

## ESPECTROSCOPIA RAMAN PORTÁTIL NO COMBATE A ADULTERAÇÃO DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM POR ÓLEO DE SOJA

### PORTABLE RAMAN SPECTROSCOPY TO COMBAT ADULTERATION OF EXTRA VIRGIN OLIVE OIL BY SOYBEAN OIL

<sup>1</sup>Iago Henrique Santos Barros

<sup>2</sup>Nayara Araujo dos Santos

<sup>3</sup>Hildegardo Seibert França

<sup>4</sup>Paulo Roberto Filgueiras

<sup>5</sup>Wanderson Romão

<sup>1</sup> Elkem ASA. E-mail: iagohbarros@gmail.com

<sup>2</sup> \*Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: nayara.ads@gmail.com

<sup>3</sup> Instituto Federal do Espírito Santo. E-mail: hildegardo.franca@ifes.edu.br

<sup>4</sup> Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: filgueiras.pr@gmail.com

<sup>5</sup> Instituto Federal do Espírito Santo. E-mail: wanderson.romao@ifes.edu.br

Artigo submetido em 22/03/2023, aceito em 15/06/2023 e publicado em 01/11/2023.

**Resumo:** A adulteração de alimentos é uma prática fraudulenta aplicada desde os tempos remotos, e um dos principais alvos é o azeite de oliva extravirgem (AOEV). Entre os potenciais adulterantes do AOEV está o óleo de soja. Em geral, para identificar adulterações em AOEV são utilizadas técnicas clássicas como a cromatografia a gás, no entanto, técnicas alternativas, principalmente com menor valor comercial, e que forneçam uma resposta rápida, *in loco*, e de caráter não destrutivo, como a espectroscopia Raman que combinada a análise de dados multivariados, vêm sendo empregadas para auxiliar no controle de qualidade do AOEV. Assim, no presente estudo utilizou-se um espectrômetro Raman portátil e métodos multivariado de dados para quantificar óleo de soja em amostras de AOEV apreendidas pela Polícia Civil do estado do Espírito Santo. Para isso, foram propostos três modelos: *Partial least square* (PLS) sem pré-tratamento, PLS com *Multiplicative Scatter Correction* (MSC) e PLS com *Standard Normal Variate* (SNV). Entre estes, o modelo PLS com o SNV apresentou menor erro de predição e maior linearidade dos dados, tanto de calibração (0,9985) quanto de predição (0,9842), e baixos limite de detecção (1,8031 wt%) e quantificação (6,0104 wt%). Os principais coeficientes positivos e negativos para quantificação de óleo de soja observados foram as bandas 1266  $\text{cm}^{-1}$  e 1656  $\text{cm}^{-1}$ ; e as bandas 1440  $\text{cm}^{-1}$  e 1302  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Por fim, foi possível verificar a presença do adulterante óleo de soja (com uma porcentagem média de 94,5 wt%) em 59 exemplares das cinco diferentes marcas.

**Palavras-chave:** apreensão; quimiometria; adulteração; alimento; Raman portátil.

**Abstract:** Food adulteration is a fraudulent practice applied since ancient times, and one of the main targets is extra virgin olive oil (EVOO). Among the potential adulterants of EVOO is soybean oil. In general, classical techniques such as gas chromatography are used to identify adulterations in EVOO,

however, alternative techniques, mainly with less commercial value, and that provide a quick, in loco, and non-destructive response, such as Raman spectroscopy which combined with multivariate data analysis have been used to assist in the quality control of EVOO. Thus, in the present study, a portable Raman spectrometer and multivariate data methods were used to quantify soybean oil in EVOO samples seized by the Civil Police of the state of Espírito Santo. For this, three models were proposed: *Partial least square* (PLS) without pre-treatment, PLS with Multiplicative Scatter Correction (MSC), and PLS with *Standard Normal Variate* (SNV). Among these, the PLS model with the SNV showed a lower prediction error and greater data linearity, both for calibration (0.9985) and prediction (0.9842), and low detection limits (1.8031 wt%) and quantification (6.0104 wt%). The main positive and negative coefficients for the quantification of soybean oil observed were the bands 1266  $\text{cm}^{-1}$  and 1656  $\text{cm}^{-1}$ ; and the bands 1440  $\text{cm}^{-1}$  and 1302  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. Finally, it was possible to verify the presence of the adulterant soybean oil (with an average percentage of 94.5 wt%) in 59 copies of the five different brands.

**Keywords:** seizure; chemometrics; adulteration; food; Portable Raman.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos a adulteração dos alimentos esteve presente no cotidiano da população. Os principais alvos dessa prática fraudulenta são os produtos de alto valor agregado, como por exemplo o azeite de oliva extravirgem (AOEV). Originado da oliveira *Olea europaea* L., o AOEV é um alimento presente na culinária mundial, tendo seus primórdios na região da antiga Mesopotâmia (destacando Tunísia, Egito e Síria) (JUNIOR *et al.*, 2009).

O grande valor nutracêutico somado com o complexo processo de fabricação faz com que o AOEV apresente um alto valor comercial. Além disso, o cultivo da oliveira *Olea europaea* L. ocorre em condições climáticas bem específicas, fazendo com que poucos países sejam capazes de produzir o azeite em larga escala. Nesse cenário, um dos principais importadores do azeite é o Brasil (AUED-PIMENTE *et al.*, 2017; INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL, 2020).

De acordo com o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o AOEV deve apresentar características físico-químicas bem delimitadas para sua classificação. Além disso, é proibido a mistura do produto com qualquer outro tipo óleo vegetal. (DUTRA, DUARTE e SOUZA, 2014; BRASIL – Ministério da Saúde, 2005).

A facilidade de homogeneização e o baixo custo fazem com que os óleos provenientes de outros grãos sejam os principais adulterantes do AOEV. No Brasil, a alta produção do óleo de soja e, conseqüentemente, o baixo custo de mercado fazem com que esse óleo seja utilizado nas práticas fraudulentas. (AUED-PIMENTE, *et al.*, 2017; ARLORIO *et al.*, 2010).

Em geral a verificação da pureza do AOEV pode ser realizada por uma série de equipamentos clássicos, como cromatografia a gás (CG) ou cromatografia líquida (CL), (YANG, *et al.*, 2013; CARRANCO, *et al.*, 2018) instrumentos que podem demandar um alto investimento tanto para aquisição, como para manutenção (consumo de solventes e gases (CG)), além do possível dispendioso tempo de preparo de amostra. Assim, torna-se necessário a utilização de técnicas analíticas confiáveis, robustas, rápidas e menos custosas para auxiliar na identificação de adulterações em AOEV. (CODEX ALIMENTARIUS, 2015; FRANKEL, 2010).

Nesse cenário, as técnicas espectroscópicas, como a espectroscopia na região do infravermelho próximo, do inglês *Near Infrared Spectroscopy* (NIR) e Raman vêm ganhando relevância em pesquisas envolvendo alimentos. Uma das vantagens de utilizar a espectroscopia Raman em análises forenses é o fato da molécula de água ser inativa e não

apresentar banda de absorção Raman. (LOHUMI *et al.*, 2015)

Desenvolvido pelo cientista indiano Venkata Raman em 1928, a espectroscopia Raman é baseada no movimento vibracional molecular. Ao irradiar a amostra por um feixe luminoso, uma pequena parte da radiação é espalhada com energia diferente da energia incidente. O espalhamento inelástico, assim denominado, fornece a energia fundamental vibracional molecular, possibilitando identificar os compostos químicos presentes na amostra. Cerca de 99,999% da radiação é espalhada sem variação da energia incidida de forma elástica, não fornecendo informação química da amostra. Assim, como é necessário, uma fonte energética intensa para identificar o fenômeno, a espectroscopia Raman foi popularizada com o desenvolvimento do *laser* em 1960 (KAUFFMANN, KOKANYAN, FONTANA, 2019; BUMBRAH, SHARMA, 2016; SHIPP, SINJAB, NOTINGHER, 2017).

Além disso, os avanços tecnológicos também permitiram a miniaturização e portabilidade dos instrumentos analíticos, como a própria técnica Raman. Os primeiros dispositivos portáteis foram desenvolvidos nos anos de 1990, sendo utilizados em larga escala na identificação de explosivos após os ataques do World Trade Center, em 2001 (CROCOMBE, 2018).

Outra característica proveniente do desenvolvimento da tecnologia é a grande quantidade de dados obtidas pelas análises. Assim, a necessidade de obter as informações em meio ao grande número de dados fez com que uma área da química, em conjunto com a estatística e computação, originassem uma nova área da ciência: a Quimiometria (BARROS NETO, SCARMINIO, 2006).

As áreas da Quimiometria, com grande destaque em análises químicas são: reconhecimento de padrões, tendo a análise por componentes principais, do inglês

*Principal Componentes Analysis* (PCA) como método muito difundido, bem como a calibração multivariada, utilizando a resposta instrumental para prever diferentes grandezas, tendo a regressão por mínimos quadrados parciais, do inglês *Partial least square* (PLS) como principal ferramenta.

Antes de realizar as técnicas quimiométricas, os dados passam por tratamentos matemáticos, a fim de eliminar respostas ruidosas e informações que não serão utilizadas na modelagem computacional. Entre os pré-processamentos mais utilizados, de acordo com a literatura, destacam-se o *Standard Normal Variate* (SNV) e o *Multiplicative Scatter Correction* (MSC), utilizados para reduzir o efeito de espalhamento indesejável (SOUZA, POPPI, 2012; FERREIRA *et al.*, 1999).

Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo identificar e prever a concentração de óleo de soja em 59 amostras de AOEV comerciais de cinco marcas apreendidas pela Polícia Civil do estado do Espírito Santo no ano de 2019 utilizando a espectroscopia Raman e análise de dados multivariados, bem como propor esta metodologia para controle de qualidade de amostras de AOEV.

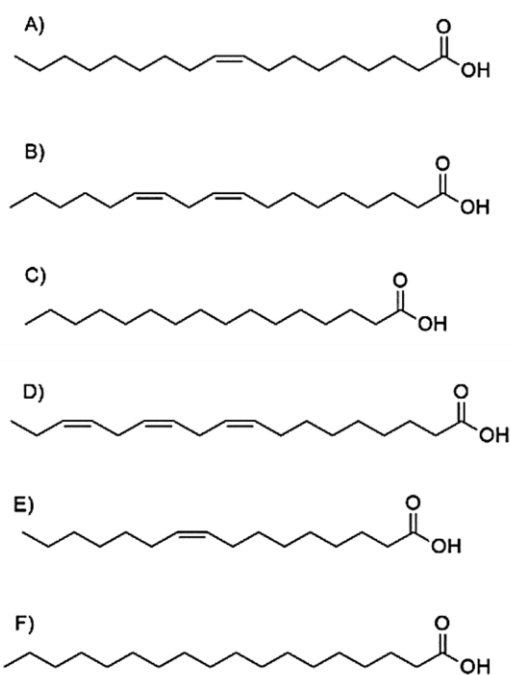
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

As pesquisas envolvendo o AOEV vêm ganhando relevância nos últimos anos. As propriedades nutracêuticas, somadas as fraudes envolvendo o azeite, fazem com que as novas técnicas sejam utilizadas para facilitar e acelerar os processos de análise da qualidade do azeite (LI *et al.*, 2020).

Os ácidos graxos que compõem o AOEV são estruturas de cadeias carbônicas longas, geralmente apresentando entre 16 e 18 carbonos, podendo ser saturados ou insaturados. Esses ácidos correspondem em até 1% de todo o AOEV, em massa. Os principais ácidos graxos presentes no azeite de oliva extravirgem estão

apresentados na **Figura 1**. (BOSKOU, BLEKAS, TSIMIDOU, 2006)

Figura 1: Principais ácidos graxos de azeite de oliva extravirgem: (A) ácido oleico, (B) ácido linoleico, (C) ácido palmítico, (D) ácido linolênico, (E) ácido palmitoleico (E) e (F) ácido esteárico.



Fonte: Adaptado de Boskou, Blekas, Tsimidou, (2006).

Em algumas regiões, de acordo com as condições do plantio, o azeite tende a possuir uma concentração maior de ácido linoleico e menor proporção de ácido oleico, como por exemplo ocorre na Tunísia. Em outros países, o produto pode possuir maior concentração de ácido oleico. De acordo com o Conselho Oleícola Internacional, juntamente com a Codex Alimentarius, existem proporções aceitáveis para os diferentes ácidos carboxílicos no azeite de oliva extravirgem, conforme pode ser conferido na **Tabela 1**. Tal órgão também limita a concentração de compostos de isomeria *trans* no azeite, sendo essa concentração inferior a 0,05% em ácidos contendo 18 carbonos de até três insaturações. As mesmas proporções também são adotadas no Brasil, conforme a Instrução normativa 1/2012, disponibilizada pelo Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela RDC Nº 270 de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgãos responsáveis pela fiscalização da qualidade desse produto no país (BOSKOU, BLEKAS, TSIMIDOU, 2006; BRASIL, 2005; VANSTONE, 2018).

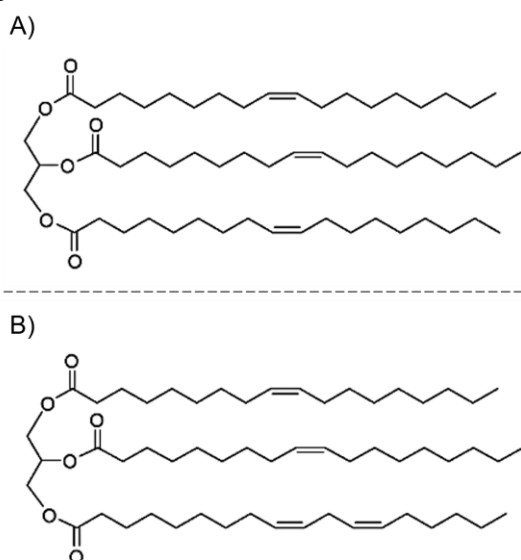
Tabela 1: Proporções dos principais ácidos graxos permitidos no azeite de oliva extravirgem

Ácido graxo	Nº carbono	Nº insaturações	% Mínima	% Máxima
Oleico	18	1	55	83
Linoleico	18	2	3,5	21
Palmítico	16	0	7,5	20
Linolênico	18	3	< 0,05	1
Palmitoleico	16	1	0,3	3,5
Esteárico	18	0	0,5	5

Fonte: BRASIL – ANVISA (2005).

Além da concentração dos ácidos graxos, as proporções dos triacilglicerídeos também possuem limites pré-estabelecidos para que o azeite de oliva extravirgem possa ser comercializado. Os principais TAGs que constituem o azeite de oliva extravirgem são formados pelos três ácidos oleicos, denominado trioleína (OOO), correspondendo de 40 a 59% de todos os triacilglicerídeos. Entre os outros triacilglicerídeos em menores proporções, destacam-se o dioleoil-palmitoil glicerol (POO) em concentrações de 12 a 20%, dioleoil-linoleoil-glicerol (OOL) em 12,5 a 20%, palmitoil-oleoil-linoleoil-glicerol (POL) em 5,5 a 7% e dioleoil-estearoil-glicerol (SOO) em proporções de 3 a 7%. A estrutura da trioleína e dioleoil-linoleoil-glicerol está representada na **Figura 2**. (MAGGIO, 2014)

Figura 2: Estrutura dos triaglicérides (A) trioléina e (B) dioleoil-linoleoil-glicerol.



Fonte: Adaptado de Maggio *et al.* (2014).

As primeiras pesquisas envolvendo a espectroscopia Raman juntamente com a quimiometria na avaliação da qualidade do azeite de oliva foram dos anos 2000. Davies e colaboradores utilizaram a espectroscopia Raman com transformada de Fourier para avaliar a adulteração de AOEV grego por óleo de soja e óleo de girassol. Para isso, foi utilizados técnicas de classificação, *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) e predição por PLS. Os autores obtiveram limites de detecção inferiores a 2wt% de adulterante (DAVIES, MCINTYRE, MORGAN, 2000).

Em 2001, Yang e Irudayaraj avaliaram diferentes técnicas espectroscópicas para quantificar óleo de bagaço de azeite em AOEV. Para isso, foi criada uma curva de calibração com 21 diferentes pontos, de 0 a 100 wt% com o incremento de 5wt%. A espectroscopia Raman apresentou melhores figuras de mérito, com erro abaixo de 1,5 wt% e coeficiente de correlação de 0,997 (YANG, IRUDAYARAJ, 2001).

Heise e colaboradores (2005) utilizaram a espectroscopia Raman com transformada de Fourier para quantificar

óleo de girassol em AOEV. Os autores utilizaram seleções de variáveis espectrais para reduzir a quantidade de dados a serem processados, além de melhorar a capacidade preditiva do modelo. A técnica de seleção para o estudo foi a *Tabu search*, obtendo erro de predição de 1,4 wt%. (HEISE *et al.*, 2005)

Zhang e colaboradores (2011) utilizaram um instrumento portátil equipado com laser de diodo para quantificar diferentes adulterantes, como óleo de soja, girassol e milho em AOEV. O coeficiente de correlação das curvas de predição foram de 0,9956, 0,9915 e 0,9905, respectivamente, com erro inferior a 2 wt%. Os autores também destacaram a variação no espectro Raman com as diferentes concentrações de outros óleos vegetais no azeite de oliva, sendo possível observar a maior intensidade da banda de  $1266\text{ cm}^{-1}$  a medida que a concentração de adulterantes aumenta. Isso se deve pela espectroscopia Raman ser diretamente proporcional a concentração dos compostos ativos. A região de  $1266\text{ cm}^{-1}$  é caracterizada pelo modo vibracional de insaturação na cadeia carbônica, justificada pela maior concentração de compostos insaturados nos adulterantes (ZHANG *et al.*, 2011).

O perfil dos ácidos graxos também foi discutido por Sanchez e colaboradores (2016). Os autores quantificaram os compostos poli-insaturados em blends de AOEV com diferentes óleos vegetais, possibilitando identificar amostras fraudulentas por meio da regressão por mínimos quadrados parciais (SANCHEZ *et al.*, 2016).

Duraipandian, Petersen, e Lassen (2019) desenvolveram um estudo utilizando a técnica espectroscopia Raman combinada com estatística multivariada, para avaliar a autenticidade (pureza) e a concentração de AOEV adulterado com um ou mais adulterantes (óleos comestíveis mais baratos), com preparações de diferentes concentrações de AOEV (10-100% v/v). Como resultado, um banco de

dados espectral Raman de amostras de óleo (214 espectros) foi obtido a partir de 11 misturas binárias (AOEV e óleo de canola), 16 misturas ternárias (AOEV, óleo de canola e milho) e 44 misturas quaternárias (AOEV, óleo de canola, milho e soja). Além disso, o modelo PLS forneceu erros quadráticos médios de 3,6%, 2,8% e 4,3%, para os conjuntos de dados de calibração binária, ternária e quaternária, respectivamente, e a pureza das amostras de AOEV enriquecidas foi estimada com erro de previsão de 5,2% para o conjunto de dados de calibração e 5,1% para o conjunto de teste. (DURAIPANDIAN, PETERSEN, LASSEN, 2019).

Utilizaram a espectroscopia Raman portátil para identificar a adulteração de AOEV. Para isso, avaliaram oito amostras de AOEV e quatro amostras de óleos compostos (misturas de óleo de soja com AOEV) de diferentes marcas comerciais. Os autores construíram curvas analíticas com diferentes concentrações, variando de 0 a 100% em peso de óleo vegetal em AOEV. Entre os modelos construídos, o partial least squares by intervals (iPLS) apresentou os melhores resultados analíticos, com  $R^2_p$  de 0,9967 e os erros médios de predição (RMSEP) de 0,0198 wt%, além dos limites de detecção e quantificação de 0,9731 e 3,2436 wt%, respectivamente. Nas amostras comerciais avaliadas, sete apresentaram concentrações de óleo de soja superiores ao rótulo do fabricante, indicando assim a adulteração do produto. (BARROS, *et al.*, 2021).

Wu e colaboradores (2023) utilizaram a combinação da espectroscopia Raman amplificado em superfície e quimiometria para conduzir análises qualitativas e quantitativas de plastificantes em AOEV. Entre os modelos avaliados: partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), k-nearest neighbours (KNN), e support vector machine (SVM), o SVM foi considerado o melhor modelo de classificação, com uma taxa de classificação correta de 100%. Para o

modelo de predição da concentração de plastificante estabelecido por PLS o  $R_p$  2 foi superior a 0,97, e a raiz quadrada média do RMSEP inferior a 3,632. Além disso, o método proposto foi validado por GC-MS usando teste. Assim, os autores concluíram a eficiência da combinação da técnica Raman com quimiometria para identificação e quantificação de plastificantes em AOEV. (WU *et al.*, 2023)

### 3 PROCESSOS METODOLÓGICOS/MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS

A amostra padrão de AOEV utilizada para construção do modelo quimiométrico foi da marca O-live® (Olisur Del Sur S.A – Santiago, Chile), uma vez que esta foi aprovada nos últimos sete anos em todos os critérios pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e o óleo de soja utilizado foi da marca Liza® (Cargil Agrícola S. A. – Mairinque, São Paulo). Foram analisadas 59 amostras de AOEV apreendidas pela polícia em diferentes estabelecimentos do estado do Espírito Santo, pertencentes a cinco diferentes marcas: Serra de Montejunto®, Oliveiras do Conde®, Porto Gallo®, Fazenda Herdade®, e Anna®. As amostras foram nomeadas de forma aleatória, com designação de A1 (total de 20 amostras), A2 (16 amostras), A3 (5 amostras), A4 (6 amostras), e A5 (12 amostras). Em cada amostra foi realizada a leitura em triplicata, resultando em 183 espectros das amostras, sendo 177 espectros das amostras apreendidas, três espectros do AOEV utilizado como referência, e três espectros do óleo de soja). Todas as análises no espectrômetro Raman não necessitaram de preparo. Após a aquisição dos dados foi obtida a média de cada triplicata, e o cálculo da média de cada amostra apreendida. Os resultados foram plotados com o *software* Origin 8.5, a fim de verificar seus respectivos perfis

espectrais. Os dados de AOEV e do óleo de soja foram utilizados na construção da curva de calibração, para quantificação do adulterante (óleo de soja) nas 59 amostras investigadas.

Para a construção da curva de calibração, foram preparadas misturas binárias do AOEV utilizado como referência e do óleo de soja comercial. No total, 19 diferentes concentrações foram obtidas, preparadas em triplicata, obtendo o total de 57 amostras. A massa final de cada amostra foi de aproximadamente 1 grama. Após serem pesadas, as amostras foram homogeneizadas por um vórtex e analisadas em um acessório do equipamento denominado porta vial.

### 3.2 INSTRUMENTO

A obtenção dos espectros Raman foi realizada utilizando o instrumento portátil CloudMinds AI Raman Spectrometer XI MR, operando com o comprimento de onda de 785 nm, e potência variável do *laser* de 1 a 500 mW, com região espectral de 200 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ . O aparelho é equipado com *laser* de diodo, operando a 785 nm, com resolução espectral de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Sua dimensão é semelhante à de um smartphone, pesando cerca de 400 gramas.

Após as análises, os dados foram transferidos do instrumento para o computador, realizando as análises pelo *software* Matlab 2013 (Mathworks, EUA) com PLS\_toolbox, (WISE *et al.* 2007), e Origin 8.5 PRO (Origin Lab Corporation, EUA).

### 3.3 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

Os 183 espectros foram tratados e modelados com o objetivo de construir um modelo robusto e capaz de prever a concentração de óleo de soja nas amostras apreendidas. Antes mesmo de fazer o modelo, os dados passaram por diferentes pré-processamentos a fim de eliminar

efeitos indesejados. Para isso, foram propostos dois diferentes pré-processamentos. Primeiramente, o MSC para realizar a correção espectral por meio de um espectro de referência. Nesse método, é realizado um ajuste linear do espectro, sendo descontados os parâmetros lineares e angulares do espectro a ser tratado. O segundo foi o SNV, que realiza a padronização espectral descontando a média das absorvâncias de cada comprimento de onda, dividida pelos seus respectivos desvios padrões.

Além disso, foi proposto três diferentes modelos a fim de verificar qual melhor se ajustaria com os dados obtidos: PLS sem pré-tratamento, PLS com MSC e PLS com SNV. Para isso, foram feitas misturas binárias AOEV/óleo de soja em 19 diferentes concentrações em triplicata, sendo essas 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 e 100 wt% de óleo de soja, isto é, em razão massa sobre massa (wt%). Dos 57 pontos da curva, 39 foram utilizados para construir o modelo de calibração (totalizando 13 diferentes amostras) e 18 para avaliar o poder de previsão do modelo. A divisão foi realizada pelo método Kennard-Stone, destinando cerca de 70% do conjunto amostral para a calibração do modelo e 30% para avaliar a capacidade preditiva dele (KENNARD and STONE, 1969; DE SOUSA *et al.*, 2011).

Após a separação das amostras em treinamento e teste, é necessário determinar o número de fatores que descreverão o máximo de informações conjuntas entre a resposta espectral com o método de referência. O número de variáveis latentes, assim denominadas, foi determinada pela validação interna (*Cross Validation*), pelo método veneziano blind (k-fold, k=5). Para a determinação do número ideal de variáveis latentes calculou-se a raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada, do inglês *Root Mean Square Error of Cross Validation* (RMSECV), com base nos valores previstos pelo conjunto de

calibração.(DE BLEYE *et al.*, 2012; CONCEIÇÃO *et al.*, 2014).

Para comparar os modelos, foram utilizadas métricas de validação, avaliando a capacidade preditiva deles, como linearidade dos dados selecionados para calibração ( $R^2c$ ), predição ( $R^2p$ ). Os erros médios de calibração (RMSEC) e RMSEP também foram calculados, além dos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), baseados nos parâmetros da curva analítica, conforme as equações 1-2 a seguir (RIBEIRO *et al.* 2008; DE BLEYE, 2012; WOLD, SJÖSTRÖM, ERIKSSON, 2001).

$$LD = 3.3\delta x \frac{1}{\text{sensibilidade}} \quad (\text{equação 1})$$

$$LQ = 10\delta x \frac{1}{\text{sensibilidade}} \quad (\text{equação 2})$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

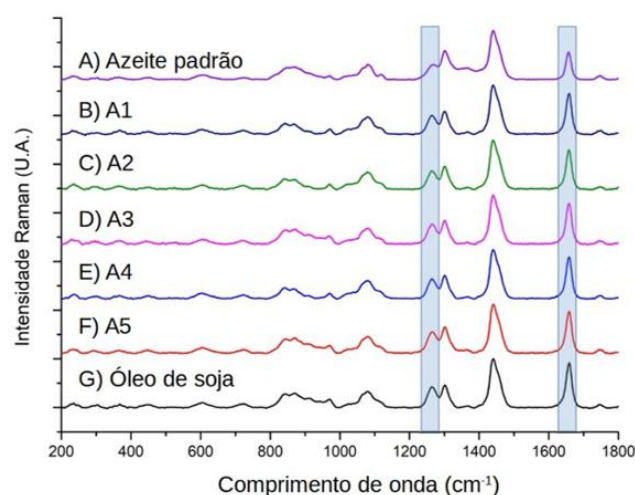
### 4.1 RESPOSTA RAMAN

A **Figura 3** demonstra o espectro médio do AOEV (A), das cinco marcas de azeite de oliva comerciais apreendidas (B-F) e do óleo de soja (G). É possível observar a similaridade dos modos vibracionais entre todas as amostras. Em algumas bandas, o óleo de soja e as amostras apreendidas apresentam um padrão diferente quando comparado ao AOEV.

As bandas em destaque (1266 e 1656  $\text{cm}^{-1}$ ) possuem uma maior intensidade nas amostras de azeite comercial e no óleo de soja, quando comparadas com a amostra de AOEV. Nessa região espectral, caracteriza-se os modos vibracionais das insaturações, sendo em 1266  $\text{cm}^{-1}$  presente a deformação angular =C-H, enquanto em 1656  $\text{cm}^{-1}$  o modo vibracional presente é a deformação *cis*-RHC=CHR. A justificativa para essa diferença espectral é a maior concentração de compostos poli-insaturados nos óleos

vegetais, como a alta concentração de dioleoil-linoleoil-glicerol e ácidos graxos com maior número de insaturações na cadeia carbônica. Já o AOEV, por sua vez, apresenta a maior concentração de triacilglicerídeos monoinsaturados, como a trioleína e o ácido oleico (ZHANG *et al.*, 2011; TIRYAKI, AYVAZ, 2017; OMAR *et al.*, 2012).

Figura 3: Resposta Raman das amostras analisadas: (A) AOEV, (B-F) amostras comerciais apreendidas, e (G) óleo de soja comercial. A região em destaque demonstra as bandas responsáveis pelas insaturações.



Fonte: Próprio autor

### 4.2 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

Os resultados dos modelos PLS com os diferentes pré-processamentos estão dispostos na **Tabela 2**. Em cada modelo proposto foi realizada a validação interna, obtendo assim o número ótimo de variáveis latentes que descrevem as informações obtidas no conjunto de dados. Após a determinação do número de variáveis latentes, sequencialmente foram obtidas as métricas de calibração e predição, assim como avaliados os erros sistemáticos e tendenciosos.

A partir da avaliação dos erros dos modelos propostos, foi possível verificar que não há erro sistemático, uma vez que o



valor de  $t$  calculado obtido está inferior ao  $t$  tabelado. Ainda, o  $p$  valor para o teste de tendência também demonstrou não haver erros tendenciosos para os modelos propostos.

Tabela 2: Figuras de mérito dos modelos utilizados na predição de óleo de soja no azeite de oliva extravirgem

Modelo	PLS	PLS MSC	PLS SNV
Número de variáveis	801	801	801
RMSEC (wt%)	2,0185	1,8047	1,3081
R <sup>2</sup> c	0,9963	0,9973	0,9985
Bias calibração	0	0	0
RMSEP (wt%)	3,3546	3,064	3,0527
R <sup>2</sup> p	0,9809	0,9839	0,9842
Bias predição	-0,2632	-0,6129	-0,2856
LD (wt%)	1,6466	2,0312	1,8031
LQ (wt%)	5,4887	6,7706	6,0104
Variáveis latentes	4	5	5
T cal Bias	0	0	0
T tab Bias	2,02439	2,02439	2,02439
$p$ valor erro de tendência	0,3736	0,2591	0,4512
Nível de significância	0,05	0,05	0,05

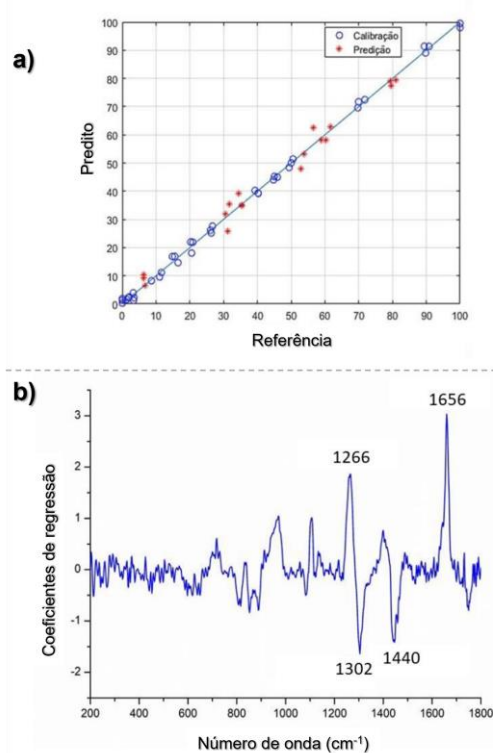
Fonte: Próprio autor

A escolha do modelo para avaliar a concentração de óleo de soja nas amostras foi aquele que possuiu as melhores métricas, ou seja, menor erro de predição e maior linearidade dos dados, tanto de calibração (0,9985), quanto de predição (0,9842), além dos baixos limite de quantificação (6,0104 wt%) e detecção (1,8031 wt%). Com isso, utilizou-se o PLS com o pré-tratamento SNV.

Os dados de calibração e predição, além dos coeficientes de regressão obtidos ao utilizar PLS SNV podem vistos na **figura 4a-b**, onde é possível observar a alta linearidade, **figura 4a**, tanto dos dados de calibração quanto dos dados de predição do modelo. Vale ressaltar que os principais coeficientes positivos para quantificação de óleo de soja, **figura 4b**, relacionam-se

às regiões referentes a duplas ligações: a banda encontrada  $1266\text{ cm}^{-1}$  que caracteriza a deformação angular =C-H no plano, enquanto em  $1656\text{ cm}^{-1}$  o modo vibracional presente é o estiramento C=C. Já os coeficientes negativos são característicos de ligações simples, como a deformação simétrica no plano ( $1440\text{ cm}^{-1}$ ) e a torção do metileno ( $1302\text{ cm}^{-1}$ ).

Figura 4: (A) Amostras destinadas a calibração e predição dos modelos; (B) coeficientes de regressão do modelo de predição PLS SNV.



Fonte: Próprio autor

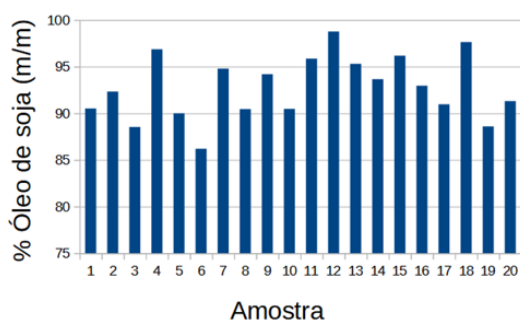
O modelo selecionado foi aplicado para predição de óleo de soja no AOEV tomado como referência, e no próprio óleo de soja. Os valores obtidos foram 0,5wt% e 99,7wt%, respectivamente, demonstrando assim boa capacidade preditiva.

A predição da concentração média de óleo de soja nas triplicatas das 59 amostras apreendidas estão dispostas nas **Figuras 5 a 9**, onde são observados elevados resultados de adulteração.

Os valores obtidos de óleo de soja foram superiores a 94,5wt% de adulterante,

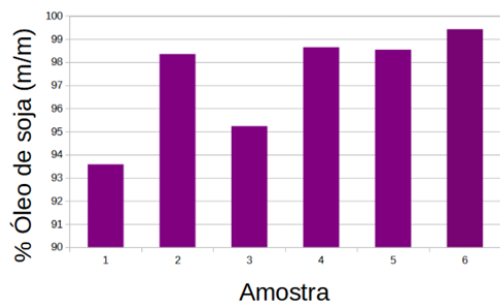
confirmando assim a não conformidade das cinco marcas avaliadas. Santos e colaboradores utilizaram a espectroscopia NIR para quantificar óleo de soja nas cinco marcas de azeite de oliva do presente estudo (SANTOS *et al.*, 2020). O resultado da quantificação de óleo de soja foi em média de 97wt%, corroborando com os resultados obtidos.

Figura 5: Concentração de óleo de soja (wt%) nas amostras da marca A1 previstas pelo modelo PLS com SNV.



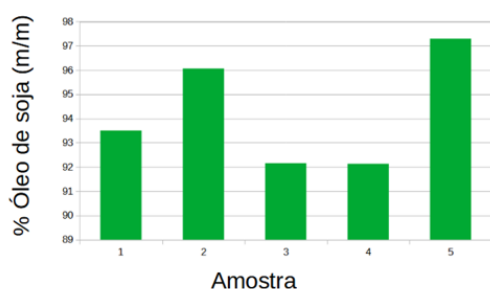
Fonte: Próprio autor

Figura 6: Concentração de óleo de soja (wt%) nas amostras da marca A2 previstas pelo modelo PLS com SNV.



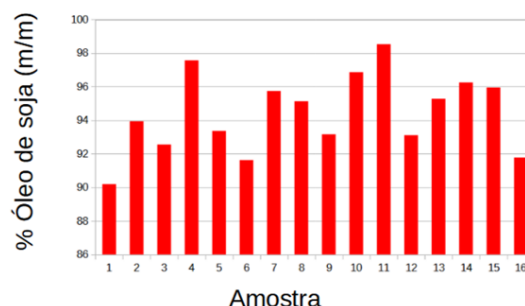
Fonte: Próprio autor

Figura 7: Concentração de óleo de soja (wt%) nas amostras da marca A3 previstas pelo modelo PLS com SNV.



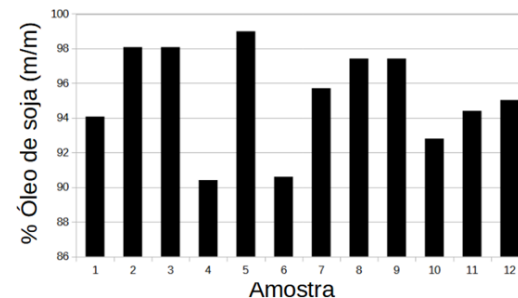
Fonte: Próprio autor

Figura 8: Concentração de óleo de soja (wt%) nas amostras da marca A4 previstas pelo modelo PLS com SNV.



Fonte: Próprio autor

Figura 9: Concentração de óleo de soja (wt%) nas amostras da marca A5 previstas pelo modelo PLS com SNV.



Fonte: Próprio autor

## 5 CONCLUSÕES

O emprego da espectroscopia Raman com a análise de dados por meio de ferramentas quimiométricas possibilitou a quantificação de óleo de soja em amostras apreendidas de azeite de oliva extravirgem. O modelo selecionado, PLS com pré-tratamento SNV, apresentou alta linearidade dos dados de calibração (0,9985) e predição(0,9842), baixo RMSEP (3,0527 wt%), além de baixo limite de detecção (1,8031 wt%) e quantificação (6,0104 wt%). Somado ao bom desempenho do modelo apresentado, a portabilidade possibilita a identificação e quantificação de adulterantes em diferentes locais, tornando a espectroscopia Raman uma forte aliada para os órgãos reguladores no controle de qualidade de AOEV.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES (Código Financeiro 1), FAPES (EDITAL CNPq/FAPES N° 23/2018 – PRONEM (596/2018) e PPE Agro 76459934/16), e ao CNPq (310057/2020-5, INCT Forense 465450/2014-8, e 422555/2018-5) pelo suporte financeiro. Os autores também gostariam de agradecer ao Núcleo de Competências em Química do Petróleo, ao Laboratório Multiusuário de Petroleômica e Forense/LabPetro pelo uso de suas instalações e ao Centro Multiusuário para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação de Vila Velha - Ifes.

## REFERÊNCIAS

- ARLORIO, Marco *et al.* Olive oil adulterated with hazelnut oils: simulation to identify possible risks to allergic consumers. **Food Additives and Contaminants**, v.27, n.1, p. 11-18, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030903225799>
- AUED-PIMENTEL, Sabria *et al.* Fraude em azeites de oliva do comércio brasileiro: avaliação pelo perfil de ácidos graxos, diferença do ECN 42 e parâmetros de qualidade. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 5, n. 3, p. 84-91, 2017.
- BARROS, Iago H. *et al.* Use of portable Raman spectroscopy in the quality control of extra virgin olive oil and adulterated compound oils. **Vibrational Spectroscopy**, v.116, p.1-10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2021.103299>.
- BARROS NETO, Benício de; SCARMINIO, Ieda. S.; BRUNS, Roy. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401–1406, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600042>.
- BOSKOU, Dimitrios; BLEKAS, Georgios; TSIMIDOU, Maria. Olive Oil Composition. In: **Olive oil**. Second Edition ed. [S.l.]: AOCS Press, 2006.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC N° 270**, de 22 de Setembro de 2005. Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal. Diário Oficial da União No 184, p. 373, 2005.
- BUMBRAH, Gurvinder S.; SHARMA, Rakesh M. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 6, n. 3, p. 209–215, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.001>
- CARRANCO, Núria *et al.* Authentication and quantitation of fraud in extra virgin olive oils based on HPLC-UV fingerprinting and multivariate calibration. **Foods**, v. 7(4), p.1-15, 2018. <https://doi.org/10.3390/foods7040044>.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils**. International Food Standard, p. 1–8, 2015.
- CONCEIÇÃO, Vitor. N. *et al.* Study of Scott Test Using Spectroscopic Techniques: an Alternative Method for Detecting Cocaine Hydrochloride and Its Adulterants in Street Drugs. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1538–1544, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140240>.
- CROCOMBE, R. A. **Portable Spectroscopy**. Applied Spectroscopy, v. 72, n. 12, p. 1701–1751, 2018.
- DAVIES, Antony N.; MCINTYRE, Peter; MORGAN, Ed. Study of the use of molecular spectroscopy for the authentication of extra virgin olive oils. Part I: Fourier transform Raman

- spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 12, p. 1864–1867, 2000.
- DE BLEYE, Charlotte *et al.* Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 125–132, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.02.003>
- DE SOUSA, Leonardo C. *et al.* Desenvolvimento de modelos de calibração NIRS para minimização das análises de madeiras de eucalyptus spp. **Ciencia Florestal**, v. 21, n. 3, p. 589–597, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5902/198050983817>
- DURAIPIANDIAN, Shiyamala; PETERSEN, Jan C.; LASSEN, Mikael. Authenticity and concentration analysis of extra virgin olive oil using spontaneous Raman spectroscopy and multivariate data analysis. **Applied Sciences**, v. 9, n. 12, p. 1-11, 2019. DOI:10.3390/app9122433.
- DUTRA, Lilian B.; DUARTE, Maria S. L.; SOUZA, Eliana C. G. Tendência do perfil dos consumidores de azeite de oliva. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 4, p. 322–326, 2014.
- FERREIRA, Márcia C. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v.22, n.5, p. 724- 731, 1999.
- FRANKEL, Edwin N. Chemistry of extra virgin olive oil: Adulteration, oxidative stability, and antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 5991–6006, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf1007677>
- HEISE, H Michael *et al.* Spectral variable selection for partial least squares calibration applied to authentication and quantification of extra virgin olive oils using Fourier transform Raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 59, n. 10, p. 1286–1294, 2005.
- INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL. Huiles D’ Olive - Olive Oils. International Olive Oil Council, n. June, p. 2020, 2020. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org>>. Acesso em: 20 de dez. 2022.
- JUNIOR, Carlos R. *et al.* Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). p. 125, 2009. Disponível em: <[www.cpact.embrapa.br](http://www.cpact.embrapa.br)>. Acesso em: 23 de março de 2023.
- KAUFFMANN, Thomas H.; KOKANYAN, Ninel; FONTANA, Marc D. Use of Stokes and antiStokes Raman scattering for new applications. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 50, n. 3, p. 418–424, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jrs.5523>
- KENNARD, Ronald W.; STONE, Larry A. Computer aided design of experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00401706.1969.10490666>
- LI, Xue *et al.* Review of NIR spectroscopy methods for nondestructive quality analysis of oilseeds and edible oils. **Trends in Food Science and Technology**, v. 101, p. 172–181, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.002>
- LOHUMI, Santosh *et al.* A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. **Trends in Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 85–98, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.003>
- MAGGIO, Ruben M. *et al.* Study of the influence of triacylglycerol composition on DSC cooling curves of extra virgin olive oil by chemometric data processing. **Journal of Thermal Analysis and**

**Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2037–2044, 2014. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s10973-013-3027-1>

OMAR, Jone *et al.* Quantitative analysis of essential oils from rosemary in virgin olive oil using Raman spectroscopy and chemometrics. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 43, n. 8, p. 1151–1156, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.1002/jrs.3152>

RIBEIRO, Fabiana A. D. L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164–171, 2008. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000100029>

SANCHEZ-LÓPEZ, Elena *et al.* Chemometric study of Andalusian extra virgin olive oils Raman spectra: Qualitative and quantitative information. **Talanta**, v. 156–157, p. 180–190, 2016. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.014>

SANTOS, Priscilla C. *et al.* Determinação Da Autenticidade De Amostras De Azeite Comerciais Apreendidas No Estado Do Espírito Santo Usando Um Espectrofotômetro Portátil Na Região Do Nir. **Química Nova**, v. 43, n. 7, p. 891–900, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170550>

SHIPP, Dustin W.; SINJAB, Faris; NOTINGHER, Ioan. Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences. **Advances in Optics and Photonics**, v. 9, n. 2, p. 315, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1364/AOP.9.000315>

SOUZA, André M. De; e POPPI, Ronei J. Experimento didático de quimiometria parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100039>

VANSTONE, Nick *et al.* Detection of the adulteration of extra virgin olive oil by near-infrared spectroscopy and chemometric techniques. **Food Quality and Safety**, v. 2, n. 4, p. 189–198, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy018>

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109–130, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)

WU, Xijun *et al.* Qualitative and quantitative studies of plasticizers in extra virgin olive oil by surface-enhanced Raman spectroscopy combined with chemometrics. **Vibrational Spectroscopy**, v. 126, p. 1–9, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2023.103527>

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

<https://doi.org/10.1007/s11746-001-0360-6>

YANG, Yang *et al.* Detection and identification of extra virgin olive oil adulteration by GC-MS combined with chemometrics. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.61, n. 15, p. 3693–3702, 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1021/jf4000538>

WISE, Barry M. *et al.* PLS Toolbox 4.0. 2007.

ZHANG, Xiao-Fang *et al.* Quantitative detection of adulterated olive oil by Raman

spectroscopy and chemometrics. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 42, n. 9, p. 1786-1788, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/jrs.2933>