



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

CLEITON SILVA DOS SANTOS

**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM ÓLEOS VEGETAIS POR
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO ASSOCIADA À CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS**

TOLEDO
2021

CLEITON SILVA DOS SANTOS

**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM ÓLEOS VEGETAIS POR
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO ASSOCIADA À CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos (COPEQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Clayton Antunes Martin

TOLEDO
2021

CLEITON SILVA DOS SANTOS

**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM ÓLEOS VEGETAIS POR
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO ASSOCIADA À CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, câmpus Toledo, como parte das exigências para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Aprovado em ____, de _____ de 20__.

Banca examinadora

Prof. Dr Clayton Antunes Martin
UTFPR, câmpus Toledo
Orientador

Prof. Dr Ricardo Fiori Zara
UTFPR, câmpus Toledo
Avaliador

M.a Jaina Mara Pigosso Coelho
Avaliadora

OBS: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos.

Agradecimentos

Uma vez concluído este trabalho, cabe destacar o apoio fundamental de pessoas que contribuíram, através de apoio direto ou simplesmente pela presença de espírito, compreensão e colaboração em momentos importantes de sua execução.

Agradeço à minha mãe Nelma Silva que sempre esteve ao meu lado e foi a minha maior incentivadora. Por todo esforço realizado para comigo, apoio, incentivo, compreensão, força, confiança e amor. À minha família, que soube viver sem a minha presença física durante o período de formação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Clayton Antunes Martin, que apesar da intensa rotina de sua vida acadêmica aceitou me orientar nesta monografia. As suas valiosas indicações fizeram toda a diferença, pelos ensinamentos transmitidos e colaboração em todas as etapas.

A UTFPR-campus Toledo, ao Laboratório Multiusuário da Central Analítica da UTFPR campus Toledo pela disponibilização do local para a realização da pesquisa.

A empresa Prati Donaduzzi pelo apoio nas pesquisas e execuções das análises, em especial a Nicete Dirleia Krohn e Priscila Ibanez Simplicio.

Aos meus colegas de trabalho do PD&I Estabilidade pelas trocas de ideias e contribuições. Em especial a Patricia Marcia Marasca e Giovani Andrei Bet Helmann.

Resumo

Os ácidos graxos são estruturas químicas de elevado valor nutricional para a saúde humana. Essas substâncias estão presentes, principalmente, nos óleos vegetais, constituindo uma das principais fontes de energia. Atualmente, a quantificação de ácidos graxos é realizada especialmente pela técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-DIC), que necessita de uma preparação de amostras, envolvendo grande tempo de realização, ao necessitar de solventes orgânicos, o que implica em desvantagens ao meio ambiente devido aos resíduos gerados. Em vista disto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica simples e eficaz para determinação destes compostos em matrizes complexas, a partir da técnica de espectroscopia no infravermelho médio (MIR) por regressão de mínimos quadráticos parciais por intervalo (iPLS) para determinação dos ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico. Um total de 80 e 19 amostras compôs os conjuntos de calibração e predição, respectivamente, sendo realizado a divisão pelo algoritmo Kennard-Stone. Os menores valores da raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV) nos intervalos foram da região de 600 a 3550 cm^{-1} para ácidos graxos palmíticos, esteárico, oleico e linolênico. Para o linoleico o melhor intervalo foi de 2707 a 3128 cm^{-1} .

Palavras-chave: Ácidos graxos; calibração multivariada; iPLS; espectroscopia no infravermelho médio; cromatografia gasosa.

Abstract

The fatty acids are chemical structures of elevated nutritional value for the human health. These substances are present, mostly, in vegetable oils, composing one of the main energy sources. Currently, the quantification of fatty acids is performed especially using the gas chromatography technique with a flame ionization detector (GC-FID), which requires sample preparation, involving a long time to accomplish, as it requires organic solvents, which implies disadvantages to the environment due to the waste generated. In view of this, the objective of this work was to develop a simple and effective analytical methodology for the determination of these compounds in complex matrices, from the technique of mid-infrared (MIR) spectroscopy by regression of partial quadratic minimums per interval (iPLS) for determination of the palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic fatty acids. A total of 80 and 19 samples composed the calibration and prediction sets, respectively, and the division was performed by the Kennard-Stone algorithm. The lowest square root values of the mean quadratic cross-validation error (RMSECV) in the intervals were in the region of 600 to 3550 cm^{-1} for palmitic, stearic, oleic and linolenic fatty acids. For linoleic the best range was 2707 to 3128 cm^{-1} .

Keywords: Fatty acids, multivariate calibration, iPLS; mid-infrared spectroscopy; gas chromatography.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Moléculas precursoras de triacilgliceróis.	14
Figura 2 – Principais componentes de um cromatógrafo a gás.	16
Figura 3 – Refletância total atenuada	18
Figura 4 – Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	18
Figura 5 – Decomposição em variáveis latentes das matrizes X e Y para modelos PLS.	22
Figura 6 – Eluição dos ésteres metílicos no cromatógrafo gasoso.	28
Figura 7 – Espectros normalizados dos óleos e misturas obtidos no MIR.	31
Figura 8 – Espectros dividido em intervalos para a quantificação do ácido linoleico.	32
Figura 9 – Melhor valor de RMSECV obtidos para a quantificação do ácido linoleico.	33
Figura 10 – Coeficiente de correlação (R) para para o modelo selecionado para a quantificação do ácido linoleico.	33

Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais ácidos graxos saturados e insaturados encontrados em alimentos.	15
Tabela 2 – Funções de cada um dos componentes de um CG.....	16
Tabela 3 – Condições cromatográficas para a quantificação dos Ácidos Graxos.	24
Tabela 4 – Tempos de retenção (TR), áreas (A) médias e desvio-padrão relativos (DPR).	29
Tabela 5 – Fator resposta teórico e fator de conversão teórico para ácidos graxos.....	30
Tabela 6 – Composição em ácidos graxos dos óleos de soja, palma, girassol e coco.	30
Tabela 7 – Resultados obtidos no CG da mistura de (17:0) e (19:0).	31
Tabela 8 – Parâmetros dos modelos definidos.	33
Tabela 9 – Avaliação de outliers no conjunto de calibração empregado na quantificação do ácido palmítico.....	34
Tabela 10 – Erros e correlações do conjunto de previsão frente ao conjunto de calibração. ...	35
Tabela 11 – Erros para cada modelo.....	35

Lista de abreviaturas e siglas

ATR	Refletância total atenuada, do inglês <i>Attenuated total reflection</i>
ASTM	Sociedade Americana para testes e materias, do inglês <i>American Society for testing and materials</i>
CG	Cromatografia gasosa, do inglês <i>Gas chromatography</i>
CG-DIC	Cromatografia gasosa acoplada a um detector por ionização em chama, do inglês <i>Gas chromatography coupled to a flame ionization detector</i>
FAME	Ésteres metálicos de ácidos graxos, do inglês <i>fatty acid methyl esters</i>
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier transform infrared</i>
IR	Espectroscopia no infravermelho, do inglês <i>Infrared spectroscopy</i>
MIR	Espectroscopia no infravermelho médio, do inglês <i>Infrared spectroscopy medium</i>
MSC	Correção Multiplicativa de Sinal, do inglês <i>Multiplicative Scatter Correction</i>
PD&I	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
PLS	Mínimos quadrados parciais, do inglês <i>Partial Least Squares</i>
PLSR	Regressão por Mínimos quadrados parciais, do inglês <i>Regression by partial least squares</i>
R	Coefficiente de correlação
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração, do inglês <i>square root of the mean quadratic calibration error</i>
RMSECV	Raiz quadrada do erro médio quadrático da validação cruzada, do inglês <i>square root of the mean quadratic cross-validation error</i>
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio quadrático de predição, do inglês <i>square root of the mean quadratic prediction error</i>
USP	Convenção da Farmacopeia dos Estados Unidos, do inglês <i>United States Pharmacopeia convention</i>
VL	Variáveis latentes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. JUSTIFICATIVA	13
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
4.1 Óleos vegetais e sua composição química	14
4.2 Quantificação de ácidos graxos em óleos vegetais e gorduras	15
4.2.1 Cromatografia gasosa (CG)	15
4.2.2 Espectroscopia no Infravermelho Médio	17
4.3 Pré-processamento	19
4.3.1 Normalização	19
4.3.2 Centralização	19
4.3.3 Correção Multiplicativa de Sinal (MSC)	19
4.4 Calibração multivariada	20
4.4.1 Mínimos quadrados parciais (PLS)	21
5. MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1 Amostragem	23
5.2 Análise por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama.....	23
5.2.1 Preparo de amostras	23
5.2.2 Quantificação por GC-DIC	24
5.3 Análise por FTIR	24
5.3.1 Obtenção dos espectros de infravermelho	25
5.4 Tratamento de dados e análise estatística	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
6.1 Quantificação por Cromatografia Gasosa.....	27
6.2 Caracterização dos Espectros MIR.....	31
6.3 Modelo iPLS	32
7. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

A existência de vários métodos clássicos para a determinação dos parâmetros físicos e químicos dos óleos vegetais é largamente conhecida e aplicada pela ciência. Dentre esses métodos, a Cromatografia Gasosa (CG) é comumente citada quando se trata da quantificação de ácidos graxos. Esta técnica tem como vantagem a alta sensibilidade e especificidade. Em contrapartida, tem-se o alto custo para aquisição e operação do equipamento (JIMÉNEZ-CARVELO et al., 2017).

A ciência, atualmente, tem buscado por novos métodos, como uma alternativa aos métodos tradicionais, visando maior eficiência (ao minimizar os recursos necessários) e precisão. Estudos empregando técnicas espectroscópicas na quantificação de ácidos graxos associadas à aplicação de ferramentas quimiométricas para desenvolver modelos multivariados mostram-se promissores visando auxiliar no controle de qualidade de óleos vegetais (JIMÉNEZ-CARVELO et al., 2017).

A Quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para planejar, investigar, interpretar, classificar e fornecer informações de um conjunto de dados de interesse químico (VANDEGINSTE, 1998). Tratando-se da quantificação de ácidos graxos, a Quimiometria pode ser aplicada quando utilizada em conjunto com a técnica de espectroscopia no infravermelho. Em suma, a análise permite otimizar a quantificação de óleos vegetais sem a destruição das amostras, com maior rapidez e baixo custo operacional (SANTOS, 2020; SARRAGUÇA & LOPES, 2009).

Neste sentido, o presente trabalho visou desenvolver um método para quantificação de óleos vegetais, presentes em uma mistura, contendo os óleos de coco, palma, soja e girassol como matriz, onde foi aplicando a técnica de espectroscopia no infravermelho médio (MIR) aliado à calibração multivariada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método para quantificação de ácidos graxos em óleos vegetais por meio da espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada utilizando a regressão por mínimos quadrados parciais

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a região (ou regiões) do espectro mais adequada para a aplicação dos modelos de calibração multivariada;
- Determinar a composição de ácidos graxos de óleos vegetais de diferentes espécies, por cromatografia gasosa;
- Preparar misturas de diferentes óleos vegetais para compor os conjuntos de calibração e de validação.

3. JUSTIFICATIVA

A quantificação de ácidos graxos em óleos vegetais é realizada tradicionalmente pela técnica de cromatografia gasosa, comumente associada à detecção por ionização em chama. Embora esta técnica permita a obtenção de resultados de elevada sensibilidade e precisão, a análise requer uma preparação trabalhosa, utilizando solventes orgânicos, o que acarreta em grande tempo de preparo de amostras.

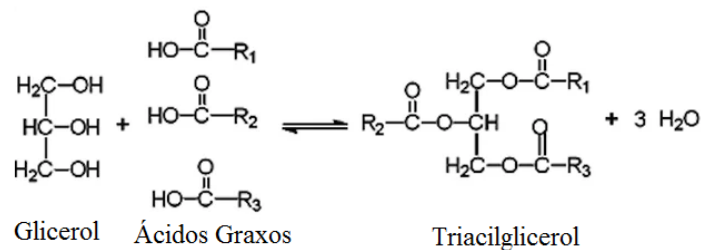
A utilização da calibração multivariada como abordagem alternativa na determinação da composição de ácidos graxos visa contribuir para maior eficiência e redução no tempo de análise. Ao se aplicar o modelo de calibração multivariada, exclui-se do procedimento analítico a necessidade de preparação das amostras e, sendo assim, não há geração de resíduos, o que pode ser considerado um método ambientalmente limpo, implicando, além disso, na redução dos custos da análise. Somado a isto, ao empregar o método dos mínimos quadrados parciais para prever os parâmetros, é possível ampliar a quantificação e confiabilidade de resultados analíticos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Óleos vegetais e sua composição química

Os triacilgliceróis são os lipídeos mais comuns em alimentos. São formados por produtos de condensação entre glicerol e ácidos graxos, usualmente conhecidos como óleos ou gorduras (JORGE, 2009; RIBEIRO, 2007). A Figura 1 apresenta o esquema reacional básico para a formação de um triacilglicerol.

Figura 1– Moléculas precursoras de triacilgliceróis.



FONTE: Adaptado de RIBEIRO, 2007.

Os óleos e gorduras apresentam atividade essencial para a vida humana. Por serem os maiores componentes do tecido adiposo, exercem atividade fundamental na composição da estrutura celular, como o suprimento de calorias e ácidos graxos essenciais, aliado ao transporte de vitaminas lipossolúveis para o interior das células (JORGE, 2009; RIBEIRO, 2007).

Os ácidos graxos participam da construção das moléculas de glicerídeos e de certos não glicerídeos, representando até 96 % de sua massa, o que faz com que influenciem diretamente no estado físico, bem como nas propriedades físico-químicas dos óleos e gorduras. São normalmente compostos alifáticos, os quais podem ser saturados e insaturados e, em alguns casos, de cadeia ramificada (JORGE, 2009; RIBEIRO, 2007).

A Tabela 1 representa os principais ácidos graxos encontrados em alimentos.

Tabela 1– Principais ácidos graxos saturados e insaturados encontrados em alimentos.

Nome comum	Cadeia carbônica	Fórmula química	Origem
Caproléico	Insaturada	$C_9H_{17}-COOH$	Gordura do leite
Oleico	Insaturada	$C_{17}H_{33}-COOH$	Gordura animal e vegetal
Erúcido	Insaturada	$C_{21}H_{41}-COOH$	Óleo de mostarda
Linoleico	Insaturada	$C_{17}H_{31}-COOH$	Óleos de amendoim, algodão, gergelim e girassol
Linolênico	Insaturada	$C_{17}H_{29}-COOH$	Óleos de soja, gérmen de trigo e linhaça
Butírico	Saturada	$H_3C-(CH_2)_2-COOH$	Gordura do leite
Caprílico	Saturada	$H_3C-(CH_2)_6-COOH$	Gordura do leite, óleo de coco e babaçu, óleo de semente de uva
Palmítico	Saturada	$H_3C-(CH_2)_{14}-COOH$	Óleos de soja, algodão, oliva, abacate, amendoim e milho
Mirístico	Saturada	$H_3C-(CH_2)_{12}-COOH$	Óleo de noz-moscada, gordura de leite e óleo de coco
Esteárico	Saturada	$H_3C-(CH_2)_{16}-COOH$	Gordura animal, manteiga e cacau

FONTE: Adaptado de RIBEIRO, 2007.

Dentre os ácidos graxos saturados mais comuns, encontram-se o palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0). Tratando-se dos insaturados, pode-se citar o ácido oleico (C18:1(9)), linoleico (C18:2(9,12)) e alfa-linolênico (C18:3(9,12,15)).

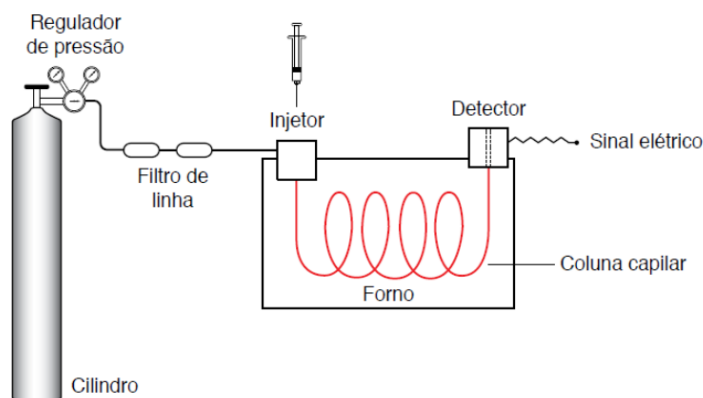
4.2 Quantificação de ácidos graxos em óleos vegetais e gorduras

4.2.1 Cromatografia gasosa (CG)

A cromatografia gasosa é uma técnica analítica de separação de compostos onde a fase móvel utilizada é um gás inerte. Este gás não apresenta afinidade pela molécula do analito, sendo comumente denominado gás de arraste. Por isto, as interações físico-químicas com o analito ocorrem exclusivamente com a fase estacionária, presente na coluna (HIRAM, 2021).

Para ser analisado por CG, um composto químico precisa permanecer na forma volátil nas condições de temperatura empregadas (de até 300 °C). O cromatógrafo a gás é constituído basicamente pelo injetor, a coluna cromatográfica (instalada dentro do forno) e o detector, conforme ilustrado na Figura 2 (HIRAM, 2021).

Figura 2– Principais componentes de um cromatógrafo a gás.



FONTE: HIRAM, 2021.

A Tabela 2 define de forma resumida a função de cada um dos componentes de um cromatógrafo a gás.

Tabela 2– Funções de cada um dos componentes de um CG.

Componente	Função
Cilindro	Local onde guarda a fase móvel gasosa
Regulador de pressão	Regula a pressão de saída da fase móvel do cilindro em direção ao cromatógrafo
Filtro de linha	Remove possíveis interferentes contidos na fase móvel antes que ela entra na coluna
Injetor	Local de introdução do material analisado
Coluna	Tubo que contém a fase estacionária que separa os componentes injetados
Forno	Aquece a coluna, ajudando na separação cromatográfica
Detector	Detecta os componentes que foram separados, gerando um sinal elétrico proporcional à massa do analito
Sinal elétrico	Digitalizado e enviado ao computador para gerar o cromatograma

FONTE: HIRAM, 2021.

Esta técnica permite a quantificação de compostos com baixo peso molecular. Os óleos vegetais, por se tratarem de uma mistura complexa, para serem quantificados por esta técnica precisam de um preparo de amostras envolvendo uma reação de hidrólise, visando obter glicerol e ácidos graxos. Posteriormente, os ácidos graxos são esterificados aos seus respectivos ésteres metílicos, os quais podem ser identificados e quantificados por cromatografia gasosa (PINTO & LANÇAS, 2010).

Este processo é denominado derivatização e envolve a utilização de solventes orgânicos, catalisadores ácidos e/ou básicos e reagentes. Esta etapa é necessária ao processo uma vez que os triacilgliceróis possuem inúmeras combinações distintas, o que torna a quantificação total da concentração de ácidos graxos muito complexa. Somado a isto, estes compostos possuem baixa volatilidade, portanto, não se volatilizam nas temperaturas normalmente empregadas para

separação em CG. Além disso, existem restrições na temperatura máxima de utilização da coluna, o que impede o uso de temperaturas superiores ao determinado pelo fabricante (GAMA et al., 2017; PINTO & LANÇAS, 2010).

A quantidade de resíduos gerados pode ser considerada como uma desvantagem da técnica. Contudo, a cromatografia gasosa permite realização de análises com rapidez, alto poder de separação e resolução, elevada sensibilidade e pequena amostragem necessária (PINTO & LANÇAS, 2010).

4.2.2 Espectroscopia no Infravermelho Médio

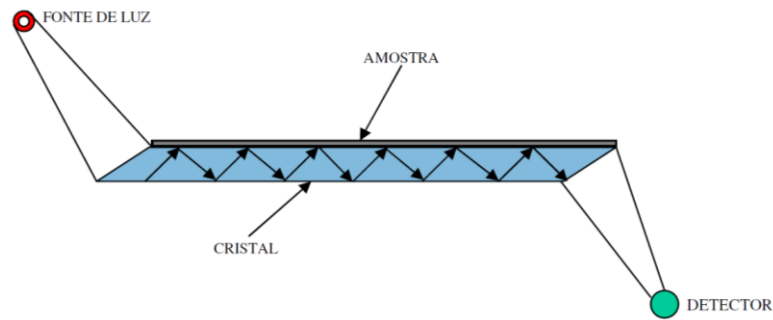
O uso da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) possibilita uma velocidade e sensibilidade superior a espectroscopia no infravermelho (IR) convencional. Ao invés de analisar cada frequência sequencialmente, como é feito no IR próximo, médio e distante, o FTIR analisa todas as frequências simultaneamente (RAKESH & CHARMI, 2014).

A reflexão de radiação pode ser de quatro tipos: especular, difusa, interna e total atenuada (ATR – refletância total atenuada). Nesse trabalho, será abordado apenas a ATR, que é uma técnica não destrutiva que permite obter espectros no infravermelho de amostras como líquidos, sólidos insolúveis, filmes, adesivos, pós, pastas, entre outros (SKOOG, 2002; HARRICK, 1964).

O princípio deste tipo de espectroscopia baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação, passando por um meio mais denso (cristal ATR), transparente ao infravermelho, para um meio menos denso (amostra) ocorre reflexão, conforme a Figura 3. A fração do feixe incidente que é refletida aumenta conforme o ângulo de incidência, e quando excede um determinado ângulo crítico a reflexão é completa. No ponto de reflexão, o feixe é atenuado como se penetrasse a uma pequena distância dentro da amostra.

A radiação penetrada é chamada de onda evanescente. Se o meio menos denso absorve a radiação evanescente, a atenuação do feixe ocorre nos comprimentos de onda de absorção de bandas. Este fenômeno é chamado de ATR. (SKOOG, 2002; HARRICK, 1964).

Figura 3– Refletância total atenuada.



FONTE: PERKIN ELMER, 2021

Os espectros de FTIR são semelhantes mas não iguais aos espectros comuns de absorção. Em geral, enquanto as mesmas bandas são observadas, suas intensidades relativas diferem. As absorbâncias, embora dependam do ângulo de incidência, são independentes da espessura da amostra, uma vez que a radiação penetra apenas alguns micrômetros na mesma (SKOOG,2002).

A Figura 4 ilustra um equipamento FTIR.

Figura 4– Espectrômetro infra vermelho com transformada de Fourier (FTIR).



FONTE: PERKIN ELMER, 2021.

A vantagem em empregar o FTIR está atrelada ao fato de a técnica exigir pouco ou nenhum preparo de amostras, não necessitar de grandes quantidades de reagentes e possibilitar o doseamento de princípio ativo com elevada sensibilidade, robustez e especificidade, consumindo menos tempo na sua realização (RAKESH & CHARMI, 2014).

4.3 Pré-processamento

O pré-processamento dos resultados é uma etapa analítica essencial, visando eliminar informações irrelevantes quimicamente e condicionar a matriz de dados, o que possibilita realizar uma análise exploratória dos dados com eficiência. Normalizar os espectros, centrar os dados e aplicar a Correção Multiplicativa de Sinal (MSC) são alguns dos métodos mais utilizados (BEEBE et al., 1998; SOUZA & POPPI, 2012).

4.3.1 Normalização

O objetivo da normalização é a redução de influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados. A normalização de área total é uma das mais empregadas e tem como alvo reduzir o efeito da intensidade total de perfis de resposta, devido à variação da concentração da amostra e do caminho ótico, conforme demonstra a Equação 1 (BEEBE et al., 1998; SOUZA & POPPI, 2012).

$$X_{i,norm} = \frac{X_i}{\sum_{j=1}^n |X_{ij}|} \quad (1)$$

4.3.2 Centralização

A centralização dos dados em relação à média do conjunto de dados pode ser calculada pela Equação 2, onde é estimada a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrai-se cada uma das intensidades do valor médio. A partir disto, cada variável passa a ter média zero (as coordenadas são movidas para o centro de dados), possibilitando que diferentes intensidades relativas sejam facilmente detectadas (BEEBE et al., 1998; SOUZA & POPPI, 2012).

$$X_{ij}(\text{centradonamédia}) = X_{ij}(\text{original}) - \bar{X}_{ij}(\text{média}) \quad (2)$$

4.3.3 Correção Multiplicativa de Sinal (MSC)

Trata-se de um método de transformação que permite compensar os efeitos aditivos e/ou multiplicativos em dados espectrais. O objetivo é remover a influência de efeitos físicos nos espectros (tamanho de partícula, rugosidade, opacidade, etc) e introduzir variações espectrais,

como deslocamento da linha de base, o que traz informações químicas sobre a amostra. O princípio básico do MSC pode ser demonstrado através da Equação 3, onde o espectro é determinado a partir de suas características químicas somada às físicas indesejadas. (BEEBE et al., 1998; SOUZA & POPPI, 2012).

$$X_{ik}(\text{transformado}) = \frac{[X_{ik}(\text{original}) - a_i]}{b_i} \quad (3)$$

sendo, $X_{ik}(\text{original})$ e $X_{ik}(\text{transformado})$ são os valores de absorvância antes e depois de correção com o MSC em k comprimentos de onda; a_i e b_i são constantes estimadas a partir de uma regressão em mínimos quadrados de um espectro individual X_{ik} contra um espectro médio do conjunto de calibração em todos os comprimentos de onda ou em um subconjunto.

4.4 Calibração multivariada

A calibração pode ser definida como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e valores para uma propriedade de interesse correspondente. Dentre os métodos de calibração existentes, sem dúvida, os mais difundidos são ainda os métodos de calibração univariada que também são conhecidos como calibração de ordem zero, ou seja, tem-se apenas uma medida instrumental para cada uma das amostras de calibração, isto é, para cada amostra tem-se apenas um escalar (BRERETON, 2000; CHARNET et al. 1999; CHUI et al. 2001).

A aplicação da calibração univariada é restrita, visto que, quando a amostra não é livre de interferentes e a medida é realizada diretamente por uma metodologia instrumental, isso provavelmente provocará desvios na determinação da propriedade de interesse e a aplicação deste método de calibração torna-se inviável (BRERETON, 2000; CHARNET et al. 1999; CHUI et al. 2001).

Em calibração multivariada, mais de uma resposta instrumental é relacionada com a propriedade de interesse. Esses métodos de calibração possibilitam a análise mesmo na presença de interferentes, desde que esses interferentes estejam presentes nas amostras utilizadas para a construção do modelo de calibração. Neste tipo de calibração a resposta instrumental é representada na forma de matriz, enquanto a propriedade de interesse, determinada por uma metodologia padrão, é representada por um vetor (BRERETON, 2000; CHARNET et al. 1999; CHUI et al. 2001).

4.4.1 Mínimos quadrados parciais (PLS)

Os mínimos quadrados parciais (PLS) ou a regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) é considerado o método de regressão mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada a partir de dados de primeira ordem. Este método não requer um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras podendo realizar a previsão de amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes também estejam presentes por ocasião da construção do modelo (vantagem de primeira ordem) (BEEBE et al., 1998).

O modelo PLSR é obtido através de um processo iterativo, no qual se otimiza ao mesmo tempo a projeção das amostras sobre o(s) peso(s), para a determinação dos escores, e o ajuste por uma função linear dos escores da matriz X aos escores da matriz Y de modo a minimizar os desvios. Essa otimização simultânea ocasiona pequenas distorções nas direções dos pesos, de modo que, rigorosamente eles perdem a ortogonalidade, levando a pequenas redundâncias de informação. Porém são essas pequenas redundâncias que otimizam a relação linear entre os escores, e estas distorções da ortogonalidade entre os componentes principais na PLSR fazem com que não sejam mais componentes principais (que são ortogonais) e sim variáveis latentes (VL) (BEEBE et al., 1998; MILLER & MILLER, 2000).

A PLSR estende o conceito do modelo inverso (propriedade como função da medida instrumental) trocando as variáveis originais por um subconjunto truncado das variáveis latentes dos dados originais. Considerando um caso geral para a determinação de mais de uma espécie de interesse, logo Y é uma matriz de dimensão (n x z), em que z é o número de colunas de Y, tem-se a decomposição de ambas as matrizes X de dimensão (n x m) e Y em suas matrizes de escores e pesos, conforme demonstra as Equações 4 e 5 (BEEBE et al., 1998; MILLER & MILLER, 2000).

$$X = TP^T + E_X \quad (4)$$

$$Y = UQ^T + E_Y \quad (5)$$

Onde X é a matriz de dados (medida instrumental), Y é a matriz de resposta (concentração, por exemplo), T e U são os escores para as duas matrizes de dados, P e Q são os respectivos pesos, E_X e E_Y são os respectivos resíduos compostos pelas variáveis latentes descartadas, ou seja, as matrizes que contem a parte não modelada (BEEBE et al., 1998; MILLER & MILLER, 2000).

Uma relação linear é, então, estabelecida entre os escores de X e os escores de Y para cada VL, conforme Equação 6 (OTTO, 2016).

$$U_h = b_h t_h + E \quad (6)$$

Onde U_h é uma matriz que contém as propriedades de todas as amostras (concentração), b_h é um vetor que contém os parâmetros do modelo, t_h é uma matriz que contém os dados de medição instrumental (espectro) para as amostras de calibração e E é uma matriz que representa ruído.

A Figura 5 ilustra a decomposição das matrizes X e Y no produto das matrizes de escores e pesos. A decomposição pode ser realizada através de diversos algoritmos que procedem a referida decomposição por passos diferentes chegando ao final em resultados praticamente iguais (OTTO, 2016).

Figura 5– Decomposição em variáveis latentes das matrizes X e Y para modelos PLS.

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{c} m \\ \boxed{X} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} l \\ \boxed{t_1} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{p_1^T} \\ l \end{array} + \dots + \begin{array}{c} l \\ \boxed{t_h} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{p_h^T} \\ l \end{array} + \begin{array}{c} m \\ \boxed{E_X} \\ n \end{array} \\
 \\
 \begin{array}{c} z \\ \boxed{Y} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} l \\ \boxed{u_1} \\ n \end{array} \begin{array}{c} z \\ \boxed{q_1^T} \\ l \end{array} + \dots + \begin{array}{c} l \\ \boxed{u_h} \\ n \end{array} \begin{array}{c} z \\ \boxed{q_h^T} \\ l \end{array} + \begin{array}{c} z \\ \boxed{E_Y} \\ n \end{array}
 \end{array}$$

FONTE: OTTO, 2016.

No final do processo a variância explicada pela primeira VL foi maior que a variância explicada pela segunda VL e a terceira VL explicará uma variância menor que a segunda VL, e assim sucessivamente até o número de VL definido e o algoritmo, geralmente, converge rapidamente (VANDEGINSTE et al., 1998; GELADI et al., 1986).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostragem

Foram analisados quatro tipos de óleos vegetais comestíveis comerciais, sendo estes os óleos de coco, girassol, palma e soja. As amostras dos óleos vegetais foram adquiridas em Toledo-PR, através do comércio local. Foram preparadas combinações de misturas de soja/coco, soja/palma, palma/girassol, palma/coco e girassol/coco que variaram de 5 a 95 % (m/m) totalizando 95 misturas, com peso médio de 1,50 g. As misturas foram acondicionadas em frascos de vidros fechados e armazenados em congelador (- 6 °C) até a realização da análise. Antes das análises, as misturas foram descongeladas em banho maria a temperatura de 30 °C, submetidas à homogeneização por meio de agitador vórtex. Esta temperatura foi adotada para que todos os óleos estivessem na mesma forma líquida, uma vez que o óleo de coco fica em estado sólido em temperaturas menores que 25 °C.

5.2 Análise por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama

A quantificação dos ácidos graxos foi feita através da técnica de método de cromatografia gasosa acoplada a um detector de por ionização em chama (CG-DIC). O estudo foi realizado no Laboratório de PD&I da Prati-Donaduzzi Toledo-PR.

5.2.1 Preparo de amostras

A preparação de ésteres metálicos de ácidos graxos (FAME) foi realizada utilizando como referência a metodologia proposta por Hartman & Lago (1973). Em triplicata, foram pesadas separadamente 30 mg de óleo de soja, palma, girassol e coco em frasco de vidro de 20 mL. Foi adicionado 1 mL de padrão interno do éster metílico do ácido C19:0 na concentração de 2 mg mL⁻¹. O solvente foi evaporado em fluxo de nitrogênio. O conteúdo lipídico residual foi saponificado com 4 mL de hidróxido de sódio 0,5 mol L⁻¹ em metanol e esterificado com 5 mL uma mistura de cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico na proporção de 1,5:32:1,6 (m/v/v). Nestas etapas de saponificação e esterificação foram utilizados banho de aquecimento em água, por 5 minutos, em ebulição. Após resfriado, adicionou de 4 mL de solução saturada de cloreto de sódio e o FAME foi extraído da mistura com 2 mL de n-heptano. Após este processo, a amostra foram analisada pela técnica de cromatografia gasosa.

5.2.2 Quantificação por GC-DIC

As condições cromatográficas conforme a Tabela 3 foram otimizadas tomando como referência os estudos realizados pelo capítulo da USP 40 (*United States Pharmacopeia convention*, 2017) para ácidos graxos. O método foi empregado utilizando um cromatógrafo a gás Agilent 7890B acoplado a sistema de CTC Combipal, com detector por ionização em chama.

Tabela 3 – Condições cromatográficas para a quantificação dos Ácidos Graxos.

Condição	Método			
Detector	Ionização em chama			
Fase estacionária	Agilent DB-WAX (30 m x 0,53 mm x 1,0 µm)			
Temperatura do injetor	220 °C			
Temperatura do detector	260 °C			
Rampa de Temperatura da coluna	Taxa de aquecimento (°C minuto ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (minutos)	Tempo total (minutos)
	-	70	2	2
	5	240	5	41
Volume de injeção	1,0 µL			
Modo de injeção	splitless			
Fluxo dos gases	Gás de arraste (Hélio): 6,80 mL minuto ⁻¹ ; Gás <i>make-up</i> (Nitrogênio): 35 mL minuto ⁻¹ ; Gases da chama: 30 mL minuto ⁻¹ (Hélio) e 300 mL minuto ⁻¹ (ar sintético).			

FONTE: Adaptado de USP 40 (2017).

As áreas dos picos foram quantificadas utilizando o *software* Empower 3. A identificação dos ácidos graxos foi determinada por comparação com o tempo de retenção do padrão de ésteres metílicos (FAMES 18:0-19:0) na concentração de 20 mg mL⁻¹ (Sigma, EUA). Já a quantificação dos ácidos graxos foi realizada empregando o cálculo do fator resposta teórico, segundo método de Joseph & Ackman (1992), onde obteve-se a comparação com os fatores de resposta experimentais com a utilização da mistura do padrão de heptadecanoato de metila (17:0) e nonadecanoato de metila (19:0) na concentração de 5 mg mL⁻¹. Estas soluções foram injetadas em sextuplicatas para avaliar a repetibilidade do sistema.

5.3 Análise por FTIR

Os espectros no infravermelho foram obtidos utilizando um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Perkin Elmer, Frontier™ Spectrum 65, equipado com módulo de refletância total atenuada (ATR), composto pelo cristal de KBr. Os

estudos foram realizados no Laboratório de Central Analítica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus de Toledo-PR.

5.3.1 Obtenção dos espectros de infravermelho

O estudo foi conduzido utilizando como referência o método descrito por Silva & Martin (2019). Os espectros foram obtidos na faixa de 600 a 6500 cm^{-1} (infravermelho médio), com resolução de 2 cm^{-1} e 16 varreduras. Antes da leitura de cada amostra, o espectro do ar (ATR vazio) foi obtido e tomado como a medida do branco. Entre as aquisições dos espectros, realizou a limpeza do amostrador ATR com isopropanol. As leituras de cada amostragem foram realizadas em triplicata.

5.4 Tratamento de dados e análise estatística

Os dados gerados a partir dos espectros foram pré-processados por métodos matemáticos de normalização, centralização e correção (MSC). A determinação do intervalo espectral mais adequado para calibração foi executada empregando o *software* MATLAB versão R2021a.

O conjunto de validação cruzada foi avaliado pela raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV), onde no conjunto determinou as variáveis latentes para cada modelo. Uma parte do conjunto de calibração foi extraído, retirando dez amostras aleatoriamente e executado o programa com as setenta restantes, esse processo se repetia inúmeras vezes para calcular o RMSECV, a partir disto determinou qual era o número adequado de variáveis latentes para cada modelo.

O conjunto de calibração foi avaliado pela raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC) e, para o conjunto de validação ou predição, foi aplicada a raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP). A partir destes critérios, foi selecionado o intervalo do modelo que apresentar o menor valor do RMSECV e conseqüentemente o valor de R mais próximo de 1.

Aos conjuntos de dados foram aplicados a divisão pelo algoritmo Kennerd-Stone, utilizando a ferramenta Toolbox SPA_GUI Toolbox, sendo 80 amostras para o conjunto de calibração e 19 amostras pra o conjunto de validação ou predição.

O modelo global foi construído usando o iPLS_Toolbox, O espectro foi segmentado em intervalos de mesmo tamanho que variaram de 1 a 100. Para cada intervalo foi aplicado a

correção do espalhamento multiplicativo e a centralização dos dados na média. A seleção do melhor modelo para cada intervalo foi baseada no valor de RMSECV, sendo selecionado o modelo que apresentou o menor valor de RMSECV.

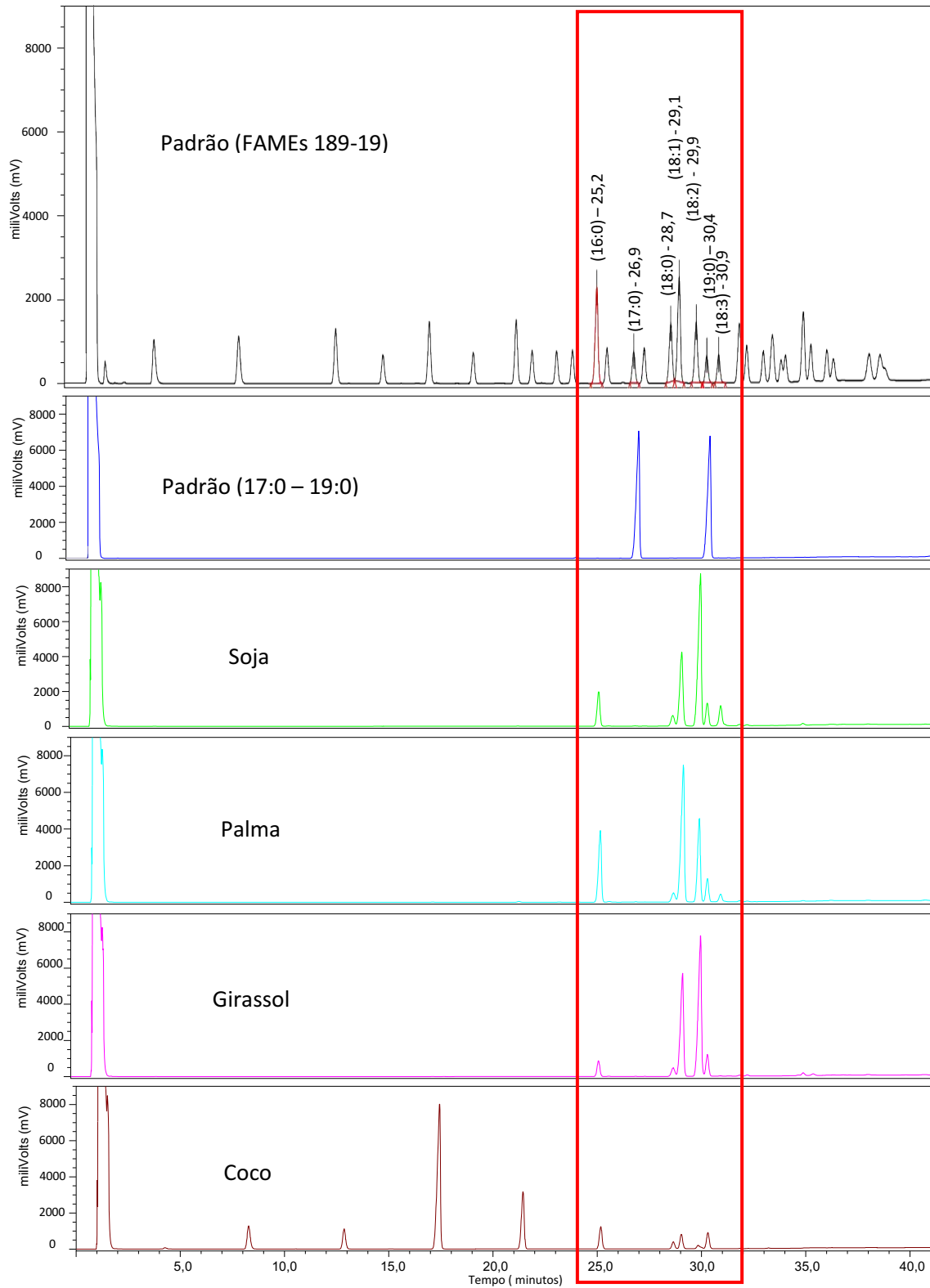
Neste trabalho a identificação da presença de amostras anômalas (do inglês, *outlier*) presentes nos conjuntos de calibração e validação, foi realizada na *leverage* e nos resíduos estudentizados seguindo as recomendações da norma ASTM E1655-00 (*American Society for testing and materials*, 2005).

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Quantificação por Cromatografia Gasosa

Nas condições experimentais utilizadas, o cromatograma é integrado no intervalo de 1,0 a 40,0 minutos. A mistura dos padrões destes ésteres de ácidos graxos (FAMEs 189-19) foram injetados e o tempo de retenção de cada um foi determinado segundo a USP 40 (2017). Assim, os picos encontrados foram atribuídos ao palmitato de metila (25,2 minutos), heptadecanoato de metila (26,9 minutos), estearato de metila (28,7 minutos), olealato de metila (29,1 minutos), linoleato de metila (29,9 minutos) e linolenato de metila (30,9 minutos). O nonadecanoato de metila (19:0) utilizado como padrão interno teve tempo de retenção de 30,4 minutos. A Figura 6 demonstra as eluições dos ésteres metílicos.

Figura 6 – Eluição dos ésteres metílicos no cromatógrafo gasoso.



Fonte: Elaborado pelo autor

16:0= palmitato de metila; 17:0= heptanodecanoato; 18:0= estearato de metila; 18:1= olealato de metila;
18:2= linoleato de metila; 18:3= linolenato de metila; 19:0= nonadecanoato.

O desvio-padrão relativos (DPR) para seis medidas das áreas (A) dos picos dos constituintes majoritários, bem como do padrão interno foram usados como estimativas da precisão instrumental na solução padrão (189-19). Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4– Tempos de retenção (TR), áreas (A) médias e desvio-padrão relativos (DPR).

Ésteres metílicos	TR (minutos)	Áreas Médias	DPR (%)
16:0 Palmitato de metila	25,2	20108,8	10,6
17:0 Heptadecanoato de metila	26,9	6715,7	10,6
18:0 Estearato de metila	28,7	12729,5	10,4
18:1 Oleolato de metila	29,1	21527,3	10,3
18:2 Linoleato de metila	29,9	13335,7	10,2
19:0 Nonadecanoato de metila	30,3	5571,8	10,1
18:3 Linolenato de metila	30,4	5748,3	10,2

FONTE: Elaborado pelo autor.

Os valores de DPR para as áreas obtidas, variaram de 10,1 a 10,6 %. Na medida da área, as principais fontes de erro são o volume injetado e a resposta do detector. Entretanto, os erros associados podem ser corrigidos com o método de padronização interna. Através dos tempos relativos dos picos obtidos no cromatograma é possível obter a participação de cada éster graxo na composição dos óleos vegetais.

O pico mais próximo ao do padrão interno corresponde ao do linoleato de metila. A resolução entre ambos foi estimada em 2,0. Para fins quantitativos, segundo Colins (2006) uma resolução de 1,25 é considerada suficiente especialmente em cromatogramas de misturas complexas, como é o caso de óleos vegetais.

Comparando os tempos de eluição nos cromatogramas da solução padrão de referência (FAMES 189-19), foi possível identificar os ésteres metílicos presentes e determinar o conteúdo dos ácidos graxos presente nas amostras. Foi calculado com um método de padronização interna, conforme Joseph & Ackman (1992), e os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 7.

$$C \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = FRT * FCT * \frac{(1000 * C_{pi} * A_{ag})}{(A_{pi} * M_a)} \quad (7)$$

Onde C é o conteúdo do ácido graxo, (mg g⁻¹); FRT é o fator de resposta teórico dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, conforme Tabela 5; FCT é o fator de conversão para expressar os resultados em mg de triacilgliceróis por grama de óleo vegetal a partir dos ésteres metílicos, cujo valores utilizados encontram-se descritos na Tabela 5; C_{pi} é a concentração do

padrão interno; Aag é a área do ácido graxo; Api é a área do padrão interno; Ma é a massa pesada de amostra.

Tabela 5 – Fator resposta e fator de conversão teóricos para ácidos graxos.

Ácidos graxos	Fator resposta teórico (FRT)	Fator de conversão teórico (FCT)
C16:0 Palmítico	1,028	0,995
C18:0 Esteárico	1,008	0,995
C18:1 Oleico	1,001	0,995
C18:2 Linoleico	0,995	0,995
C18:3 Linolênico	0,988	0,995

FONTE: Adaptado de Ackman (1964).

Os resultados da concentração média de cada ácido graxo estão dispostos conforme Tabela 6.

Tabela 6 – Composição de ácidos graxos dos óleos de soja, palma, girassol e coco.

Ácidos graxos (mg g ⁻¹)	Óleo de Soja	Óleo de Palma	Óleo de Girassol	Óleo de Coco
C16:0 Palmítico	116,56 ± 0,75	236,20 ± 2,10	58,29 ± 0,21	97,15 ± 2,04
C18:0 Esteárico	33,71 ± 1,43	24,95 ± 2,40	28,95 ± 1,12	29,53 ± 0,94
C18:1 Oleico	268,84 ± 0,87	484,58 ± 2,07	407,90 ± 0,18	61,50 ± 1,95
C18:2 Linoleico	561,09 ± 1,41	263,67 ± 2,85	559,80 ± 0,38	16,81 ± 2,95
C18:3 Linolênico	71,96 ± 1,46	26,97 ± 3,90	-	-

FONTE: Elaborado pelo autor

Com os resultados obtidos dos ácidos graxos dos óleos de soja, palma, girassol e coco, foi possível calcular a concentração teórica de cada ácido graxo presente nas misturas, que posteriormente foram utilizados como conjunto de dados no Matlab para o modelo de calibração multivariada.

O sistema também foi verificado por meio do fator resposta experimental do cromatógrafo à gás, utilizando o padrão dos ésteres metílicos 17:0 e 19:0, as respostas analíticas estão representadas pelas áreas médias conforme Tabela 7. O resultado deste fator foi de 0,9958±0,0018. O fator resposta teórico segundo Ackman (1964) é de 1,0173, comparando o valor experimental frente ao teórico é possível observar a proximidade entre eles, considerando assim que a técnica de quantificação empregada, está em conformidade com o esperado pela literatura.

Tabela 7 – Resultados obtidos no CG da mistura de (17:0) e (19:0).

Ésteres metílicos	TR (minutos)	Áreas Médias	DPR (%)
Heptadecanoato de metila (17:0)	26,9	75475,2	1,3
Nonadecanoato de metila (19:0)	30,3	75164,0	1,3

FONTE: Elaborado pelo autor.

6.2 Caracterização dos Espectros MIR

Foram obtidos os espectros das amostras e realizada a normalização, utilizando a ferramenta do próprio software do espectrômetro. Na Figura 7 demonstra os espectros MIR normalizados dos óleos de soja, palma, girassol, coco e das misturas.

Neste espectro, notam-se semelhanças nas seguintes bandas características das ligações, segundo Máquina (2017):

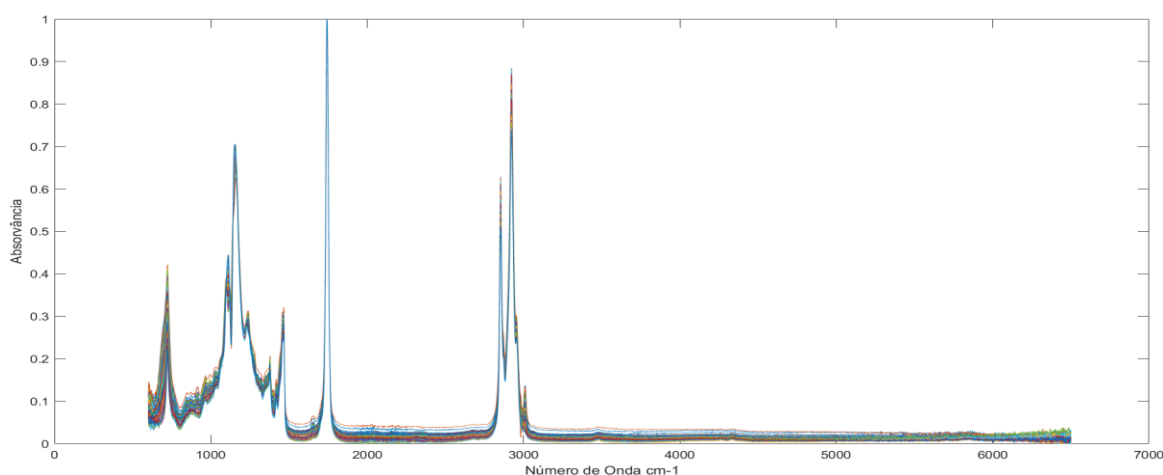
- As bandas de absorção na região espectral entre 3050 à 2850 cm^{-1} , devido às vibrações de estiramentos simétricos e assimétricos da ligação C-H de grupos metila ($-\text{CH}_3$), metileno ($-\text{CH}_2$) e de carbonos insaturados;

- A banda de absorção na região espectral de 1744 cm^{-1} , atribuído a C=O dos acilgliceróis;

- As bandas de absorção observadas nas regiões espectrais de 1236, 1160, 1119, e 1098 cm^{-1} , são atribuídas às vibrações de estiramento da ligação do grupo CO em ésteres: vibrações de acoplamento assimétricos C-C(=O)-O e O-C-C;

- A banda de baixa intensidade, relevante na região de 720 cm^{-1} é resultante da sobreposição da vibração de deformação angular tipo balanço de C-H do grupo metileno e da vibração de deformação angular fora do plano.

Figura 7 – Espectros normalizados dos óleos e misturas obtidos no MIR.



FONTE: Elaborado pelo autor.

As informações de absorvância foram extraídas e realizada a média dos valores dos espectros normalizados de cada amostra, que posteriormente tornaram-se um conjunto de dados no Matlab para criação do modelo de calibração multivariada.

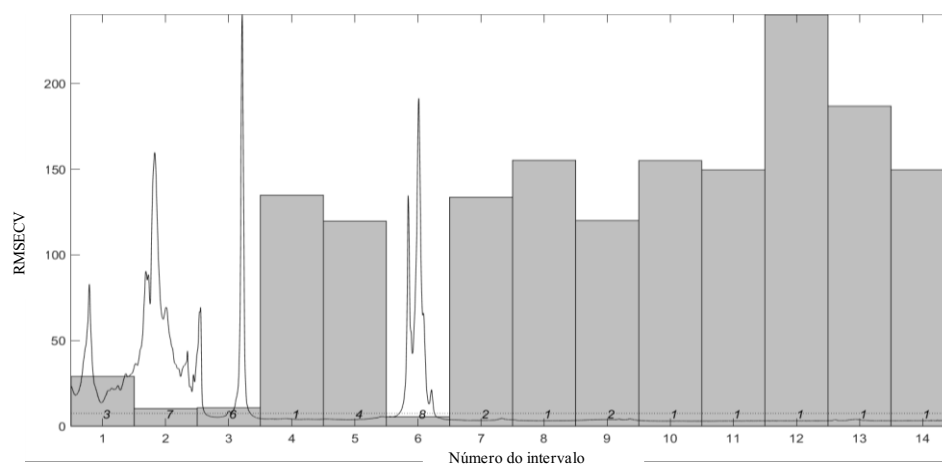
6.3 Modelo (iPLS)

Os conjuntos de dados referente as 99 amostras foram divididas em conjunto de validação e previsão, sendo 80 amostras para o conjunto de validação e 19 para o conjunto de previsão, utilizando a ferramenta Toolbox SPA_GUI no Matlab.

A partir do conjunto de dados de validação, foi utilizado ferramenta Toolbox iPLS para determinar o modelo. A este modelo foi aplicado a centralização na média e a correção multivariada (MSC).

A escolha do melhor intervalo para o modelo para cada ácido graxo, foi obtido pela avaliação do menor valor de RMSECV conforme exemplificado na Figura 8.

Figura 8– Espectros dividido em intervalos para a quantificação do ácido linoleico.

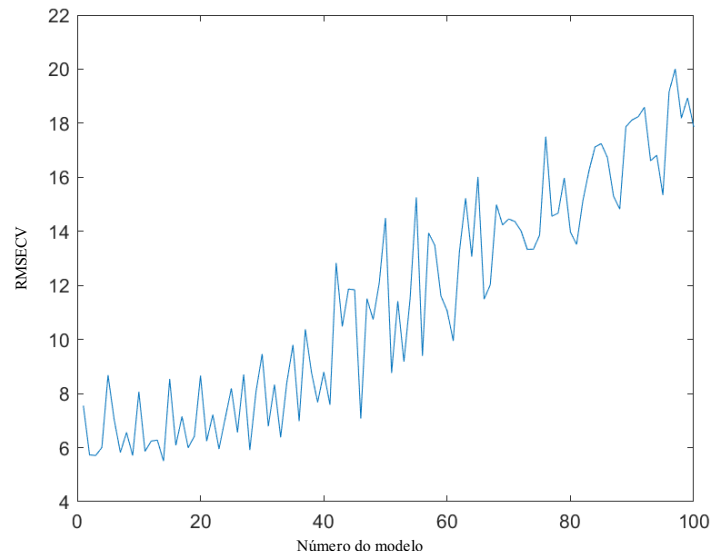


FONTE: Elaborado pelo autor.

A partir do melhor intervalo para cada modelo é verificado no conjunto de todos os cem modelos, qual apresentou o menor valor de RMSECV entre eles, conforme distribuição da Figura 9. Para o ácido linoleico o menor valor foi de 5,5056. Esse modelo foi o de número 14, com intervalo de número 6. Sendo este intervalo a região de 2707 a 3128 cm^{-1} .

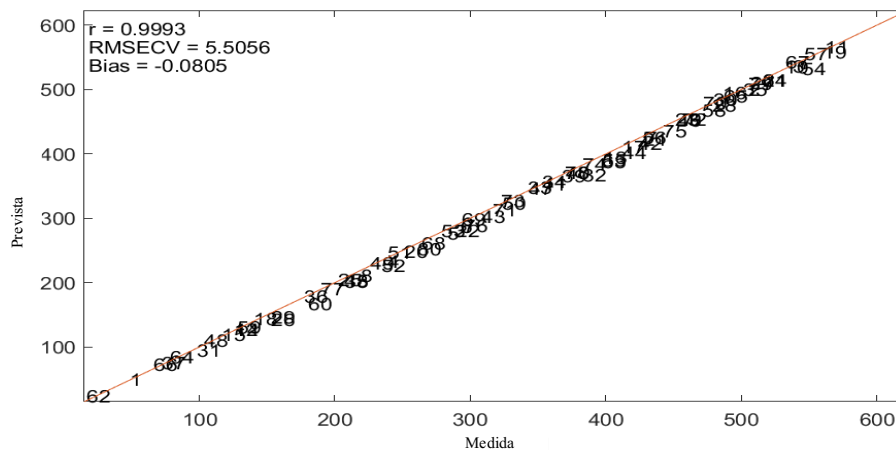
O valor do coeficiente de correlação (R) e o número de variáveis latentes mais adequadas, foram adquiridas conforme Figuras 8 e 10.

Figura 9 – Melhor valor de RMSECV obtidos para a quantificação do ácido linoleico.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Coeficiente de correlação (R) para o modelo selecionado para a quantificação do ácido linoleico.



FONTE: Elaborado pelo autor.

O mesmo racional foi seguido para os outros ácidos graxos, resultados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros dos modelos definidos.

Ácidos graxos	nº Modelo	Melhor Intervalo	Variáveis latentes	RMSECV	Coefficiente de correlação (R)
C16:0 Palmítico	2	600 a 3550	10	2,3928	0,9989
C18:0 Esteárico	2	600 a 3550	10	0,2003	0,9984
C18:1 Oleico	2	600 a 3550	10	4,5651	0,9992
C18:2 Linoleico	14	2707 a 3128	8	5,5056	0,9993
C18:3 Linolênico	2	600 a 3550	10	1,6067	0,9975

FONTE: Elaborado pelo autor.

Os resultados encontrados apresentam coeficiente de correlação bem próximo de 1 nos intervalos definidos, demonstrando o alto grau de relação entre os dados obtidos com a técnica de quantificação por CG e os dados espectrais obtidos pelo MIR.

Aos melhores modelos foram aplicadas transformações que influenciaram na melhor correlação entre o vetor Y e a matriz X, maior variância explicada e melhor garantia de previsão para cada propriedade

Afim de avaliar interferência nos rótulos de dados utilizados que poderiam influenciar na determinação do modelo, foi avaliado a presença de amostras anômalas (do inglês, *outlier*) que são os indivíduos de um conjunto de dados que apresentam distinção do restante dos dados. A Tabela 9 demonstra o tratamento dos dados, retirando amostras do modelo de calibração definido para o ácido palmítico.

Tabela 9 – Avaliação de outliers no conjunto de calibração empregado na quantificação do ácido palmítico.

nº de amostras retiradas	RMSECV	RMSEC	Coeficiente de correlação (R)
-	2,3928	2,5764	0,9989
1	2,2741	2,4512	0,9990
3	2,1236	2,2938	0,9992
4	1,9705	2,1307	0,9993
5	1,9484	2,1092	0,9993
6	1,9333	2,0953	0,9993

FONTE: Elaborado pelo autor.

É possível observar que com a retirada de amostras no conjunto de dados de calibração do modelo, o valor do coeficiente de correlação aumentou, passando de 0,9989 para 0,9993. Os valores não sofreram alterações consideráveis, demonstra que o conjunto de dados não foram encontrados valores anômalos significantes.

Os modelos de calibração para os ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico foram contruídos retirando as amostras outliers do conjunto de dados, pois sem elas o modelo possuem uma melhor capacidade preditiva.

De posse dos modelos de regressão, o próximo passo foi a validação externa empregando amostras fora do conjunto de calibração. Para tanto foram reservadas 19 amostras para a validação externa, que inicialmente havia sido separado pelo Toolbox SPA_GUI. Neste grupo de predição obteve os resultados apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Erros e correlações do conjunto de previsão frente ao conjunto de calibração.

Ácidos graxos	RMSEP	Coefficiente de correlação (R)
C16:0 Palmítico	2,5322	0,9984
C18:0 Esteárico	0,2483	0,9936
C18:1 Oleico	13,4951	0,9989
C18:2 Linoleico	14,1706	0,9982
C18:3 Linolênico	1,4016	0,9923

FONTE: Elaborado pelo autor.

Esses valores foram preditos pelo modelo a partir dos dados do espectro, comparando os resultados de teores obtidos pelo modelo com os valores de referência obtido a partir da cromatografia gasosa. Realizando então a validação externa de previsão com as amostras foi possível determinar quais os melhores modelos efetivamente, comparando os valores já conhecidos dos previstos para cada amostra, indicando a qualidade do modelo do ponto de vista de capacidade preditiva.

A Tabela 11 demonstra os valores dos erros encontrados para cada modelo.

Tabela 11 – Erros para cada modelo.

Ácidos graxos	RMSECV	RMSEC	RMSEP
C16:0 Palmítico	2,3928	2,5764	2,5322
C18:0 Esteárico	0,2003	0,2157	0,2483
C18:1 Oleico	4,5651	4,9155	13,4951
C18:2 Linoleico	5,5056	5,8442	14,1706
C18:3 Linolênico	1,6067	1,7300	1,4016

FONTE: Elaborado pelo autor.

Os modelos do ácido oleico e linoleico foram os que apresentaram maiores diferenças entre os valores de RMSECV e RMSEP. Esta diferença é por conta do algoritmo SPA_GUI, que busca das variáveis do conjunto de calibração e predição os que sejam mais ortogonais entre si, portanto a propriedade de interesse não é levada em consideração. Como nem sempre as variáveis mais ortogonais entre si são as que melhor explicam a propriedade de interesse, não é de todo surpreendente que este algoritmo não tenha fornecido modelos com melhores capacidades preditivas.

Em aplicações futuras deste trabalho, com o intuito de otimização a Tabela 8 demonstra os intervalos do espectro definidos para cada modelo de ácido graxo, sendo possível reduzir os custos e tempo de leitura dos espectros das amostras, utilizando as melhores regiões de características preditivas.

7. CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste projeto permitiu o aprofundamento de conhecimentos das técnicas de FTIR-ATR e cromatografia gasosa, propiciando o contato com análises de dados multivariados, que tem sido amplamente utilizada para tratamento de dados. Também houve o contato com o software MATLAB que é amplamente aplicado nas áreas de engenharia, ciências exatas e suas tecnologias e visa facilitar o processamento, quando há uma quantidade elevada de dados, como no caso de espectros.

Através da técnica de cromatografia gasosa, foi possível determinar as concentrações e composições de ácidos graxos presentes nos óleos de soja, palma, girassol e coco. Após, foram determinados os melhores intervalos do espectro do infravermelho médio para a aplicação do modelo de calibração multivariada sendo eles os menores valores de RMSECV encontrados nos intervalos das regiões de 600 a 3550 cm^{-1} para ácidos graxos palmíticos, esteárico, oleico, linolênico e de 2707 a 3128 cm^{-1} para o ácido linoleico.

Sendo assim, a associação da espectrofotometria no infravermelho com a calibração multivariada por mínimos quadrados parciais permitiu a criação de modelos para a quantificação de ácidos graxos de modo rápido e sem a geração de resíduos, visto que não há a necessidade de fazer qualquer alteração nas amostras para a obtenção dos espectros.

REFERÊNCIAS

- ACKMAN, R. G.; SIPOS, J. C. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detectors. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 41, n. 5, p. 377-378, 1964.
- ASTM. Sociedade Americana de Testes e Materiais. **Práticas padrão para análise quantitativa multivariada de infravermelho (1655-00)**. West Conshohocken, 2005.
- BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. Chemometrics: A practical guide. New York: **Wiley**, 1998.
- BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, 125, 2125, 2000.
- CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama, **Química Nova**, 24, 2001.
- COLINS, C. H.; C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S., eds. Em Fundamentos de Cromatografia; **Unicamp**: Campinas, 2006, cap. 1.
- GAMA, M. A. S. et al. Analytical shortcomings and other considerations related to the identification of biomarkers of dairy fat intake. **European journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 8, p. 1022-1023, 2017.
- GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial Least Squares Regression: A Tutorial, **Anal. Chim. Acta**, 1-17, 1986.
- HARRICK, N.J. Células de reflexão múltipla para espectrometria de reflexão interna. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 1, pág. 188-191, 1964.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, v. 22, p. 475-476, 1973.
- HIRAM, Araújo. *E-book - Análise Instrumental - Uma Abordagem Prática*. **Grupo GEN**, 2021.
- JIMÉNEZ-CARVELO, A. M. et al. Chemometric classification and quantification of olive oil in blends with any edible vegetable oils using FTIR-ATR and Raman spectroscopy. **LWT**, v. 86, p. 174-184, 2017.
- JORGE, N. Química e tecnologia de óleos vegetais. **São Paulo: Cultura Acadêmica**, v. 1, p. 165, 2009.
- JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 488-506, 1992.

MÁQUINA, A.D.V. et al. Espectrometria no infravermelho médio e métodos quimiométricos PLS-DA E PLS: classificação e previsão do teor de biodiesel na mistura de biodiesel/diesel de mafurra, moringa e algodão. 2017.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. London: **Prentice Hall**, 2000.

OTTO, Matthias. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**. John Wiley & Sons, 2016.

PERKIN ELMER. Disponível em <<https://www.perkinelmer.com/product/frontier-mir-spectrum-10-std-11280002>>. Acesso em março de 2021.

PINTO, J. S. S.; LANÇAS, F. M. Hidrólise do óleo de Azadirachta indica em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 394-397, 2010.

RAKESH, P.; CHARMI, P. Quantitative analytical applications of FTIR spectroscopy in pharmaceutical and allied areas. **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research Apr-Jun**, v. 4, n. 2, 2014.

RIBEIRO, E. P. Química de alimentos. **Editora Blucher**, 2007.

SANTOS, O. O. Comparação entre metodologias de metilação na determinação de ácidos graxos em amostras de carne por CG-DIC. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, 2020.

SARRAGUÇA, M. C.; LOPES, J. A. The use of net analyte signal (NAS) in near infrared spectroscopy pharmaceutical applications: Interpretability and figures of merit. **Analytica chimica acta**, v. 642, n. 1-2, p. 179-185, 2009.

SILVA, L. W. da; MARTIN, C.A. Quantificação de azeite de oliva em misturas com óleos vegetais utilizando FTIR e calibração por regressão linear múltipla. In: Alan Mario Zuffo; Jorge González Aguilera. (Org.). As Ciências Exatas e da Terra no Século XXI. 1ed.: **Atena Editora**, 2019, v., p. 173-176

SKOOG, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2002.

SOUZA, A. M. de; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

USP. United States Pharmacopeia convention. **General Chapters 401- Fats and Fixed Oils**. USA, 2017.

VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L.; BUYDENS, L. M. C.; JING, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE, J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B. Amsterdam: **Elsevier**, 1998.