, no entanto, nenhum dos modelos é adequado para predição deste parâmetro.

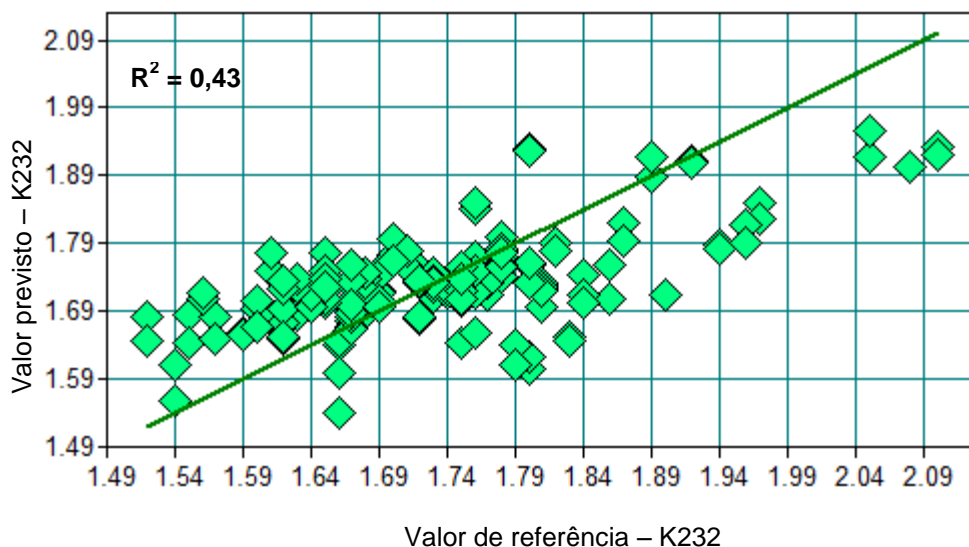


Figura 36 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K232 para o azeite virgem extra.

3.2.3.9. Eritrodiol e uvaol

Analisando a **Tabela 15**, verifica-se que o modelo de calibração apresenta uma fraca correlação, dado o baixo valor de r^2 (0,57), e o valor de RPD de 1,5, valor muito abaixo dos valores considerados aceitáveis ($RPD \geq 2,5$), confirmam a baixa capacidade preditiva do modelo. O valor de RMSECV obtido foi de 0,15%. Na validação externa, de acordo com os dados da **Tabela 16**, verifica-se uma fraca correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e o método de referência ($r^2 = 0,15$), como se pode observar na **Figura 37**. O valor de RMSEP obtido foi de 0,20%, tendo-se obtido um valor de RPD muito baixo (1,1), confirmando que o modelo não é adequado para predição da percentagem de eritrodiol e uvaol no azeite virgem extra.

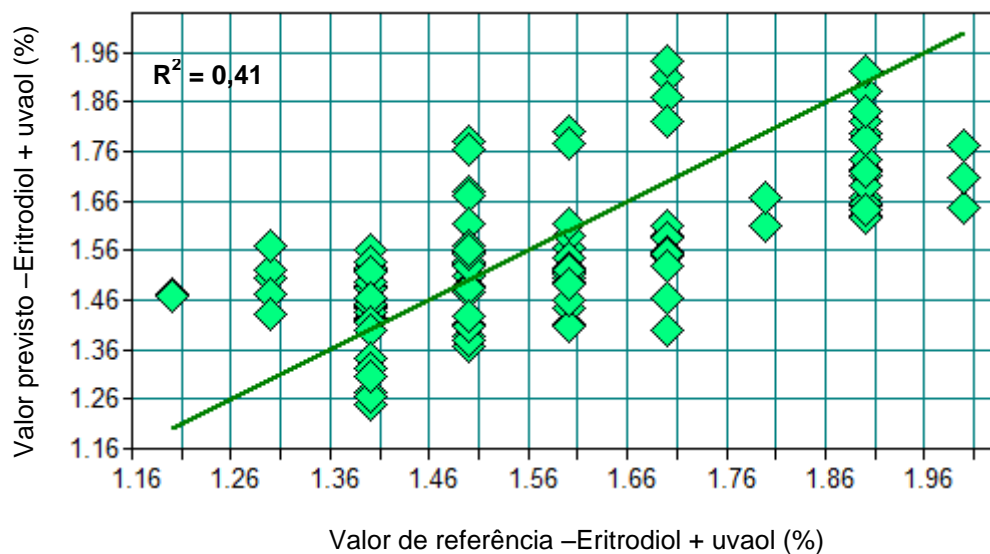


Figura 37 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro eritrodiol e uvaol (%) para o azeite virgem extra.

3.2.4. Azeite

Para o azeite (contém azeite virgem e azeite refinado), os parâmetros para os quais se procedeu ao desenvolvimento de um modelo foram os ácidos gordos (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2), β – sitosterol, esteróis totais, coeficiente de extinção (K232) e o teor de eritrodiol e uvaol. Para tal, foram analisadas 136 amostras e os espectros NIR foram obtidos em duplicado, perfazendo um total de 272 espectros NIR.

As regiões consideradas de interesse para o desenvolvimento dos modelos de calibração são as mesmas regiões utilizadas para o caso do azeite virgem extra (11500 – 6000 e 5500 – 4500 cm^{-1}).

Foram desenvolvidos os modelos para cada parâmetro, encontrando-se representados na **Tabela 17** os resultados obtidos para a validação cruzada, incluindo a região espectral e pré-tratamento seleccionados que geraram os melhores resultados.

Tabela 17 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada dos parâmetros referentes à acidez, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, β – sitosterol, esteróis totais, K232 e eritrodiol e uvaol para o azeite.

Parâmetro	N.º amostras	Pré-Trat.	Intervalo (cm ⁻¹)	Gama de calibração	r ²	RMSECV	RPD	Rk
Acidez (%)	84	2ndDer	7502,2 - 6800,2 5025,9 - 4597,7	0,12 – 0,57	0,97	0,01	5,7	10
C16:0 (%)	78	SNV	9403,8 - 7498,3	10,3 – 14,6	0,47	0,40	1,4	5
C16:1 (%)	82	1st Der + SNV	9403,8 - 6098,2	0,8 – 1,6	0,65	0,10	1,7	8
C18:0 (%)	84	1st Der + SLS	6800,2 - 6098,2	2,6 – 3,4	0,73	0,10	1,9	5
C18:1 (%)	84	1st Der	9403,8 - 7498,3 5450,2 - 4597,7	71,6 – 78,0	0,70	0,59	1,8	5
C18:2 (%)	72	1st Der + SLS	1194,2 - 9392,2 7502,2 - 6098,2 5446,3 - 4478,2	5,7 – 9,1	0,91	0,13	3,4	10
β - sitosterol (%)	81	SLS	9403,8 - 6098,2	93,9 – 95,3	0,53	0,17	1,5	10
Esteróis Totais (ppm)	68	1st Der + SNV	9403,8 - 7498,3	1273 – 1813	0,82	30,3	2,4	5
K232	74	MSC	9403,8 - 7498,3	1,26 – 3,44	0,22	0,10	1,1	6
Eritrodiol + Uvaol (%)	80	1st Der + SNV	9403,8 - 7498,3 6102 - 4597	1,4 – 3,5	0,65	0,15	1,7	5

Após a validação cruzada, procedeu-se à realização da validação externa para cada modelo (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Resultados estatísticos obtidos na validação externa dos parâmetros referentes à acidez, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, β – sitosterol, esteróis totais, K232 e eritrodiol e uvaol para o azeite.

Parâmetro	N. ^o amostras	r^2	RMSEP	RPD
Acidez (%)	42	0,98	0,01	7,2
C16:0 (%)	49	0,45	0,4	1,4
C16:1 (%)	48	0,51	0,09	1,4
C18:0 (%)	49	0,74	0,11	2,0
C18:1 (%)	50	0,73	0,61	1,9
C18:2 (%)	40	0,98	0,09	6,6
β - sitosterol (%)	49	0,59	0,17	1,6
Esteróis Totais (ppm)	45	0,54	48,2	1,5
K232	45	0,54	0,09	1,5
Eritrodiol + Uvaol (%)	50	0,71	0,16	1,9

3.2.4.1. Acidez

De acordo com a análise da **Tabela 17**, para a quantificação da acidez verifica-se que o modelo de calibração desenvolvido apresenta uma elevada capacidade preditiva ($r^2 = 0,97$) e um valor de RMSECV aceitável (0,01%). Na validação externa do modelo (**Tabela 18**) obtiveram-se resultados muito próximos aos da validação cruzada, tendo-se obtido um r^2 de 0,98, o que denota a elevada correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 38**), um valor RMSEP aceitável (0,01%) e um RPD elevado (7,2), confirmando a adequabilidade do modelo para a predição da acidez.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,93$; RMSEP = 0,03%; RPD = 3,3) (**Tabela 10**), verifica-se que apesar do modelo genérico apresentar bons resultados, este modelo apresenta melhores resultados estatísticos.

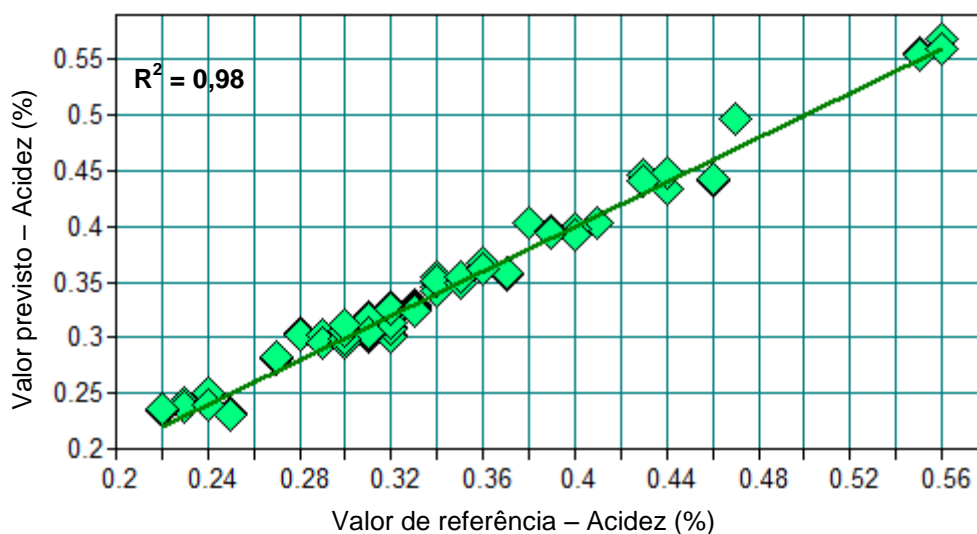


Figura 38 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro acidez (%) para o azeite.

3.2.4.2. Ácido palmítico (C16:0)

Relativamente ao modelo de calibração desenvolvido para o C16:0, verifica-se na validação cruzada uma fraca capacidade preditiva ($r^2 = 0,47$), bem como um valor de RMSECV elevado (0,4%) (**Tabela 17**). Analisando a **Tabela 18**, verifica-se que na validação externa o r^2 obtido foi de 0,45, denotando a fraca correlação existente entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 39**). O valor de RMSEP obtido foi de 0,4%, o mesmo valor do erro obtido na validação cruzada. O baixo valor de r^2 e RPD (1,8) obtidos na validação externa confirmam a fraca capacidade preditiva deste modelo.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,14$; RMSEP = 0,74%; RPD = 1,0) (**Tabela 10**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos.

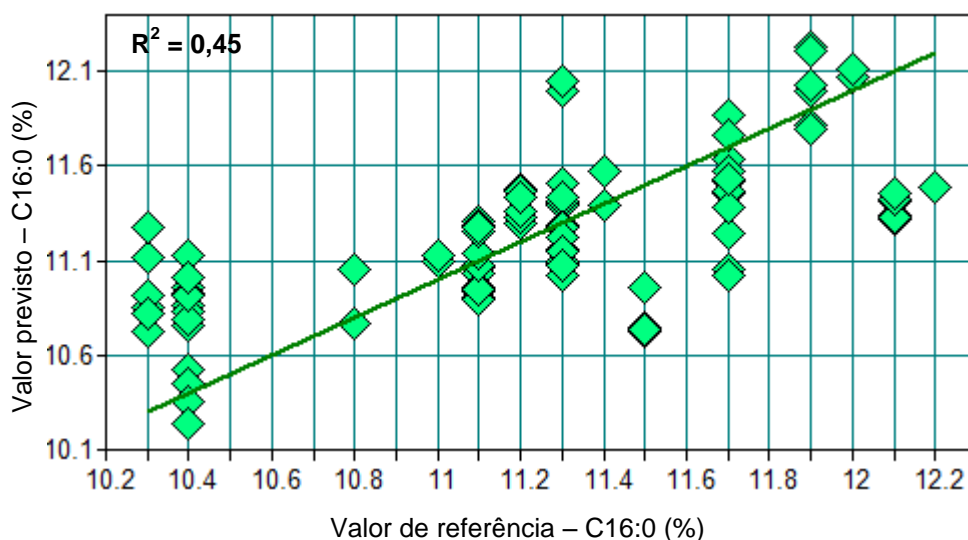


Figura 39 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:0 (%) para o azeite.

3.2.4.3. Ácido palmitoleico (C16:1)

Para a quantificação do C16:1, de acordo com a análise das **Tabelas 17 e 18**, verifica-se que tanto na validação cruzada como na validação externa os resultados estatísticos obtidos encontram-se muito próximos. Na validação cruzada o r^2 foi de 0,65 e o valor de RMSECV de 0,1%. Na validação externa, o r^2 obtido foi igualmente baixo (0,51), o que demonstra a fraca correlação entre dados (**Figura 40**), e o valor de RMSEP foi de 0,08%. Dado o baixo valor de r^2 e do RPD (1,4) obtidos na validação externa, constata-se que este modelo apresenta uma fraca capacidade preditiva para este parâmetro.

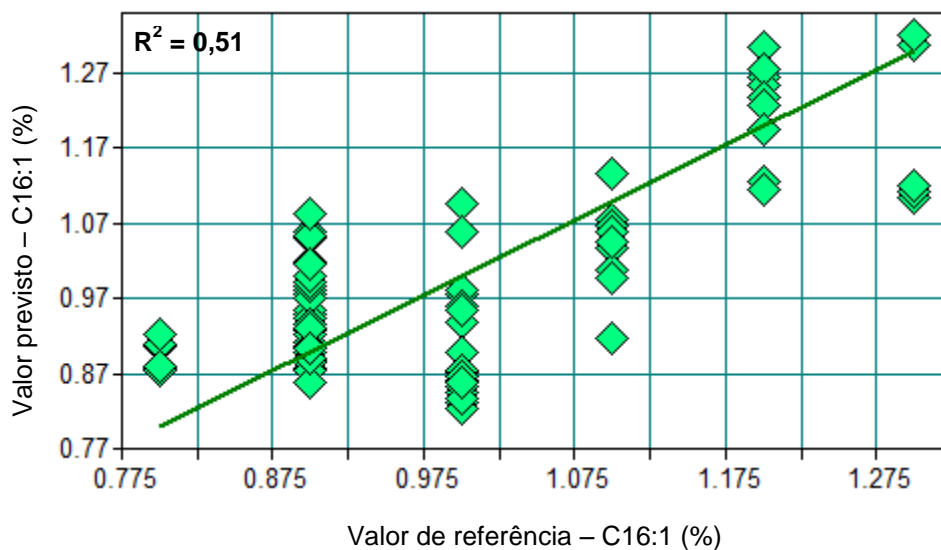


Figura 40 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C16:1 (%) para o azeite.

3.2.4.4. Ácido esteárico (C18:0)

O modelo de calibração desenvolvido para o C18:0 obteve um r^2 de 0,73, revelando uma capacidade preditiva razoável. O valor de obtido de RMSECV foi de 0,1% e o valor de RPD de 1,9 (**Tabela 17**). Na validação externa (**Tabela 18**), obtiveram-se resultados muito semelhantes aos obtidos na validação cruzada. O r^2 obtido na validação externa foi de 0,74, o que revela uma correlação entre os dados razoável, contudo, não se verifica uma distribuição linear nos resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 41**). O valor de RMSEP foi de 0,1% e o baixo valor de RPD (2) confirma que o modelo é desajustado para predição deste parâmetro.

Ao comparar os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,38$; RMSEP = 0,20%; RPD = 1,0) (**Tabela 10**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos.

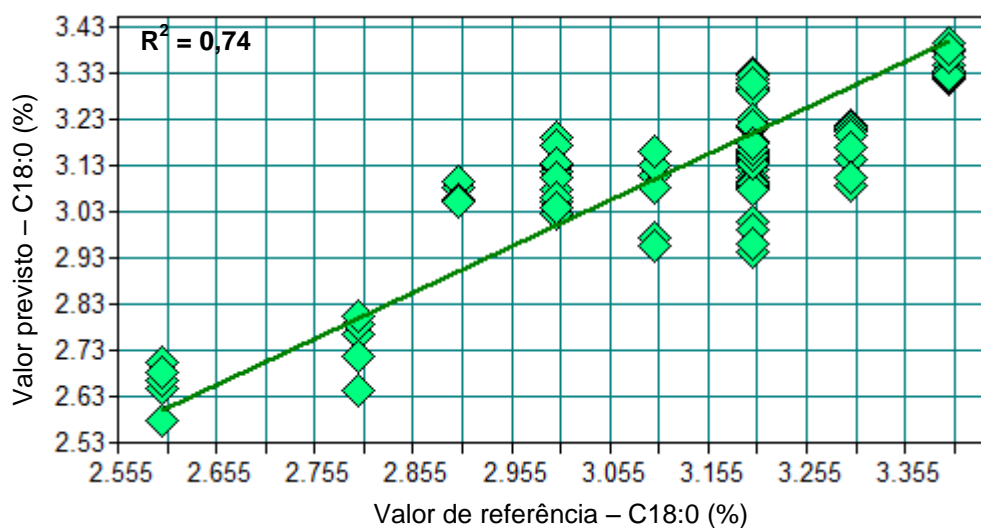


Figura 41 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:0 (%) para o azeite.

3.2.4.5. Ácido oleico (C18:1)

Para o caso do C18:1, na validação cruzada obteve-se um r^2 razoável (0,70), e um valor de RMSECV de 0,59% (**Tabela 17**). Na validação externa (**Tabela 18**), o valor de RMSEP obtido foi de 0,61% e o r^2 obtido foi de 0,73, o que demonstra uma correlação entre os dados razoável (**Figura 42**), contudo, o baixo valor de RPD (1,9) indica que o modelo não é suficientemente ajustado para a predição deste parâmetro, mesmo tendo-se verificado que tanto na validação cruzada como na validação externa obtiveram-se resultados muito próximos.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,49$; RMSEP = 0,93%; RPD = 1,3) (**Tabela 10**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos.

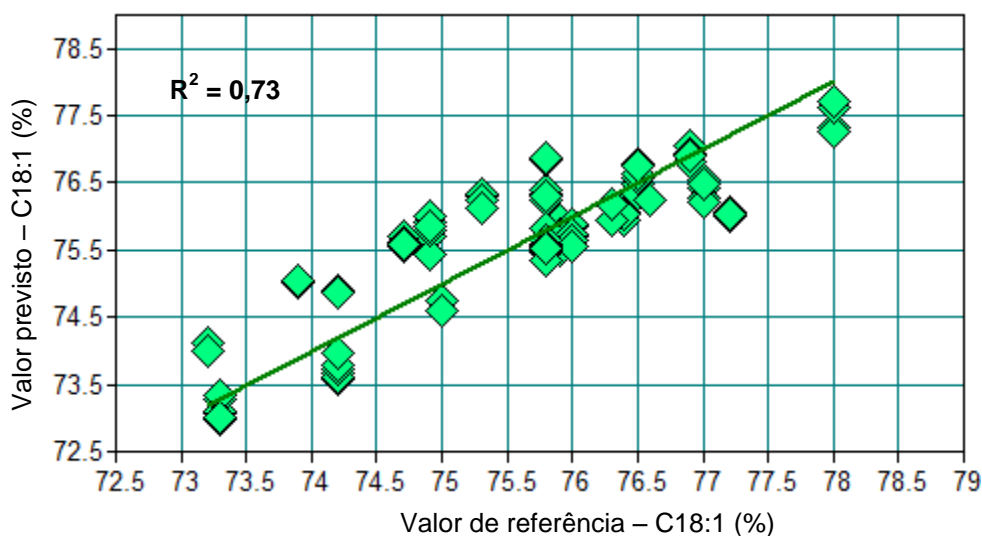


Figura 42 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:1 (%) para o azeite.

3.2.4.6. Ácido linoleico (C18:2)

O modelo de calibração desenvolvido para o C18:2 apresentou uma capacidade preditiva elevada ($r^2 = 0,91$), e o valor de RMSECV obtido foi de 0,13% (**Tabela 17**). Na validação externa (**Tabela 18**), verificou-se um aumento do r^2 (0,98), que se traduz numa boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência (**Figura 43**). Além de um aumento do r^2 , verificou-se também um aumento do valor de RPD (6,6) e uma diminuição do erro associado à validação externa (RMSEP = 0,09%), confirmando a boa capacidade de predição deste modelo.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,91$; RMSEP = 0,22%; RPD = 3,3) (**Tabela 10**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos, apesar de ambos os modelos apresentarem uma boa capacidade preditiva.

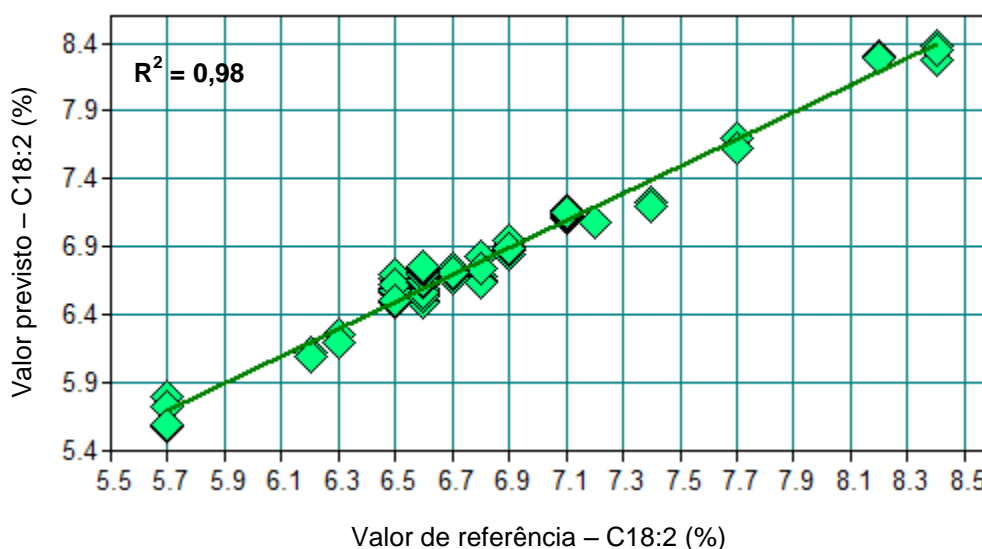


Figura 43 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro C18:2 (%) para o azeite.

3.2.4.7. β - sitosterol

O modelo de calibração resultante para o β - sitosterol apresentou uma fraca capacidade preditiva ($r^2 = 0,53$) e um valor de RMSECV de 0,17% (**Tabela 17**). Na validação externa (**Tabela 18**) obteve-se um r^2 de 0,59, o que demonstra a fraca correlação entre os dados (**Figura 44**). O valor de RMSEP obtido foi de 0,17% e o valor de RPD de 1,6. De acordo com os resultados obtidos na validação externa, constata-se que este modelo não é adequado para predição deste parâmetro.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,11$; RMSEP = 0,30%; RPD = 0,90) (**Tabela 10**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos, contudo, nenhum dos modelos é adequado para predição deste parâmetro.

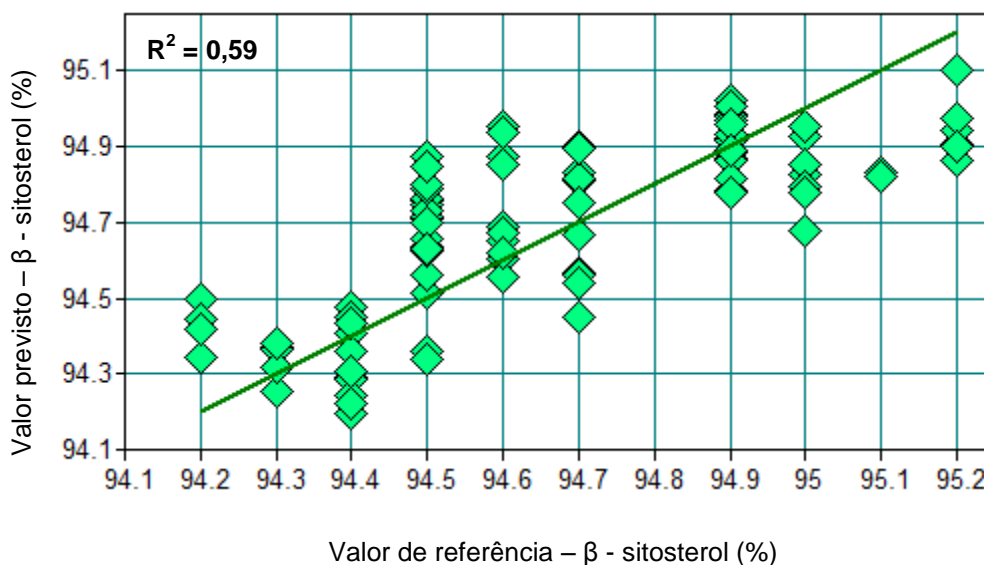


Figura 44 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro β - sitosterol (%) para o azeite.

3.2.4.8. Esteróis Totais

O modelo de calibração desenvolvido para quantificar os esteróis totais apresentou uma boa capacidade preditiva ($r^2 = 0,82$) e um valor de RMSECV de 30,3 ppm (**Tabela 17**). Na validação externa do modelo (**Tabela 18**), verificou-se uma fraca correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelo método de referência ($r^2 = 0,54$) (**Figura 45**), evidenciando a fraca capacidade preditiva do modelo, que é confirmada também pelo baixo valor de RPD (1,5). O valor de RMSEP foi de 48,20 ppm, valor superior ao obtido na validação cruzada. Este modelo não é adequado para predição deste parâmetro.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,35$; RMSEP = 99,66 ppm; RPD = 1,2) (**Tabela 10**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos, no entanto, nenhum dos modelos apresenta uma boa capacidade preditiva.

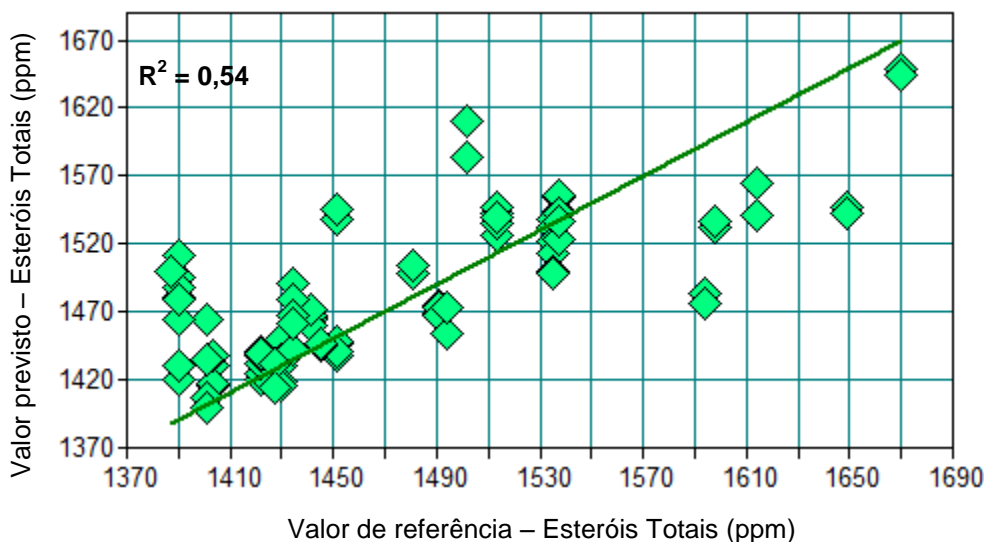


Figura 45 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro esteróis totais (ppm) para o azeite.

3.2.4.9. Absorvância no ultravioleta a 232 nm (K232)

Ao contrário do que acontece no caso do azeite virgem extra, em que existe um valor máximo para a leitura da absorvância a 232 nm, com o azeite não existe valor máximo admissível. O modelo de calibração resultante para este parâmetro apresentou um baixo coeficiente de determinação ($r^2 = 0,21$) e um valor de RMSECV de 0,10 (**Tabela 17**). Na validação externa do modelo de calibração (**Tabela 18**) verificou-se um aumento do r^2 (0,54), no entanto, o baixo valor de r^2 expressa a fraca correlação existente entre os dados (**Figura 47**). O valor de RMSEP obtido foi de 0,09. Tendo em conta o baixo valor de r^2 e RPD (1,5), comprova-se que o modelo não é adequado para predição deste parâmetro.

Comparando os resultados da validação externa deste modelo com os resultados obtidos na validação externa do modelo genérico ($r^2 = 0,08$; RMSEP = 0,34; RPD = 0,7) (**Tabela 10**), verifica-se que este modelo apresenta melhores resultados estatísticos, contudo, nenhum dos modelos apresenta capacidade preditiva.

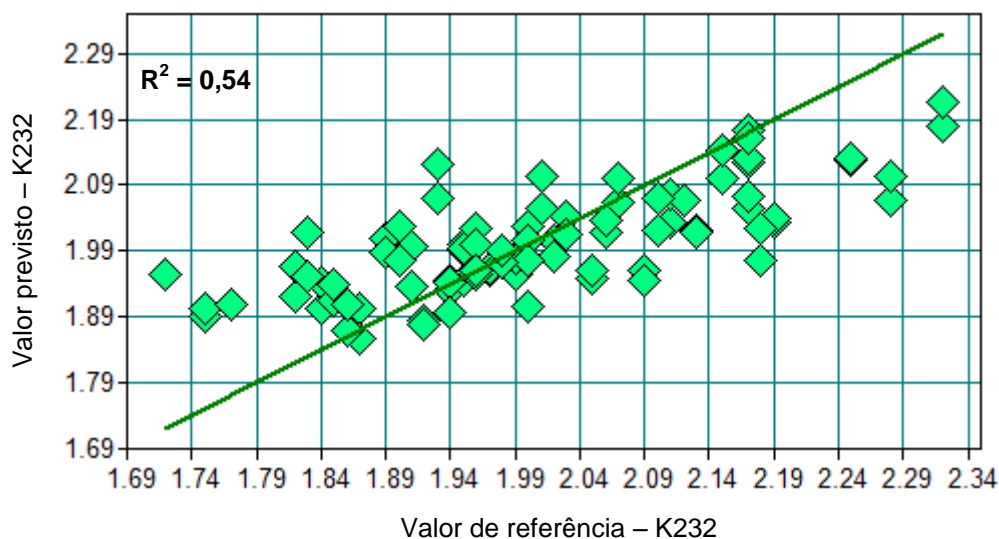


Figura 46 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro K232 para o azeite.

3.2.4.10. Eritrodiol e uvaol

O modelo de calibração desenvolvido para quantificação do eritrodiol e uvaol apresentou um baixo valor de r^2 (0,65) e um valor de RMSECV de 0,15% (Tabela 17). Na validação externa do modelo (Tabela 18) obteve-se um valor de RMSEP de 0,16% e um r^2 aceitável (0,71), no entanto, a distribuição dos dados não é linear (Figura 47). O baixo valor do r^2 e RPD (1,9) confirmam a fraca capacidade preditiva do modelo.

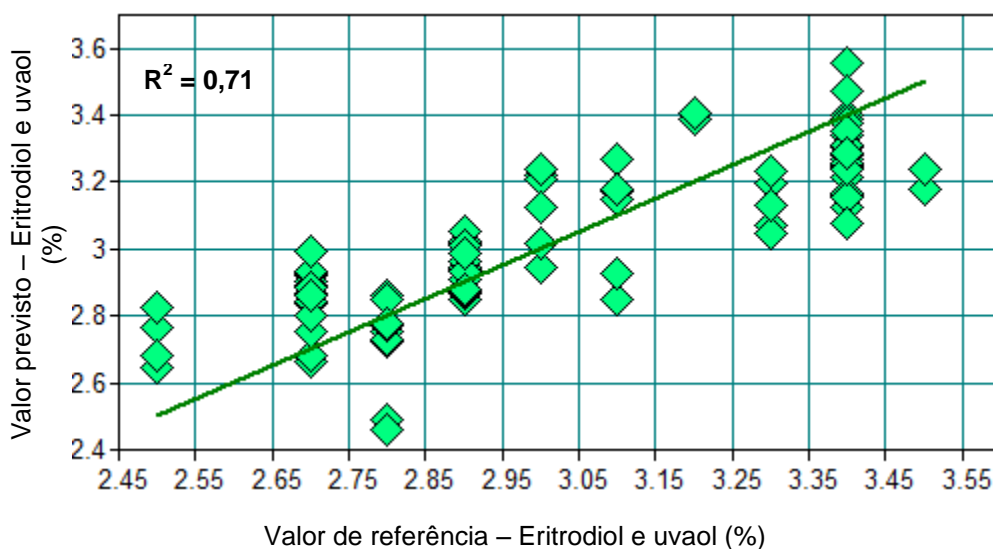


Figura 47 - Validação externa do modelo referente ao parâmetro eritrodiol e uvaol (%) para o azeite.

3.3. Desenvolvimento de um modelo de calibração para quantificação de estigmastadienos em azeites virgens extra

O teor de estigmastadienos, determinado em azeites virgem extra, é um parâmetro utilizado no controlo de qualidade de modo a garantir a genuidade do produto, ou seja, garantir que o produto não contém óleos ou azeites refinados. O método de referência para esta determinação é moroso, cerca de quatro horas, envolvendo várias etapas ao longo do processo.

Uma vez que são necessárias quase quatro horas para se obter o resultado, seria de grande interesse o desenvolvimento de um modelo de calibração capaz de responder com rapidez e eficácia.

Os óleos refinados contêm naturalmente estigmastadienos, deste modo, procedeu-se a contaminações de azeite virgem extra com óleo de soja e girassol refinado por forma a variar o teor em estigmastadienos e tentar estabelecer um modelo de calibração.

A principal dificuldade para o desenvolvimento de um modelo de calibração para quantificação de estigmastadienos resulta do facto da espectroscopia NIR não ser muito sensível para concentrações reduzidas, como é o caso dos estigmastadienos, cuja concentração máxima admissível em azeite virgem extra é de 0,10 ppm.

Procedeu-se ao desenvolvimento de dois modelos de calibração. Um dos modelos foi desenvolvido com amostras de azeite virgem extra contaminadas com óleo de girassol refinado e um outro modelo desenvolvido com amostras de azeite virgem extra contaminado com óleo de soja refinado.

3.3.1. Modelo de calibração desenvolvido com amostras de azeite virgem extra contaminado com óleo de girassol refinado

Para o desenvolvimento deste modelo de calibração foram utilizadas 9 amostras de azeite virgem extra e 51 amostras contaminadas com óleo de girassol refinado (0,5 a 6% de contaminante), conseguindo assim um intervalo de variação entre 0,01 a 0,27 ppm. Das 60 amostras 11 foram consideradas *outliers*.

Na **Tabela 19** são apresentados os resultados estatísticos relativos ao modelo de calibração, incluindo a região espectral e pré-tratamento seleccionados que geraram o melhor resultado.

Tabela 19 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada referente à quantificação de estigmastadieno (ppm) em amostras de azeite virgem extra contaminadas com óleo de girassol refinado.

Parâmetro	N.º amostras	Pré-Trat.	Intervalo (cm ⁻¹)	r ²	RMSECV (ppm)	RPD	Rk
Estigmastadieno (ppm)	49	1stDer	11340,1 – 5986,3 4956,5 – 4466,6	0,94	0,013	3,95	10

De acordo com a análise da **Tabela 19**, verifica-se que, para a quantificação de estigmastadienos, o modelo de calibração resultante apresenta um elevado coeficiente de determinação ($r^2 = 0,94$), demonstrando uma boa correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e o método de referência (**Figura 48**), e um erro de predição (RMSECV) de 0,013 ppm. Tendo em conta o elevado valor de r^2 e RPD (3,95), constata-se que o modelo apresenta uma boa capacidade preditiva. Contudo, devido ao reduzido número de amostras e à sua complexidade não foi possível separar as amostras em dois grupos, um de calibração e um de validação, tendo sido realizada apenas a validação cruzada. Trata-se de um modelo de calibração promissor, no entanto, será fundamental analisar um elevado número de amostras para se proceder a uma validação externa por forma a avaliar o potencial do modelo.

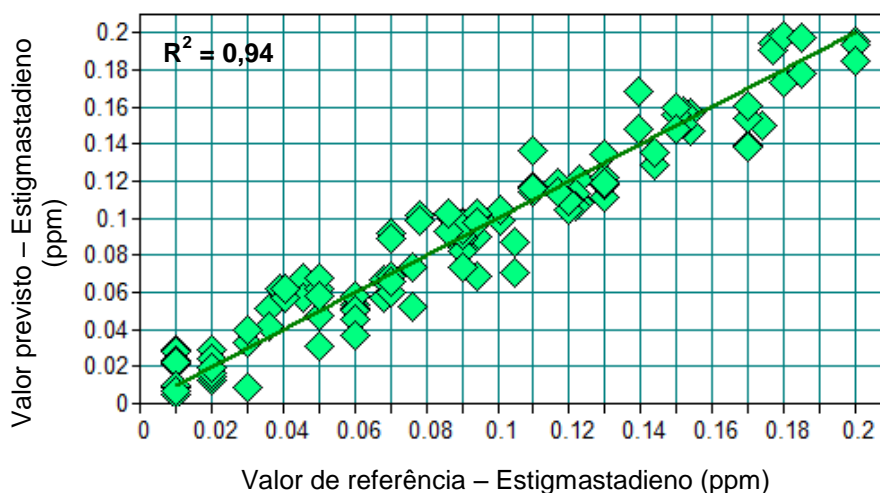


Figura 48 - Validação cruzada referente à quantificação de estigmastadieno (ppm) em amostras de azeite virgem extra contaminadas com óleo de girassol refinado.

3.3.2. Modelo de calibração desenvolvido com amostras de azeite virgem extra contaminado com óleo de soja refinado

Para o desenvolvimento deste modelo de calibração foram utilizadas 9 amostras de azeite virgem extra e 32 amostras contaminadas com óleo de soja refinado (0,5 a 6% de contaminante), conseguindo assim um intervalo de variação entre 0,01 a 0,59 ppm. Das 41 amostras, apenas uma foi considerada *outlier*, a qual corresponde à amostra com valor de estigmastadieno de 0,59 ppm.

Na **Tabela 20** são apresentados os resultados estatísticos relativos ao modelo de calibração, incluindo a região espectral e pré-tratamento seleccionados que geraram o melhor resultado.

Tabela 20 - Resultados estatísticos obtidos na validação cruzada referente à quantificação de estigmastadieno (ppm) em amostras de azeite virgem extra contaminadas com óleo de soja refinado.

Parâmetro	N. ^o amostras	Pré-Trat.	Intervalo (cm ⁻¹)	r ²	RMSECV (ppm)	RPD	Rk
Estigmastadieno (ppm)	40	1stDer + SNV	11340,1 – 9376,8 5446,3 – 4466,6	0,70	0,054	1,82	8

De acordo com a análise da **Tabela 20**, verifica-se que o modelo de calibração resultante para a quantificação de estigmastadienos não apresenta um coeficiente de terminação muito elevado ($r^2 = 0,70$) (**Figura 49**), contudo ainda é aceitável. O erro de predição (RMSECV) obtido foi de 0,05 ppm, valor superior ao verificado no modelo de calibração desenvolvido para amostras de azeite virgem extra contaminadas com óleo de girassol refinado. O valor de RPD, que avalia a *performance* do modelo, foi de 1,82, valor pouco satisfatório que indica que o modelo não é adequado para quantificação deste parâmetro.

Tal como acontece com o modelo calibração anterior, em que o contaminante é o óleo de girassol refinado, também neste caso não existe um número de amostras suficiente para separar em dois grupos, um grupo de amostras para calibração e um outro para validação, tendo-se realizado apenas a validação cruzada, sendo imprescindível realizar um maior número de análises para se proceder a uma validação externa do modelo.

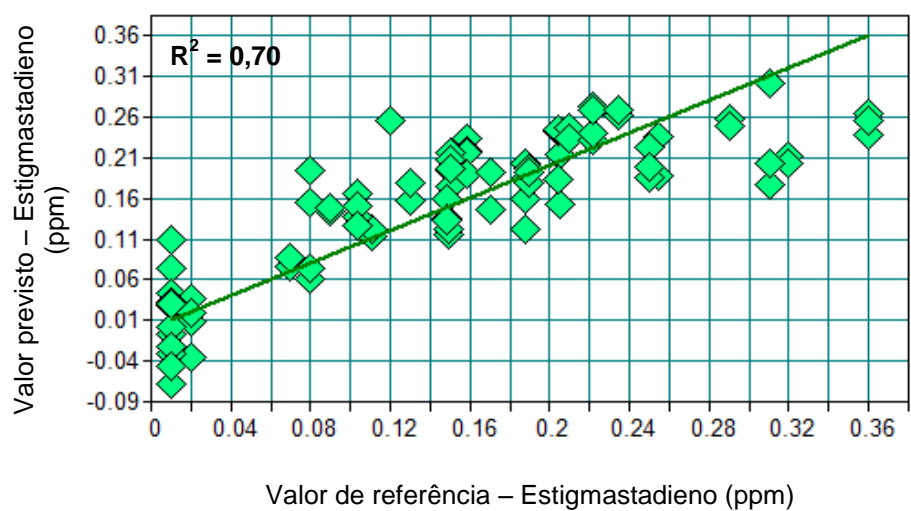


Figura 49 - Validação cruzada referente à quantificação de estigmastadieno (ppm) em amostras de azeite virgem extra contaminadas com óleo de soja refinado.

4. Conclusões/ Perspectivas futuras

De acordo com os resultados obtidos, a espectroscopia NIR permitiu a construção de modelos de calibração para caracterização dos óleos de soja e girassol refinado, azeite virgem extra e azeite.

No caso do óleo de soja refinado os melhores modelos são os relativos ao C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, índice de iodo e K270 ($r^2 \geq 0,93$ e RPD $\geq 3,8$). Para o óleo de girassol refinado os melhores modelos correspondem aos parâmetros C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, índice de iodo e K230 ($r^2 \geq 0,84$ e RPD $\geq 2,5$). O azeite virgem extra apresentou bons modelos de calibração para a acidez, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 e C18:2 ($r^2 \geq 0,87$ e RPD $\geq 2,9$). Para o azeite obtiveram-se dois bons modelos de calibração para a acidez ($r^2 = 0,98$ e RPD = 7,2) e para o C18:2 ($r^2 = 0,98$ e RPD = 6,6).

Nem todos os modelos de calibração apresentaram resultados satisfatórios, devido essencialmente ao curto intervalo de variação dos dados, como foi o caso do C16:0, C16:1, índice de anisidina e K230 para o óleo de soja refinado; C18:3, índice de anisidina e K230 para o óleo de girassol refinado; esteróis totais, K232 e percentagem de eritrodiol e uvaol para o azeite virgem extra; e C16:0, C16:1, β – sitosterol, esteróis totais e K232 para o azeite. No caso dos parâmetros relativos às absorvâncias no ultravioleta (K230 e K232) e índice de anisidina, para melhorar os respectivos modelos de calibração e torná-los robustos, é possível preparar amostras laboratorialmente para aumentar o intervalo de variação e assim abranger toda a gama de valores referida nas normas para que seja possível detectar amostras que se encontrem fora da gama de valores que foi utilizada na construção dos modelos.

Em relação à acidez dos óleos de soja e girassol refinados e absorvâncias no ultravioleta no comprimento de onda de 270 nm para o azeite virgem extra e azeite, os resultados obtidos pelo método de referência não apresentaram variação, deste modo, tornou-se impossível estabelecer um modelo de calibração. No entanto, como foi referido anteriormente, é possível fazer variar esses valores laboratorialmente e posteriormente estabelecer um possível modelo de calibração.

Relativamente à composição em esteróis ou ácidos gordos, trata-se de uma característica intrínseca dos produtos em questão, não sendo possível variar a sua

composição em laboratório, todavia, para obter uma gama de valores mais alargada será necessário a actualização constante da base de dados com novas amostras.

Para a quantificação de estigmastadienos, os modelos de calibração apresentados, apesar de se apresentarem promissores, ainda não são passíveis de serem utilizados, sendo necessário analisar um maior número de amostras e proceder posteriormente a uma validação externa.

Os modelos de calibração para os diversos parâmetros devem ser desenvolvidos separadamente para cada grupo de amostras (óleo de soja refinado, óleo de girassol refinado, azeite virgem extra e azeite), tendo-se verificado melhores resultados nos modelos desenvolvidos separadamente em comparação com os modelos genéricos.

Conclui-se deste modo que a espectroscopia NIR, aliada a técnicas de quimiometria, é uma técnica rápida, precisa e com capacidade de analisar simultaneamente vários parâmetros. O reduzido tempo de análise e baixo custo requeridos por esta técnica, uma vez que a preparação da amostra neste caso é nula e dispensa o uso de reagentes, justificam a continuação de estudos no sentido de desenvolvimento de modelos de calibração robustos e tratando-se de um método eficaz e inovador traduz o desenvolvimento e progresso do controlo da qualidade por parte da empresa.

5. Referências bibliográficas

- ARMENTA, S., GARRIGUES, S., GUARDIA, M. (2007) – Determination of edible oils parameters by near infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. Vol.596. pp.330 – 337.
- BEHEMER, D. (s/d) - *FT-NIR Spectroscopy For The Edible Oil Industry*. Bruker Optics.
- BOSKOU, D. (1998) – *Química y Tecnología del Aceite de Oliva*. 1ª Edição. AMV ediciones. MUNDI-PRENSA. Madrid. pp. 25 – 64, 67 – 96, 119 – 123, 151 – 152, 156.
- BURNS, D.A., CIURCZAK, E.W. (2001) - *Handbook of Near-Infrared Analysis*. 2ª Edição. Marcel Dekker, Inc.. pp. 21 – 23.
- CODEX Stan 33 – 1981 (2009) – *Codex standard for olive oils and olive pomace oils*.
- CODEX Stan 210 – 1999 (2009) – *Codex standard for named vegetable oils*.
- DECRETO - LEI Nº 106/2005 – Diário da República, I Série – A. Nº123 – 29 de Agosto de 2005. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- CEN, H., HE, Y. (2007) – Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Food Science and Technology*. pp. 72 – 83.
- CHAKRABARTY, M.M. (2003) – *Chemistry and technology of oils and fats*. Allied Publishers Pvt. pp. 64 – 65.
- CHEN, Y. S., CHEN, A. O. (1995) – *Quality analysis and purity examination of edible vegetable oils by near-infrared transmittance spectroscopy*. pp.316 – 323.
- CHOE, E., MIN, D. B. (2009) – Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Food Science and Food Safety*. Vol. 8. pp. 345-358.
- COMANDINI, P., VERARDO, V., MAIOCCHI, P., CABONI, M.F. (2009) – Accelerated oxidation: comparative study of a new reactor with oxidation stability instrument. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Vol. 111, Nº 9. pp. 933 – 940.
- Conselho Oleícola Internacional: COI/ T.15/NC nº 3/ Rev. 3 Novembro de 2008.

CONZEN, J.P. (2006) - *Multivariate Calibration. A Practical Guide for the Method Development in the Analytical Chemistry*. 2ª Edição. Bruker Optik GmbH. pp. 3 -11; 13 – 17; 42 – 45.

COSTA, A. M. S. (2007) - *Desenvolvimento de metodologia instrumental rápida para análise de alimentos*. Departamento de Química – Universidade de Aveiro. pp. 5 – 6.

FOX, N. J., STACHOWIAK, G. W. (2006) – Vegetable oil – based lubricants: A review of oxidation. *Elsevier*. Vol. 40. pp. 1035 – 1046.

FREGA, N., MOZZON, M., LERCKER, G. (1999) – Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Vol. 76, Nº 3. pp. 325 – 329.

GELADI, P., KOWALSKI, B. R. (1986) - Partial Least-Squares Regression: A tutorial. *Analytical Chimica Acta*. Vol. 185. pp.1-17.

GOUVEIA, J. M. N. B. (1995) – *Azeites virgens do Alto Alentejo – Comportamento químico, tecnológico e sensorial*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. pp. 68 – 74, 169 – 181.

GRANADOS, J. A. (2000) – *Enciclopedia del aceite de oliva - Historia y leyendas del aceite y la aceituna*. Editorial Planeta. Barcelona. pp.130 – 131.

GUNSTONE, F. D. (2004) – *The chemistry of oils and fats: sources, composition, properties and uses*. CRC Press. Pp. 23 – 49, 150 -171.

HELPER, G. A., FERRÃO, M. F., FERREIRA, C. V., HERMES, N. (2006) - Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26 (4), pp. 779 – 886.

HOLLAS, J.M. (2004) - *Modern Spectroscopy*. 4ª Edição. John Wiley & Sons Ltd. pp.55 - 59

LI, H., VAN DE VOORT, F. R., ISMAIL, A. A., SEDMAN, J., COX, R., SIMARD, C., BUIJS, H. (2000) – Discrimination of edible oil products and quantitative determination

of their iodine value by Fourier transform near-infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* Vol.77, N.º 1. pp. 29 – 36.

LÓPEZ-VILLALTA, L. C. (1999) – *Obtención del aceite de oliva virgen*. 2ª Edição. Editorial Agrícola Española S.A. Madrid. pp. 262 – 263.

MARQUEZ, A. J., DÍAZ, A. M., REGUERA, M. I. P. (2005) – Using optical NIR sensor for on-line virgin olive oils characterization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 107. pp. 64 – 68.

NAES, T., ISAKSSON, T., PEARN, T., DAVIES, T. (2002) - *A User Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications. pp. 5; 27 – 46; 105 – 124; 155 – 162.

NP EN ISSO 660:2002 (2002) – *Óleos e gorduras animais e vegetais: Determinação do índice de acidez e da acidez (ISO 660:1999)*. Termo de homologação n.º 323/2002 de 2002-12-04. Edição: Julho de 2003. Versão Portuguesa da NP EN ISO 660:1999. Instituto Português da Qualidade.

NP 970:1986 (1986) – *Gorduras e óleos comestíveis: Absorvâncias no ultravioleta*. DR III. Série n.º 191.

NP EN ISO 3960:2004 (2004) – *Óleos e gorduras de origem animal e vegetal: Determinação do índice de peróxido (ISO 3960:1998)*. Termo de homologação n.º 8/2004 de 2004-01-22. Edição: Maio de 2004. Versão Portuguesa da NP EN ISO 3960:2000. Instituto Português da Qualidade.

NP EN ISO 6885:2002 (2002) – *Óleos e gorduras de origem animal e vegetal: Determinação do índice de anisidina (ISO 6885:1998)*. Termo de homologação n.º 321/2002 de 2002-12-04. Edição: Julho de 2003. Versão Portuguesa da EN ISO 6885:2000. Instituto Português da Qualidade.

OSBORNE, B.G. (2000) - *Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd.

PASQUINI, C. (2003) - Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(2). pp. 198-219.

PERKINS, W.D. (1986) - Fourier Transform-Infrared Spectroscopy – Part I. Instrumentation. *Journal Chemometrics*. Vol. 63, N.º 1. pp. A5-A10.

REGULAMENTO (CE) n.º 702/2007 da Comissão de 21 de Junho de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como os métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial e União Europeia*, L161, 22 de Junho de 2007.

REGULAMENTO (CE) n.º 865/2004 do CONSELHO de 29 de Abril de 2004 relativo à organização comum de mercado no sector do azeite e da azeitona de mesa e que altera o Regulamento (CEE) n.º 827/68. *Jornal Oficial da União Europeia*, L206, 9 de Junho de 2004.

RODRIGUES, J. C. C. (2007) - *Aplicação e desenvolvimento de métodos expeditos por espectroscopia de infravermelho próximo e análise multivariada. Aplicações agro-florestais*. Instituto de Investigação Científica Tropical - Centro de Florestas e Produtos Florestais. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.

SHAKHASHIRI (2007) – *Fats and oils*. General Chemistry.

SIESLER, H.W., OZAKI, Y., KAWATA, S., HEISE, H.M. (2002) - *Near-Infrared Spectroscopy – Principles, Instruments, Applications*. Wiley – VCH. pp. 1 – 7; 11 – 16.

TAKAMURA, H., HYAKUMOTO, N., ENDO, N., MATOBA, T., NISHIIKKE, T.. (1995) - Determination of lipid oxidation in edible oils by near infrared spectrscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. pp.219-225.

VELASCO, L., PÉREZ-VICH, B., FÉRNADEZ-MARTÍNEZ, J.M. (1998) – A rapid ad simple approach to identify diferente sunflower oil types by means of near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Am.Oil Chem.Soc.* Vol.75, N.º 12. pp. 1883 – 1888.

WIDEBERG, K. (2004) - *Multivariate Spectroscopy Methods for the Analysis of Solutions*. Department of Analytical Chemistry – Arrhenius Laboratory. Stockholm University. pp. 35 – 36.

WIEDEMANN, S.C.C., HANSEN, W.G., SNIEDER, M., WORTEL, V.A.L. (1998) - NIR Calibration in Practice. *Analysis Magazine* 26 (4): M38 – M43.

WILLIAMS, P.C., SOBERING, D. C. (1993) - Comparison of commercial near-infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds. *Journal Near Infrared Spectroscopy* 1(1), 25.

YILDIZ, G., Wehling, R., L., CUPPETT, S., L. (2001) – Method for determining oxidation of vegetable oils by near-infrared spectroscopy. *J. Am.Oil Chem.Soc.* Vol.78, Nº 5.pp.495 – 502.

6. Anexos

Anexo I. Métodos de referência

1. Acidez

A determinação da acidez, tanto para os óleos vegetais como para os azeites, consiste na dissolução da amostra (20 g de toma de ensaio) numa mistura de solventes (100 mL de solução de álcool e éter (1:1) previamente neutralizada com hidróxido de sódio a 0,1 mol L⁻¹, contendo 0,5 mL de indicador de fenolftaleína), seguida da titulação dos ácidos gordos livres presentes com uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol L⁻¹. Esta determinação tem uma duração de cerca de 10 minutos, sendo realizada com base na NP EN ISO 660:2002 (relativa aos óleos vegetais) e no Regulamento (CE) n.º. 702/2007 da Comissão de 21 de Junho de 2007 (relativo aos azeites).

A acidez, expressa em percentagem (massa/massa), é determinada pela seguinte equação:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

V = volume utilizado da solução de NaOH (mL)

c = concentração exacta da solução de NaOH (mol L⁻¹)

M = massa molar do ácido adoptado para expressão dos resultados (ácido oleico = 282 g mol⁻¹)

m = massa da amostra (g)

2. Índice de peróxidos

Este parâmetro é determinado tanto para os óleos vegetais como para os azeites e permite expressar em mg O₂/ kg a quantidade de substâncias presentes na amostra capazes de oxidar o iodeto de potássio. Uma toma da amostra, dissolvida em solução de ácido acético e isooctano, é tratada com uma solução de iodeto de potássio. A quantidade de iodeto libertada é titulada com uma solução padrão de tiosulfato de sódio (NP EN ISO 3960:2004; Regulamento (CE) n.º. 702/2007 da Comissão de 21 de Junho de 2007).

O índice de peróxidos (P), expresso em milimoles de oxigénio activo por quilograma, é calculado com base nas seguintes equações, conforme se trate de óleo vegetal ou azeite, respectivamente:

$$P = \frac{1000 (V - V_0)c}{2m}$$

$$P = \frac{V \times N \times 1000}{m}$$

V = volume de solução de

V₀ = volume de Na₂S₂O₃ utilizado na determinação do ensaio em branco (mL)

c = concentração exacta da solução de Na₂S₂O₃ (mol L⁻¹)

m = massa da amostra (g)

N = normalidade exacta da solução de Na₂S₂O₃

3. Absorvâncias no ultravioleta

A determinação espectrofotométrica de absorvâncias para os óleos vegetais (NP 970:1986) consiste na dissolução de 0,05 g de óleo em iso-octano num balão volumétrico de 25 mL. Agita-se para homogeneizar e, em seguida, enche-se uma célula de quartzo com percurso óptico de 1 cm. A solução de iso-octano é utilizada como padrão. Posteriormente, procede-se à leitura das extinções (K) nos comprimentos de onda correspondentes a 230, 232, 268 e 270 nm. Para os azeites (Regulamento (CE) nº. 702/2007 da Comissão de 21 de Junho de 2007), o procedimento é similar, as diferenças assentam no facto de, neste caso, utilizarem-se dois balões volumétricos com diferentes tomas de amostras. No balão volumétrico de 25 mL são dissolvidas 0,05 g de amostra e é utilizado para fazer a leitura a 232 nm. Num outro balão volumétrico de 10 mL são dissolvidas 0,10 g de amostra e procede-se às leituras dos K's correspondentes a 264, 266, 272 e 274 nm. Este procedimento demora 25 minutos.

Os coeficientes de extinção, nos diferentes comprimentos de onda, são determinados tanto para óleos vegetais como para azeites de acordo com a seguinte equação:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s}$$

K_λ = extinção específica no comprimento de onda λ

E_{λ} = extinção medida no comprimento de onda λ

c = concentração da solução em g/ 100mL

s = espessura da célula em cm

4. Índice de anisidina

No presente trabalho o índice de anisidina apenas é determinado para os óleos de soja e girassol refinados. De acordo com a NP EN ISO 6885:2002, o índice de anisidina corresponde à leitura da absorvância a um comprimento de onda de 350 nm de uma solução quando reage com a solução de *p*-anisidina. Este procedimento demora 30 minutos.

O índice de anisidina é calculado com base na seguinte equação:

$$IA = \frac{100 QV}{m} [1,2 (A_1 - A_2) - A_0]$$

V = volume no qual se dissolveu a amostras em análise, em mililitros ($V = 25$ mL)

m = toma da amostra, em gramas (g)

Q = teor de amostra da solução baseado nas unidades em que se expressa o índice de anisidina, em g mL⁻¹ ($Q = 0,01$ g mL⁻¹)

A_0 = absorvância da solução de análise antes da reacção

A_1 = absorvância da solução de análise após reacção

A_2 = absorvância do ensaio em branco

5. Índice de iodo

O índice de iodo é utilizado para determinar o grau de insaturação dos óleos e gorduras. No presente trabalho o índice de iodo é calculado com base na composição em ácidos gordos insaturados (obtidos a partir da análise efectuada por cromatografia gasosa) através da seguinte equação:

$$\text{Índ. iodo} = 0,95 + (C18:1 \times 0,86) + (C18:2 \times 1,732) + (C18:3 \times 2,616) + (C20:1 \times 0,785)$$

O cálculo do índice de iodo corresponde ao somatório das contribuições individuais de cada ácido gordo, obtidas pela multiplicação da percentagem de cada um pelo seu factor de contribuição.

6. Composição em ácidos gordos

A composição em ácidos gordos, tanto dos óleos refinados como dos azeites, consiste na adição de 1mL de amostra, 0,5 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) em metanol 9,1% e 10 mL de heptano. Agita-se, aguarda-se 20 minutos para que ocorra esterificação. Por último, retira-se 0,1 µL de sobrenadante e injecta-se no cromatógrafo de fase gasosa (GC). O tempo total de análise é de cerca de uma hora.

7. Composição em esteróis

A composição em esteróis, neste trabalho, é determinada em laboratório apenas para os azeites e demora aproximadamente 6 horas. Baseia-se essencialmente na saponificação da matéria gorda adicionada α -colestanol como padrão interno e hidróxido de potássio em solução alcoólica. De seguida, o insaponificável é extraído com éter etílico. A fracção esterólica é separada do extracto insaponificável por cromatografia em camada fina de gel de sílica básica. Os esteróis recuperados no gel sílica são transformados em trimetilsililéteres e analisados em cromatografia em fase gasosa (Regulamento (CE) nº. 702/2007 da Comissão de 21 de Junho de 2007).

A percentagem de um dado composto esterólico é calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Esterol} = \frac{A_x}{A} \times 100$$

A_x = área do pico x

A = soma das áreas de todo os esteróis

8. Estigmastadienos

Este parâmetro é determinado com base no Regulamento (CE) nº. 702/2007 da Comissão de 21 de Junho de 2007 apenas para os azeites virgens para detectar a presença de óleos vegetais refinados, uma vez que ao contrário destes últimos os azeites virgens não contém estigmastadienos. Este método baseia-se no isolamento da matéria insaponificável, seguido de separação da fracção que contém hidrocarbonetos esteróides por cromatografia em coluna de sílica gel e análise por cromatografia em fase gasosa.

A concentração de estigmastadienos é expressa em mg kg^{-1} (ppm), de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Estigmas (ppm)} = \frac{A_s \times M_s}{A_c \times M_0}$$

A_s = área do pico referente ao estigmastadieno

A_c = área do pico do padrão interno (colestadieno)

M_c = massa de padrão adicionada (μg)

M_0 = massa de azeite (g)

9. Eritrodiol e uvaol

A determinação do teor em eritrodiol e uvaol pode servir para detectar a presença de óleo de bagaço de azeitona em azeites virgens. Este método consiste na saponificação da matéria gorda com uma solução etanólica de hidróxido de potássio, sendo posteriormente o insaponificável extraído com éter etílico e purificado por passagem através da coluna de alumina. Proceda-se à separação do insaponificável por cromatografia em camada fina em placa de gel sílica, isolando-se as manchas correspondentes à fracção esterólica e à fracção do eritrodiol. Os esteróis e o eritrodiol recuperados da placa são convertidos nos respectivos éteres trimetilsilílicos, cuja mistura é analisada por cromatografia em fase gasosa. O resultado é expresso em percentagem de eritrodiol em relação ao conjunto eritrodiol mais esteróis (Regulamento (CE) nº. 702/2007 da Comissão de 21 de Junho de 2007).

A percentagem de eritrodiol e uvaol presente na amostra é calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{esteróis}}}$$

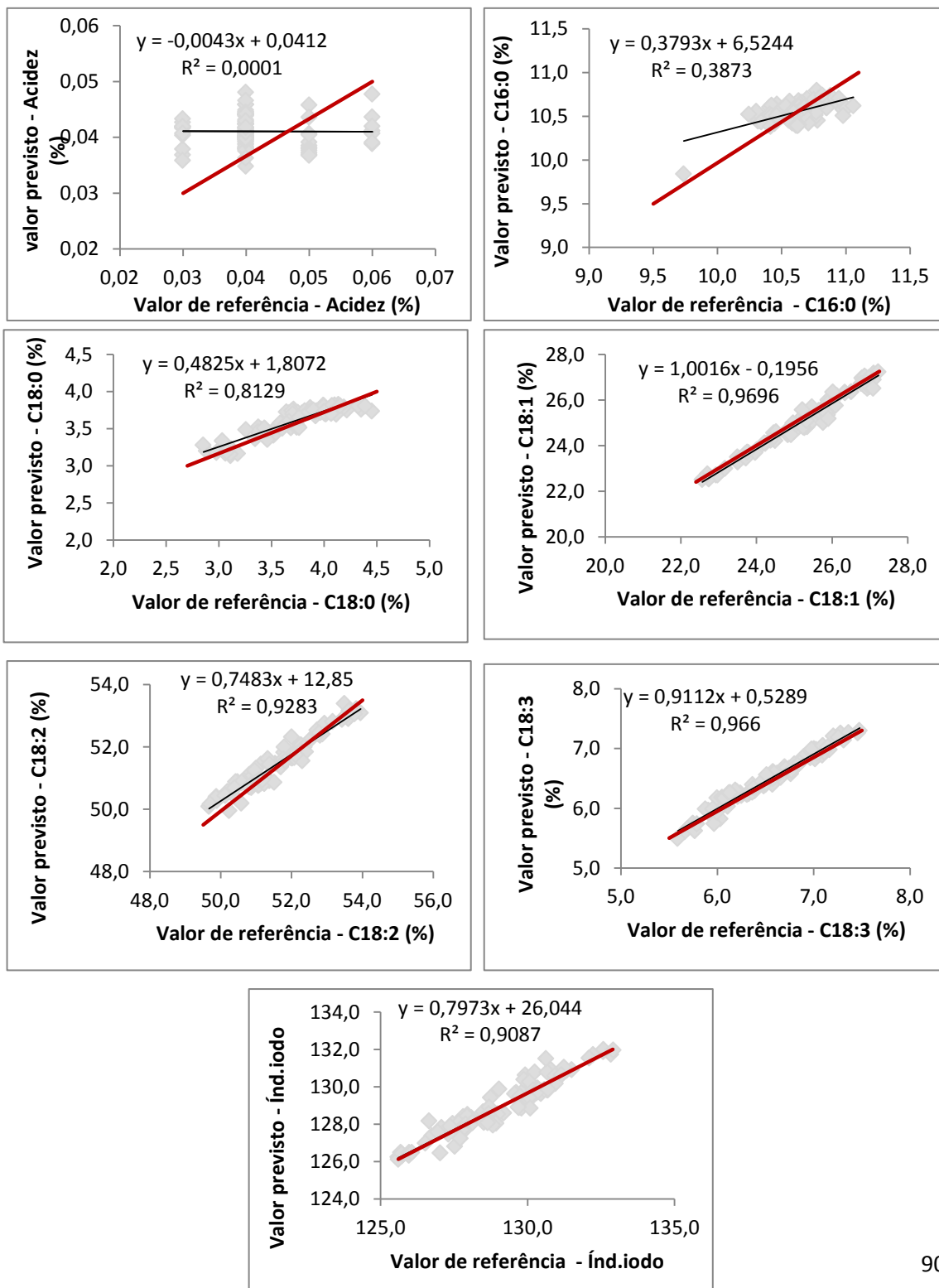
A_1 = área do pico do eritrodiol

A_2 = área do pico do uvaol

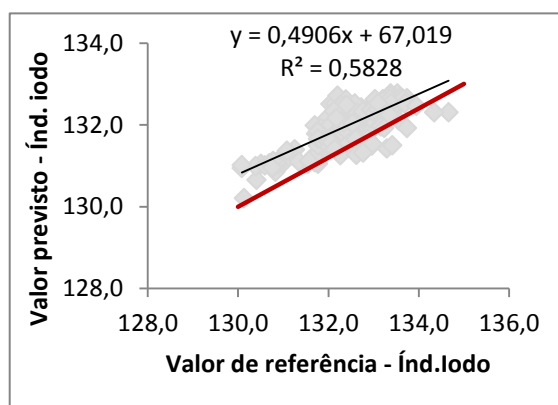
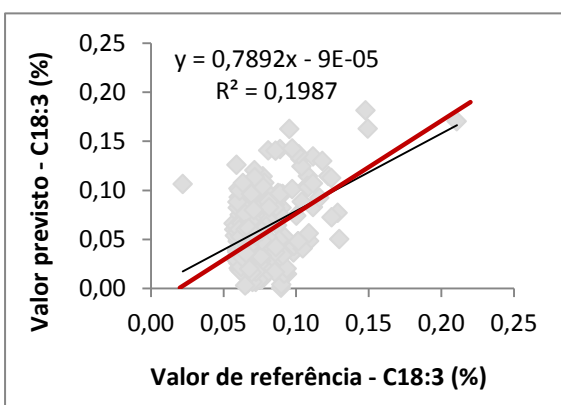
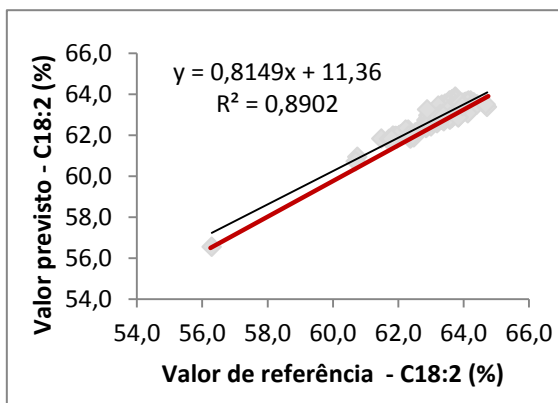
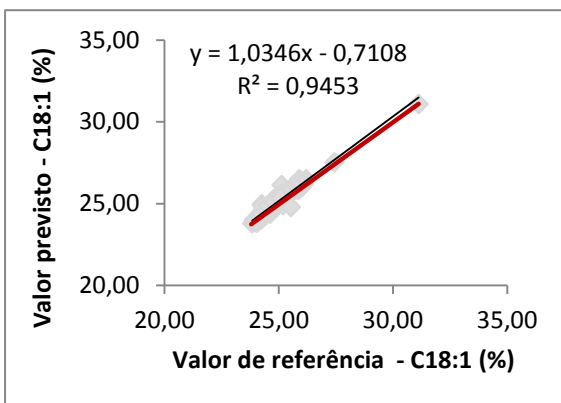
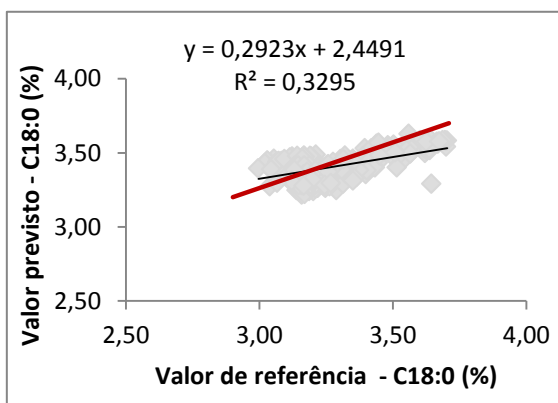
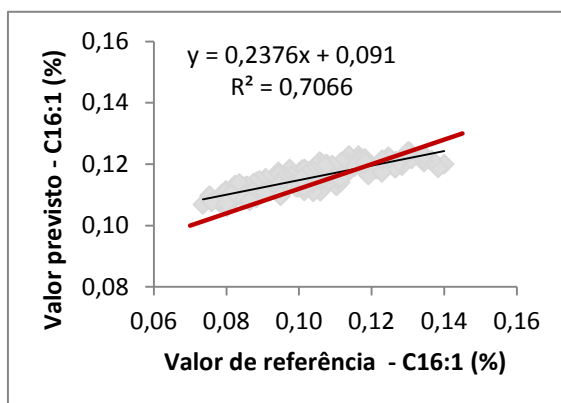
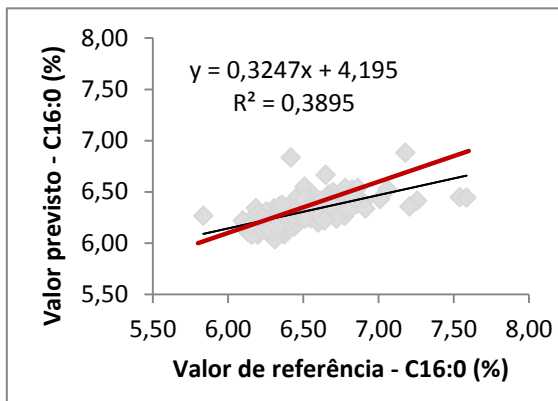
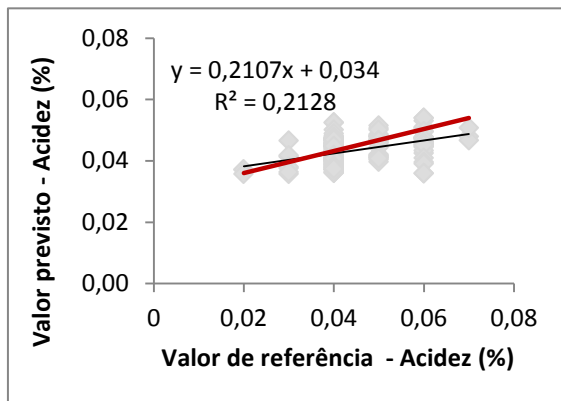
$\sum A_{\text{esteróis}}$ = somatório das áreas correspondentes aos esteróis

Anexo II. Gráficos relativos à correlação entre os valores preditos pelo FT-NIR e os valores obtidos pelos métodos de referência - validação externa dos modelos genéricos desenvolvidos pela *Bruker*. Nos gráficos, a linha preta corresponde à recta de calibração e a linha vermelha à linha de tendência.

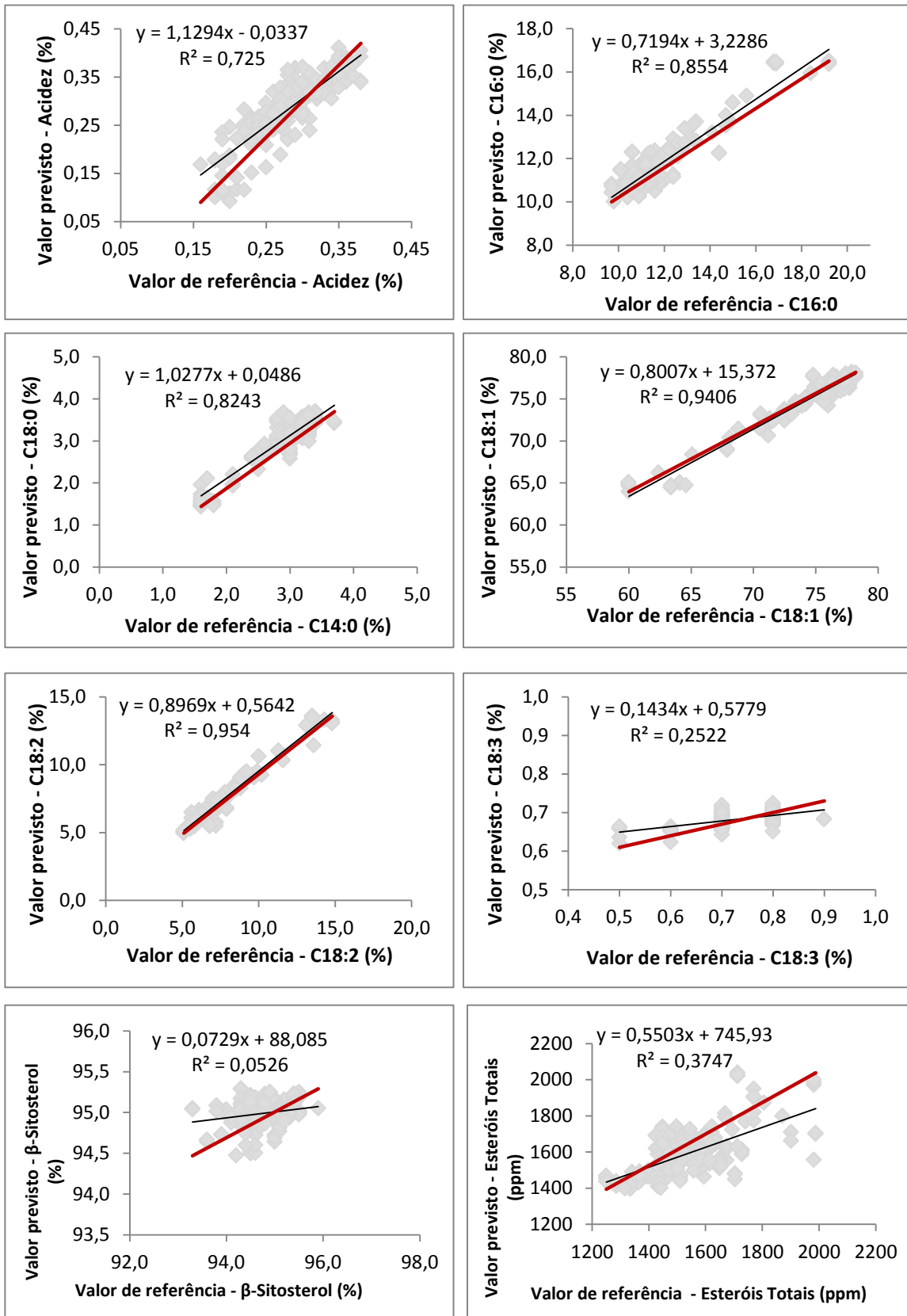
1. Óleo de soja refinado



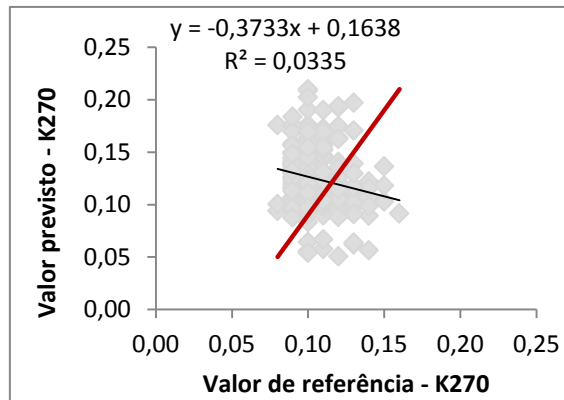
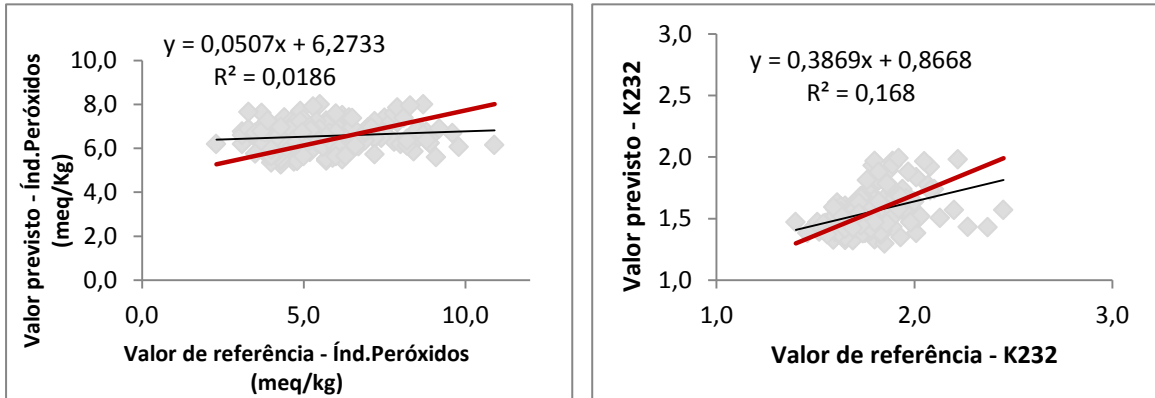
2. Óleo de girassol refinado



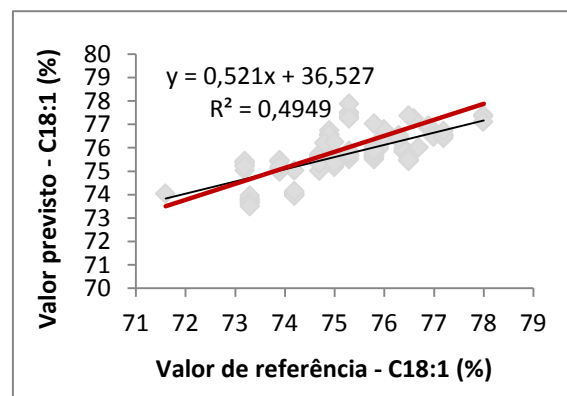
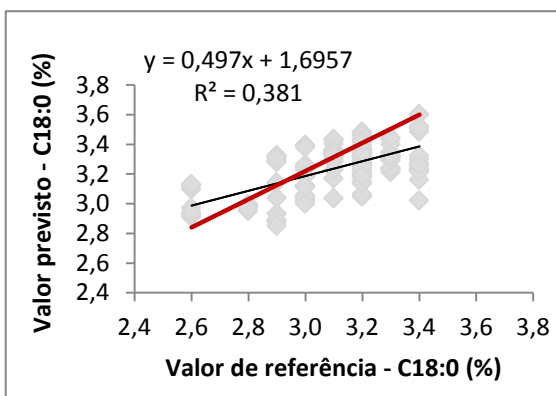
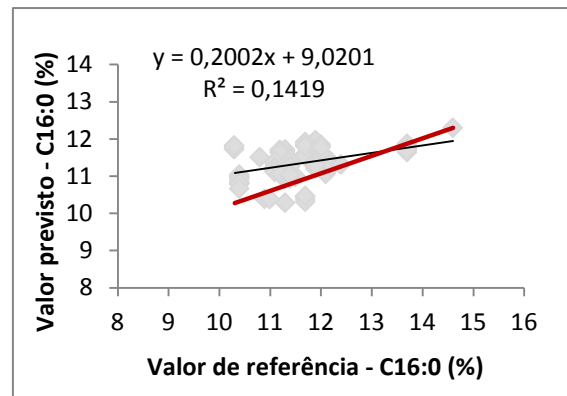
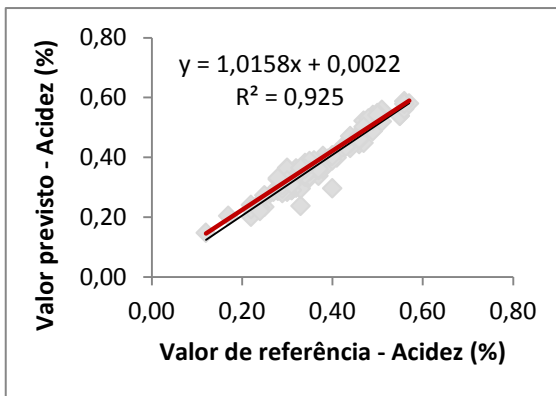
3. Azeite Virgem Extra



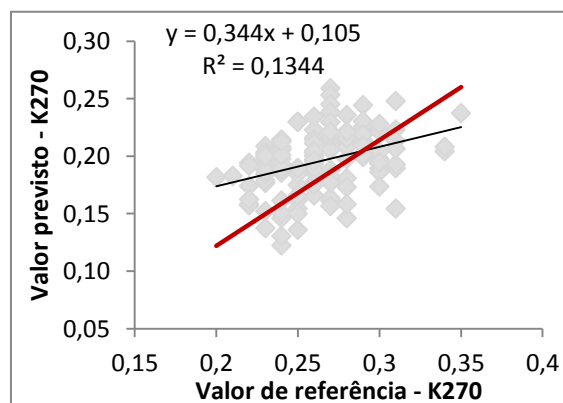
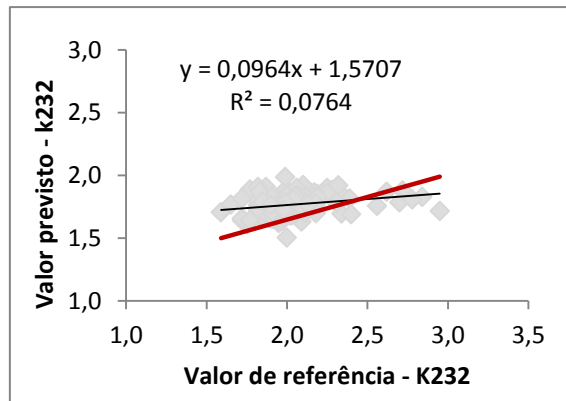
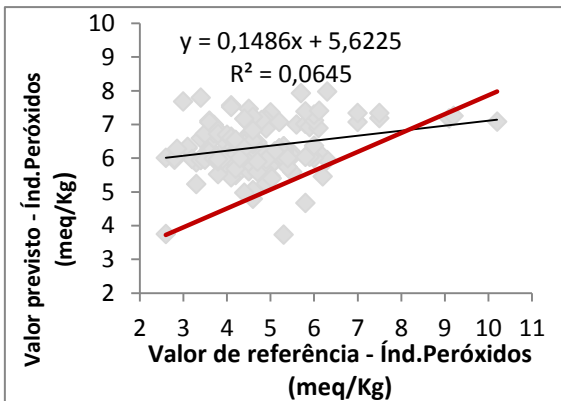
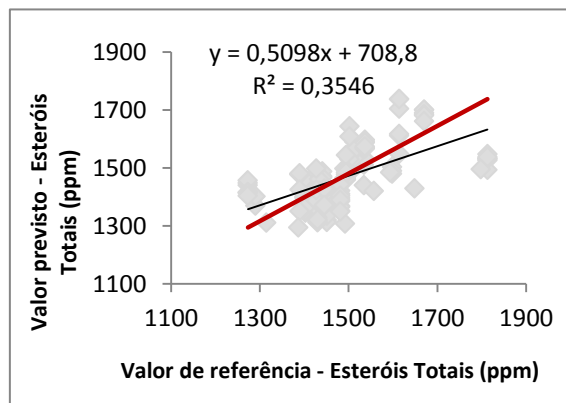
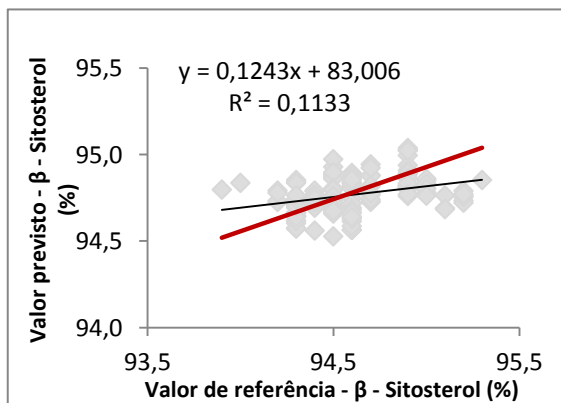
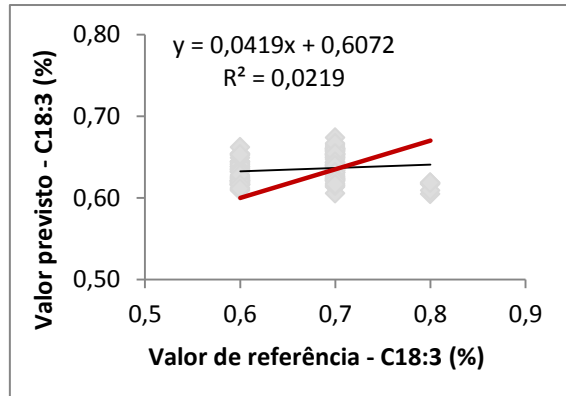
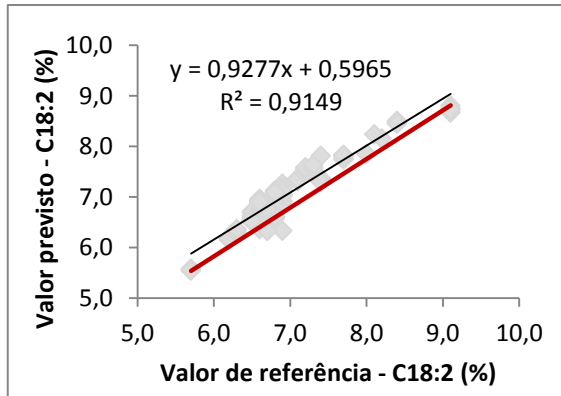
Caracterização de óleos vegetais e azeites através de espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR)



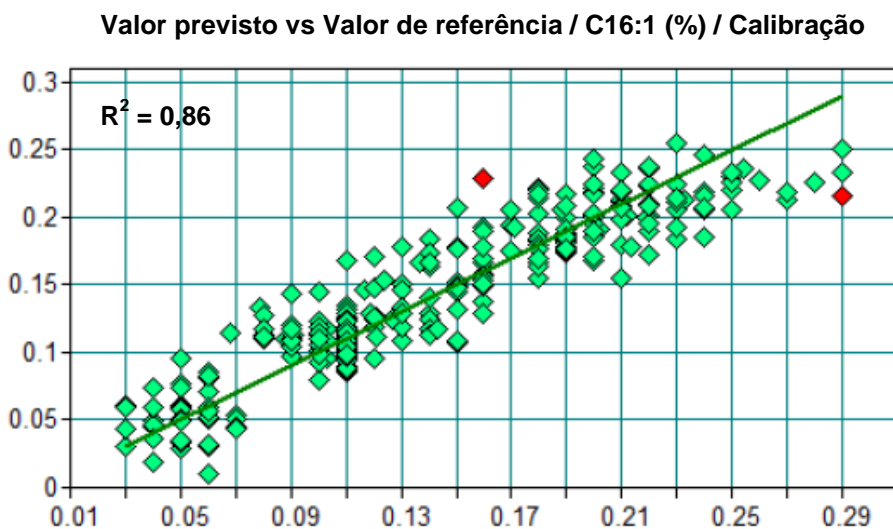
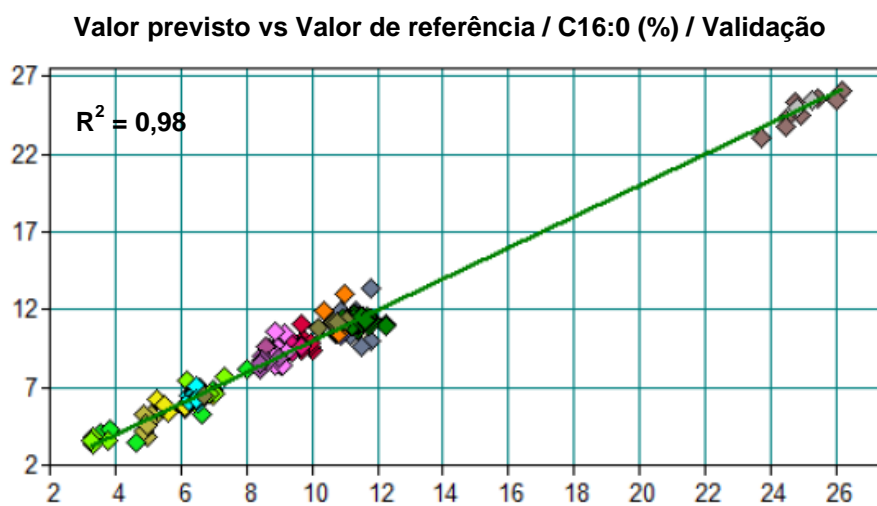
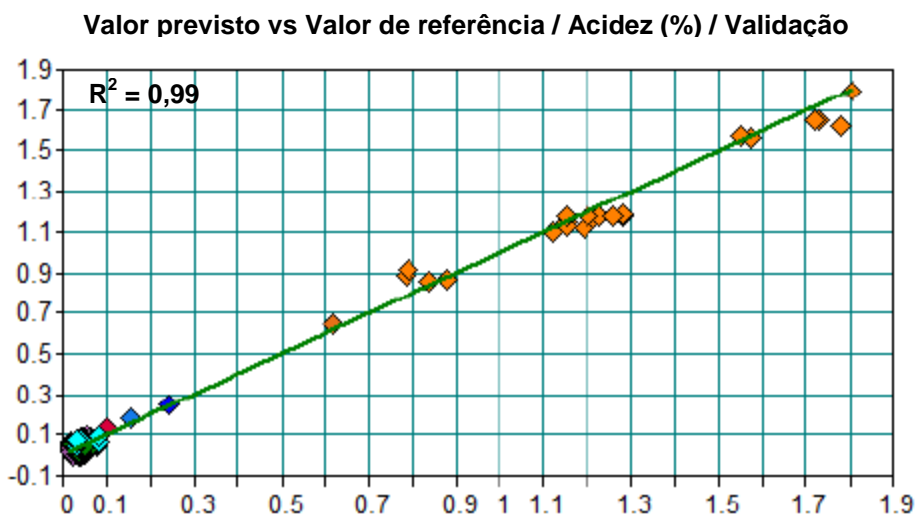
4. Azeite



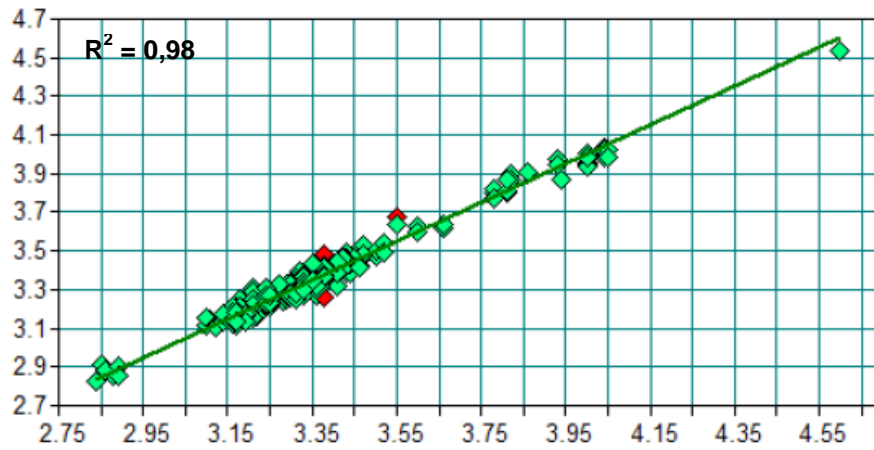
Caracterização de óleos vegetais e azeites através de espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR)



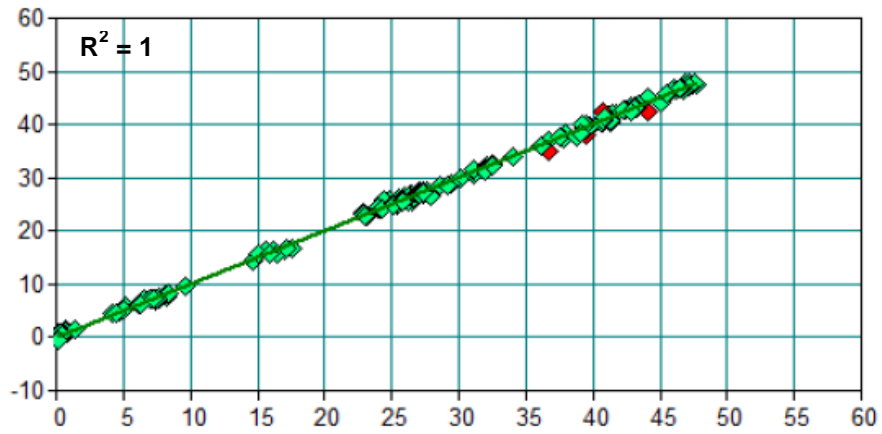
Anexo III. Gráficos relativos à correlação entre os resultados preditos pelo FT-NIR e os resultados obtidos pelos métodos de referência fornecidos pela *Bruker*.



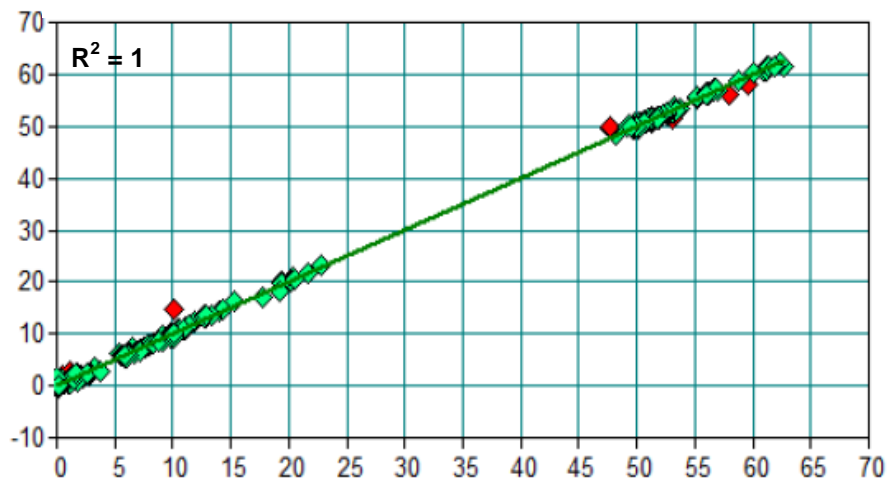
Valor previsto vs Valor de referência / C18:0 (%) / Calibração



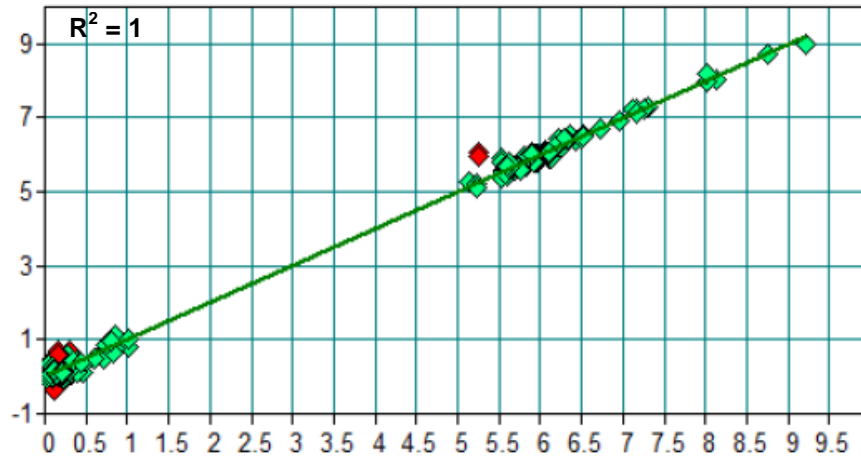
Valor previsto vs Valor de referência / C18:1 (%) / Calibração



Valor previsto vs Valor de referência / C18:2 (%) / Validação



Valor previsto vs Valor de referência / C18:3 (%) / Validação



Valor previsto vs Valor de referência/ índ.iodo/ Calibração

