

DETERMINAÇÃO DA AUTENTICIDADE DE AMOSTRAS DE AZEITE COMERCIAIS APREENDIDAS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO USANDO UM ESPECTROFOTÔMETRO PORTÁTIL NA REGIÃO DO NIR

Priscilla C. Santos^a, Flavia Tosato^b, Mirelly Cesconetto^a, Thayná Corrêa^a, Francine D. Santos^b, Valdemar Lacerda Jr.^b, André A. Pires^a, Araceli V. F. N. Ribeiro^a, Paulo R. Filgueiras^{b,†} e Wanderson Romão^{a,b,c,*}

^aInstituto Federal do Espírito Santo, 29106-010 Vila Velha – ES, Brasil

^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910 Vitória – ES, Brasil

^cInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense (INCT), Vitória – ES, Brasil

Recebido em 02/02/2020; aceito em 06/04/2020; publicado na web em 20/05/2020

DETERMINATION OF THE AUTHENTICITY OF COMMERCIAL OLIVE OIL SAMPLES SEIZED IN THE ESPÍRITO SANTO STATE USING A PORTABLE SPECTROPHOTOMETER IN THE NIR REGION. Many instrumental techniques are used to monitor the quality of food products, highlighting near infrared spectroscopy (NIRS). In order to determine the authenticity of 60 commercial oil samples seized by the Espírito Santo state police, this work used a portable spectrometer in the NIR region associated with chemometric tools such as principal component analysis (PCA) and partial least squares regression (PLS) to classify and quantify possible adulterants present such as soybean oil. In addition, physicochemical tests (acidity, peroxide and ultraviolet absorption) were carried out on commercial samples. The PLS regression model built to quantify soybean oil showed a coefficient of determination (R^2) greater than 0.99, showing itself to be satisfactory. The results showed that all samples analyzed had a high content of adulterant and cannot be classified as extra virgin olive oil.

Keywords: NIR; chemometrics; olive oil; soy oil.

INTRODUÇÃO

A apreensão de produtos alimentícios com suspeita de falsificação aumentou significativamente nos últimos anos, em decorrência do crescente número de casos de adulteração de alimentos, acarretando assim, em uma maior busca de controle e fiscalização.^{1,2}

A preocupação dos consumidores e órgãos fiscalizadores quanto à adulteração e fraude alimentar é que estas, embora praticadas desde os tempos remotos, se tornaram mais aprimoradas e minuciosas nos últimos anos.³ Devido a pouca possibilidade de descoberta, a fraude de alimentos tornou-se um problema emergente que causa impactos negativos, não só para a saúde do consumidor, mas também por acarretar prejuízos econômicos, sociais e ambientais.^{4,5}

O Brasil é um dos maiores produtores de alimentos do mundo e também encara a problemática da falsificação destes. Um exemplo disso é a adulteração do azeite de oliva extravirgem (AOEV), o qual é um produto com alto valor nutricional e econômico que pode ser modificado através da adição de óleos vegetais de menor valor comercial, como o óleo de soja.⁶

Os órgãos nacionais que apresentam normas e diretrizes para o controle de qualidade do AOEV são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).^{7,8} Apenas no ano de 2019, o MAPA proibiu a venda de mais de 30 marcas de AOEV, sendo esse número aumentado quando somados às apreensões de anos anteriores.⁹ Isto implica em vários malefícios, haja vista que o Brasil é um grande importador desse produto.¹⁰

A ANVISA e o MAPA impõem a determinação de quatro parâmetros físico-químicos para o monitoramento das propriedades físico-químicas do AOEV: acidez, índice de peróxido, absorvância no ultravioleta e análise sensorial. Porém, com o intuito de melhorar a fiscalização, vários métodos analíticos com maior sensibilidade e

seletividade vêm sendo utilizados na investigação de adulteração alimentar. Analisando na literatura, o número de artigos científicos publicados na última década (2010-2020, Figura 1), é possível mostrar que as principais técnicas utilizadas na análise e controle de qualidade de alimentos são: a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE),¹¹⁻²² cromatografia gasosa (CG),²³⁻²⁸ espectroscopia na região do ultravioleta (UV/VIS),^{23,29-35} espectroscopia na região do infra vermelho próximo, *near infrared spectroscopy* (NIRS),³⁶⁻⁵⁴ espectroscopia na região do infravermelho médio, *mid infrared spectroscopy* (MIRS),⁵⁵⁻⁶² espectroscopia Raman,^{40,52,63-74} ressonância magnética nuclear (RMN)^{33,75-86} e narizes eletrônicos (*electronic noses*, E-noses).^{50,87-91}

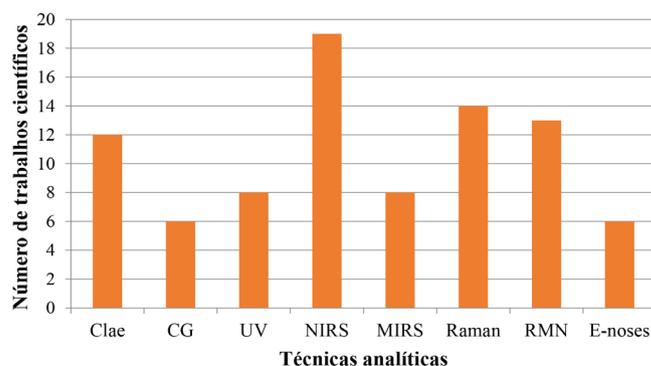


Figura 1. Número de trabalhos científicos envolvendo técnicas analíticas na análise de alimentos entre os anos de 2010 - 2020

Lohumu *et al.*, em 2015, enfatizaram que dentre as técnicas espectroscópicas vibracionais (infravermelho próximo, infravermelho médio, espectroscopia Raman e imagens hiperespectrais) a NIRS, combinada com ferramentas quimiométricas, destaca-se no que diz respeito a análise de alimentos.⁹² A Tabela 1 apresenta importantes aplicações, ao longo de vários anos, enfatizando o emprego da NIRS com ênfase no controle de qualidade de óleos comestíveis.⁹³⁻¹⁰⁴

*e-mail: wandersonromao@gmail.com

†e-mail alternativo: filgueiras.pr@gmail.com

A NIRS fornece informações espectrais baseadas em sobretons e bandas de combinação de grupos funcionais específicos.¹⁰⁵ Esses espectros são gerados a partir das vibrações de moléculas que possuem fortes interações entre seus átomos, as quais possuem, em geral, átomos de C, N e O ligados ao átomo de H.¹⁰⁶ Por esse motivo, a NIRS é amplamente empregada na análise de moléculas orgânicas sendo capaz de fornecer ricas informações acerca da composição de um produto alimentar.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸

No que tange à determinação de adulteração em amostras de AOEV, a NIRS possui grande aplicação.¹⁰⁹ As principais regiões que caracterizam o AOEV podem ser encontradas nas faixas de 1140-1250 nm e 1350-1500 nm devido à absorção de grupos funcionais de ácidos graxos livres e moléculas insaturadas, os quais são abundantes em óleos.¹¹⁰ Também foi relatado que compostos presentes no AOEV como clorofila, carotenóides e ácido oleico absorvem na região de 450 nm, 670 nm e 1725 nm,¹¹¹⁻¹¹³ respectivamente. É possível encontrar diversos artigos na literatura relacionados ao uso da NIRS à qualidade do azeite evidenciando a eficácia dessa técnica.

Em 2016, Karunathilaka *et al.* utilizaram a NIR como uma ferramenta de triagem rápida e direcionada para autenticidade de produtos de AOEV obtendo como resultado uma diferença significativa entre os espectros do AOEV daqueles adulterados nos comprimentos de 5150 a 5350 cm^{-1} , viabilizando a utilização da NIRS para este tipo de análise.¹¹⁴ Em 2018, Vanstone *et al.* desenvolveram um método utilizando a NIRS associada a quimiometria, PCA (análise de componentes principais), para detectar adulteração em AOEV com outros tipos de óleos comestíveis, são estes: óleo de soja, milho, girassol e canola; que não necessita de preparação de amostra e podendo ser concluído em menos de 10 minutos. O estudo em questão determinou as porcentagens mais baixas de detecção para os adulterantes citados anteriormente, obtendo como resultado porcentagens, em massa, de aproximadamente 20% para óleos de milho e girassol, 15% para óleo de soja e de 10% para óleo de canola, apresentando bons limites de detecção para o método NIR.¹¹⁵ Em 2018, Willenberg *et al.* desenvolveram modelos quimiométricos para prever, através da NIRS, os parâmetros físico-químicos como acidez, índice de peróxido, K_{232} e K_{270} , índice de p-Anisidin, pirofcofitina A e diacilgliceróis isoméricos, associando esses parâmetros à análise sensorial. Adicionalmente, nesse estudo também foi possível prever o grau de envelhecimento do AOEV.¹¹⁶ Além desses, em 2019, Yan, Stuijvenberg e Ruth, também utilizaram a NIRS, a fim de classificar amostras AOEV em função de seus dados composicionais, utilizando agora um equipamento portátil. Como resultado, o estudo revelou como promissor a utilização do NIR portátil, uma vez que foi capaz de diferenciar 130 amostras comerciais de azeites.¹¹⁷

Os equipamentos miniaturizados e portáteis estão sendo desenvolvidos para suprirem o custo elevado de manutenção, alta complexidade e difícil operação que muitas técnicas analíticas possuem. Exemplo disso é o micro espectrômetro portátil na região do NIR (*MicroNIR*). Esse possibilita uma análise *in loco* sem destruição da amostra com custo e tempo reduzidos.^{118,119} O emprego da NIRS portátil na análise de alimentos já tem mostrado muitos resultados satisfatórios, inclusive na análise de óleos. Em 2017, Basri *et al.* utilizaram o *MicroNIR* na análise de óleo de palma com o objetivo de diferenciar amostras puras de amostras adulteradas com banha de porco, sendo que o modelo construído possibilitou a detecção do teor deste adulterante abaixo de 0,5 wt%.¹²⁰ A qualidade do óleo de palma também foi avaliada por Kaufmann *et al.* em 2019, em que a acidez foi determinada nas amostras utilizando a NIRS portátil.¹²¹ Oliveira *et al.*, em 2020, conseguiram determinar a autenticidade do colorau em pó adulterado com amido de batata, goma arábica e urucum utilizando a NIRS portátil.¹²² Também utilizando essa técnica, Pan *et al.*, em 2015, avaliaram o teor de umidade, sólidos solúveis, sacarose

assim como propriedades mecânicas em amostras de beterraba.¹²³ A NIRS portátil também foi utilizada em estudos realizados em café, leite e carne.¹²⁴⁻¹²⁶

No que tange a análise de café, em 2018, Correia *et al.* utilizou a técnica NIR portátil a fim de avaliar a qualidade do café Arábica através da quantificação de adulterações. Para isso, foram produzidas 125 amostras contendo um total de treze concentrações distintas de adulterante, variando de 1 a 100 wt%.¹²⁴ Já para análise de amostras de leite, também em 2018, Liu *et al.* estudaram a evolução da técnica NIR portátil para autenticação do leite orgânico comparando com o NIR de bancada, avaliando 37 amostras de leites orgânicos de varejo. Eles obtiveram um resultado semelhante entre as duas técnicas.¹²⁵ Já em 2020, Savoia *et al.* estudaram a qualidade da carne diretamente do abatedouro utilizando o NIR portátil, analisando músculo bovino e carcaças de touros jovens, obtendo resultados satisfatórios.¹²⁶

Assim como nos estudos apresentados, a NIRS portátil possui grande utilidade no que diz respeito à avaliação da autenticidade do AOEV, pois este se trata de um produto que é alvo frequente de adulterações e necessita de análises rápidas, de baixo custo e confiáveis. Entretanto, apesar da ampla aplicação, existem poucos relatos na literatura do uso da NIRS portátil para o emprego de amostras comerciais que são suspeitas de fraude. Por esse motivo, o presente trabalho, em parceria com a Polícia Civil do Estado do Espírito Santo, utilizou o *microNIR* associado aos modelos quimiométricos como PCA e PLS (regressão por mínimos quadrados parciais) a fim de determinar a autenticidade de 60 amostras comerciais de AOEV e prever a quantidade de óleo de soja presente nas mesmas. Nessas amostras, foram também avaliados os parâmetros físico-químicos como: acidez, índice de peróxido e absorvância no ultravioleta.

METODOLOGIA

Amostras e reagentes

Um total de 60 amostras de azeite comercial, das marcas Anna[®], Fazenda Herdade[®], Oliveiras do Conde[®], Porto Galo[®] e Serra de Montejunto[®], provenientes de diferentes estabelecimentos de coleta, foram fornecidos pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo (PC-ES). Para uma das marcas foram apreendidas amostras do tipo AOEV e óleo composto contendo uma mistura 51:49 wt% AOEV:óleo de soja. Para as demais marcas foram apreendidas apenas amostras de AOEV. As marcas foram aleatoriamente nomeadas de A – E conforme apresentado na Tabela 2 juntamente com as informações descritas nos rótulos das mesmas. Além disso, para a elaboração do modelo de classificação quimiométrico, outras amostras foram também estudadas como: amostras comerciais de AOEV (marcas Olive[®], Olisur[®], Santiago[®], Chile[®], O-live[®] (referência), Midas[®], Komili[®], Cocinero[®], Borges[®], Nova oliva[®], Ecolive[®] e Gallo[®]); óleo vegetal de soja (da marca Liza[®], Cargill agrícolas S A, Mairinque, Brasil) e óleos compostos (Dom João[®] - 30 wt% de AOEV; Maria[®] - 12 wt% de AOEV, Vittoria - 51 wt% de AOEV; e Faisão[®] - 5 wt% de AOEV).

Todos os reagentes utilizados (clorofórmio, éter etílico, ambos da marca Hexis[®], Indaiatuba, Brasil); álcool etílico, cicloexano, ácido acético, iodeto de potássio, fenolftaleína, e tiosulfato de sódio (Neon[®], Suzano, Brasil) e hidróxido de sódio (Dinâmica[®], Indaiatuba, Brasil) possuíam grau analítico.

Para o desenvolvimento do método de quantificação de óleo de soja em amostras de AOEV, misturas binárias foram produzidas, cada concentração em triplicata, a partir da pesagem de uma massa total de 4 g de AOEV com 19 concentrações de óleo vegetal (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45; 50; 55; 60; 70; 80; 90 e 100 wt%).

Tabela 1. Aplicações da NIRS na análise e controle de qualidade de óleos relatadas na literatura.

Ano	Aplicação	Instrumento utilizado	Faixa/ região espectral	Modelo quimiométrico empregado	Referência
1994	Classificação de óleos vegetais	InfraAlyzer 500	1600 - 2200 nm	PCA	Sato ⁹³
1996	Detecção de adulteração em AOEV	NIRSystems 6500	1100 - 2498 nm	PCA	Wesley <i>et al.</i> ⁹⁴
1998	Avaliação da qualidade de óleo e gordura de fritura	FT-NIR universal spectrometer (NIRVIS)	10000 - 4000 cm ⁻¹	PLS	Hein <i>et al.</i> ⁹⁵
2002	Detecção de adulteração em AOEV	NIRSystems 6500	1100 - 2498 nm	PLS	Downey <i>et al.</i> ⁹⁶
2005	Avaliação da qualidade de óleo de peixe	NIRSystems 5000	1100 - 2500 nm	PCA, PLS	Cozzolino <i>et al.</i> ⁹⁷
2005	Avaliação da qualidade de óleos comestíveis	Nicolet 870 spectrometer	8000 - 4000 cm ⁻¹	PCA, PLS	Yang <i>et al.</i> ⁹⁸
2008	Avaliação da qualidade de óleos comestíveis	Spectrum GX FT-NIR	6134 - 3068 cm ⁻¹	PLS	Pereira <i>et al.</i>
2013	Avaliação da qualidade de AOEV	MPA FT-NIR	12500 - 4000 cm ⁻¹	PLS	Inerejos-García <i>et al.</i> ⁹⁹
2017	Detecção da quantidade de α -tocoferol e tocoferóis totais em AOEV	Luminar 5030	1100 - 2300 nm	PCA, PLS	Cayuela <i>et al.</i> ¹⁰⁰
2018	Detecção de adulteração em óleo de gergelim	Antaris II FT-NIR	10000 - 4500 cm ⁻¹	PLS	Chen <i>et al.</i> ¹⁰¹
2018	Detecção de adulteração em óleo de girassol	FT-NIR Spectrometer - MATRIX-F 144	833 - 2300 nm	PLS	Picouet <i>et al.</i> ¹⁰²
2019	Detecção de adulteração em óleo de argan	AVS-USB 2000	1000-1700 nm	PCA, PLS	Farres <i>et al.</i> ¹⁰³
2020	Avaliação da qualidade de AOEV	Buchi 137 NIRFlex N-500	10000 - 4000 cm ⁻¹	PLS	Mustorgi <i>et al.</i> ¹⁰⁴

Tabela 2. Valores de acidez, peróxido e extinção específica descritos nos rótulos das marcas analisadas, assim como quantidade de amostras para cada marca

Marca	Acidez	Peróxido	Extinção específica a 270	Extinção específica a 232	delta K	Quantidade de amostras
A – (EV)	< 0,4%	≤ 20 meq/kg	≤ 0,22	≤ 2,5	≤ 0,01	14
B – (EV)	< 0,5%	≤ 20 meq/kg	≤ 0,22	≤ 2,5	≤ 0,01	20
B – (51%)	-	-	-	-	-	3
C – (EV)	< 0,2%	≤ 20 meq/kg	≤ 0,22	≤ 2,5	≤ 0,01	5
D – (EV)	< 0,4%	≤ 20 meq/kg	≤ 0,22	≤ 2,5	≤ 0,01	6
E – (EV)	< 0,2%	≤ 20 meq/kg	≤ 0,22	≤ 2,5	≤ 0,01	12

Análises físico-químicas

Acidez

Compreende-se o índice de acidez como um ensaio volumétrico para avaliar a qualidade e a pureza do azeite. Com esse teste, é possível avaliar se o azeite esteve em contato com água durante o processo de fabricação, uma vez que determina o teor de ácidos graxos livres resultantes de reações de hidrólise, por meio da porcentagem de ácido oleico. Dessa forma, quanto maior o índice de acidez, maior o nível de deterioração do azeite.^{127,128} A legislação determina um valor de acidez máximo de 0,8 wt% de ácido oleico para AOEV.

Para a análise do índice de acidez das amostras de azeite comercial, a norma do Instituto Adolfo Lutz foi utilizada como referência.¹²⁹ Assim, uma massa de 2 gramas de amostra foi pesada em um erlenmeyer de 125 mL, adicionando-se 25 mL de solução éter-álcool etílico (2:1) neutra e 3 gotas de fenolftaleína. Após, a titulação foi efetuada com solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os valores de acidez (% de ácido oleico) foram calculados de acordo com a Equação 1, onde V corresponde ao volume de hidróxido de sódio gasto na titulação (L), C é a concentração da solução de hidróxido de sódio (dado em mol L⁻¹), M é a massa molar do ácido oleico (em g mol⁻¹) e m corresponde a massa da amostra (em g).

$$acidez = \frac{V \times C \times M}{10 \times m} \quad (1)$$

Peróxido

Determinado de acordo com o anexo III do regulamento da Comissão Europeia nº 2568 de 11 de julho de 1991,¹³⁰ o índice de peróxido trata-se de um teste volumétrico utilizado para determinar a oxidação inicial, a rancidez e deterioração que pode ter ocorrido nos antioxidantes naturais presentes no azeite.¹³¹ A legislação estabelece um limite de 20 meq/kg para AOEV.

Dessa forma, uma massa de 2,5 g de cada amostra foi pesada em um erlenmeyer de 250 mL, sendo essa dissolvida em 8 mL de clorofórmio, 12 mL de ácido acético glacial e 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio, e deixada por 1 minuto em repouso em ambiente isento de luz. Após, foram adicionados 15 mL de água destilada e 0,5 mL de solução saturada de amido, utilizado como indicador para posterior titulação.

Em sequência, titulou-se com solução de tiosulfato 0,01 N, além de um ensaio em branco, que consiste na titulação sem o analito. Com os dados obtidos nas titulações em triplicata, o índice de peróxido foi calculado conforme a Equação 2.

$$índice\ de\ peróxido = \frac{(A - B) \times N \times 1000}{m} \quad (2)$$

em que, A corresponde ao volume da solução de tiosulfato de sódio (L) gasto na titulação da amostra, B ao volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (L), N (m E g⁻¹ L⁻¹) à normalidade da solução de tiosulfato de sódio e m à massa da amostra (g).

Absorbância no Ultravioleta

A absorbância no ultravioleta é um exame espectrofotométrico para avaliar a qualidade do AOEV por informar sobre a identidade e estado de conservação do mesmo, além de indicar possíveis alterações advindas do processamento. Foi determinado segundo o anexo IX do regulamento da Comissão Europeia nº 2568 de 11 de julho de 1991.¹³²

Assim, uma massa de aproximadamente 0,25 g de amostra foi dissolvida em 25 mL de cicloexano e foram lidas as absorbâncias em espectrofotômetro UV/VIS de feixe duplo modelo UV-vis Cary 60 da Agilent. Os coeficientes de extinção foram lidos nos comprimentos de onda de 232 nm, 270 nm e ΔK foram calculados conforme a Equação 3.

$$K_{270} = \frac{A_{270}}{cl} \quad K_{232} = \frac{A_{232}}{cl} \quad \Delta K_{232} = A_{270} - \frac{A_{266} + A_{274}}{2} \quad (3)$$

K_{232} = Extinção específica a $\lambda = 232$ nm; K_{270} = Extinção específica a $\lambda = 270$ nm; ΔK = Extinção específica no comprimento de onda para a máxima absorção em torno de 270 nm; A_{270} , A_{232} , A_{266} e A_{274} são absorbâncias, c é a concentração do azeite em g/100 mL, e l é o percurso óptico (= 1 cm).

As absorbâncias foram adquiridas nos comprimentos de 232 e 270 nm, por decorrência da presença de sistemas dienos e trienos conjugados, e os valores são datados em termos de extinção específica.¹³¹

Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho foi realizada utilizando um instrumento modelo miniatura *MicroNIR*™ Pro 1700. Os dados foram obtidos do software 3.0 da Viavi Solutions Inc. Os espectros foram adquiridos na faixa de 908-1676 nm, com varredura de 100 espectros, um tempo de integração de 8 ms, aquisição de 125 pontos por varredura, e com uma resolução de 6,20 nm.¹³⁰

As amostras foram analisadas a partir do acessório de transmitância (Figura 2) e foi utilizada uma cubeta de quartzo de 2 mL com um caminho óptico de 1 cm. A leitura do espectro de referência é feita com a cubeta vazia.



Figura 2. Acessório para análise de líquidos em cubeta acoplado ao MicroNIR

Análise por Componentes Principais (PCA)

Ao todo, 92 amostras foram analisadas em triplicata e para a construção dos modelos utilizou-se o espectro médio. Como os espectros NIR normalmente apresentam desvios na linha de base e efeitos de espalhamento de luz,¹³³ os espectros foram tratados com o algoritmo de Savitzky-Golay com primeira derivada, janela de sete pontos e polinômio de ajuste de segunda ordem.¹³⁴ Na construção dos modelos PCA e PLS os espectros ainda foram centrados na média. O conjunto de 92 amostras correspondem a 12 amostras de AOEV, 6 de óleos compostos, 1 de óleo de soja e 19 das misturas preparadas de AOEV e óleo vegetal. As outras 60 amostras correspondem às amostras apreendidas pela PC-ES.

Na PCA, os dados são projetados em menores dimensões, calculadas por combinações lineares (componentes principais, PC), em particular, a partir dos valores de absorbância para cada comprimento de onda. As duas primeiras PC's foram responsáveis pela maior variabilidade total dos dados originais e foram avaliados em função do teor de adulteração (óleo vegetal adicionado ao AOEV).

PLS

Modelos PLS foram construídos para a curva da mistura AOEV/óleo de soja no modo transmitância. O PLS foi usado para determinar o teor de óleo de soja na mistura com AOEV, sendo utilizado o procedimento de *repeated double cross validation* (RDCV).¹³⁵ O número correto de variáveis latentes foi determinado pelo procedimento *k-fold*, utilizando k igual a 5. Durante o procedimento RDCV, aproximadamente 25% do total de amostras foram separadas em cada interação. Em cada interação foi tomado o cuidado para que todas as réplicas de uma amostra ficassem no mesmo conjunto, seja calibração ou validação. O erro quadrado médio de predição (RMSEP) foi determinado conforme Equação 4.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{npred} \sum (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (4)$$

Em que $npred$ é o número de amostras utilizadas e \hat{y}_i é o valor previsto pelo modelos PLS (teor de óleo vegetal em AOEV) do conjunto de dados de 19 concentrações da mistura AOEV/óleo vegetal. Os valores de viés, R^2 , LD e LQ foram calculados utilizando as Equações 5 a 8.^{136,137}

$$viés = \sum_{i=1}^n \frac{y_i - \hat{y}_i}{N} \quad (5)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2} \quad (6)$$

$$LD = 3,3\delta_x \|b_k\| \quad (7)$$

$$LQ = 10\delta_x \|b_k\| \quad (8)$$

em que b_k é o coeficiente de regressão do modelo PLS para k -variável com base no modelo de regressão e δ_x corresponde a estimativa do ruído instrumental, determinado como a variância média da matriz de resíduos instrumental.¹³⁴

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises físico-químicas

De uma maneira geral, os resultados das análises físico-químicas das amostras comerciais evidenciaram que para os testes de acidez e índice de peróxido todas as amostras se apresentaram dentro da conformidade. No entanto, algumas amostras demonstraram não conformidades mediante o teste de extinção específica, que analisa comprimentos de onda no UV-VIS.

O resultado para o teste de acidez está apresentado na Figura 3(a). Embora todas as amostras apresentassem conformidade no que diz respeito ao limite estabelecido para o índice de acidez (0,8% ácido oleico), as quais apresentaram valores de 0,13 - 0,36 wt% ácido oleico, algumas amostras das marcas C (C1, C3 e C5) e E (E2, E6, E7, E9, E11 e E12) encontraram-se acima do valor de acidez, 0,2 wt% ácido oleico, descrito em seus rótulos.

No que tange a análise do índice de peróxido, os valores variaram de 1,44 – 13,33 meq/kg. A legislação estabelece um limite de 20 meq/kg para AOEV. Como apresentado na Figura 3(b), os valores encontram-se dentro do estabelecido. Assim, a presença de peróxidos e outros compostos com semelhanças químicas, resultantes da oxidação dos ácidos graxos insaturados são observadas em meq O₂/kg (miliequivalente de oxigênio ativo por quilograma).

Em relação à análise da absorvância no ultravioleta, os valores, como apresentado na Figura 4, variaram de 0,396 – 2,649 para K₂₇₀, 1,470 – 2,820 para K₂₃₂ e -1,894 – 0,498 para ΔK. Todas as amostras se encontram fora dos padrões estabelecidos, tendo em vista, que segundo a legislação referente ao AOEV, os limites para os valores K₂₇₀, K₂₃₂ e ΔK são de 0,22, 2,5 e 0,01, respectivamente.

A análise de absorção no ultravioleta indica a presença de trienos conjugados e produtos de oxidação secundária (270 nm) assim como a presença de compostos carboxílicos, dienos conjugados e hidroperóxidos de ácido linoleico (232 nm). Um alto valor de absorção nesses comprimentos de onda evidencia a presença de óleos refinados, tendo em vista que o processo do refino é responsável por formar, a partir de ácidos graxos insaturados, compostos dienos e trienos conjugados.¹³⁸

Portanto, tanto para o teste de extinção específica como para os outros parâmetros, o azeite só pode ser classificado como extra virgem quando este atender a todos os limites de tolerância de qualidade estabelecidos. Caso contrário, o azeite é classificado como fora de tipo e não pode ser comercializado como sendo extra virgem.⁸

Os valores detalhados dos resultados obtidos para as análises de acidez, peróxido e absorção no ultravioleta, também se encontram nas Tabelas 1S-3S, disponíveis no material suplementar.

Espectroscopia NIR portátil

A Figura 5 traz os espectros NIR brutos (Figura 5a) e após a aplicação da primeira derivada (Figura 5b) para as amostras de azeite

apreendidas, AOEV comerciais, óleos compostos e óleo de soja. Note que, em geral, os espectros são bastante semelhantes, não sendo possível uma diferenciação visual do adulterante. Por isso, aplicam-se modelos quimiométricos, para a maximização das diferenças que possibilitem a identificação de padrões na identidade química das diferentes matrizes.

No perfil espectroscópico, observa-se as principais bandas de absorção localizadas em duas regiões: de 1100 a 1300 nm e 1350 a 1550 nm. A região de 1100 – 1300 nm é característica do segundo sobretom de vibrações das ligações C-H, referentes aos grupos funcionais -CH₂, -CH₃ e -CH=CH-.^{139,140} Essas bandas são coerentes com a composição química formada por triacilgliceróis, ácidos graxos, entre outros. Em um estudo feito por Hourant *et al.* em óleos e gordura, percebeu-se que os óleos ricos em ácidos graxos insaturados apresentaram uma absorção mais evidente próximo a 1164 nm. Também foi relatado que a absorção na região de 1180 está relacionada com o grupo C-H de ácidos graxos puros contendo ligações duplas cis.¹⁴¹ A região de 1390 – 1490 nm está relacionada à combinação de vibração de estiramento C-H.¹⁴²

Para identificar padrões nas amostras, o modelo PCA foi construído, a partir dos espectros NIR das amostras apreendidas juntamente com amostras de outros AOEV comerciais, óleos compostos e uma amostra de óleo de soja (Figura 6a). Podemos observar que as amostras de azeite apreendidas se agrupam na região de PC1>0, distantes das demais marcas comerciais que são classificadas como AOEV. Destaca-se também que a amostra de óleo de soja está na mesma região da PC1>0. Isso indica semelhança química entre as amostras, onde o gráfico de *loadings* (Figura 6b) evidencia a região de 1100 a 1150 nm e 1200 a 1300 responsável pela variância dessas amostras (regiões que caracterizadas pelo segundo sobretom de vibrações das ligações C-H).

Após a observação de padrões no perfil químico dos *loadings* da PCA das amostras apreendidas, o modelo de regressão PLS foi

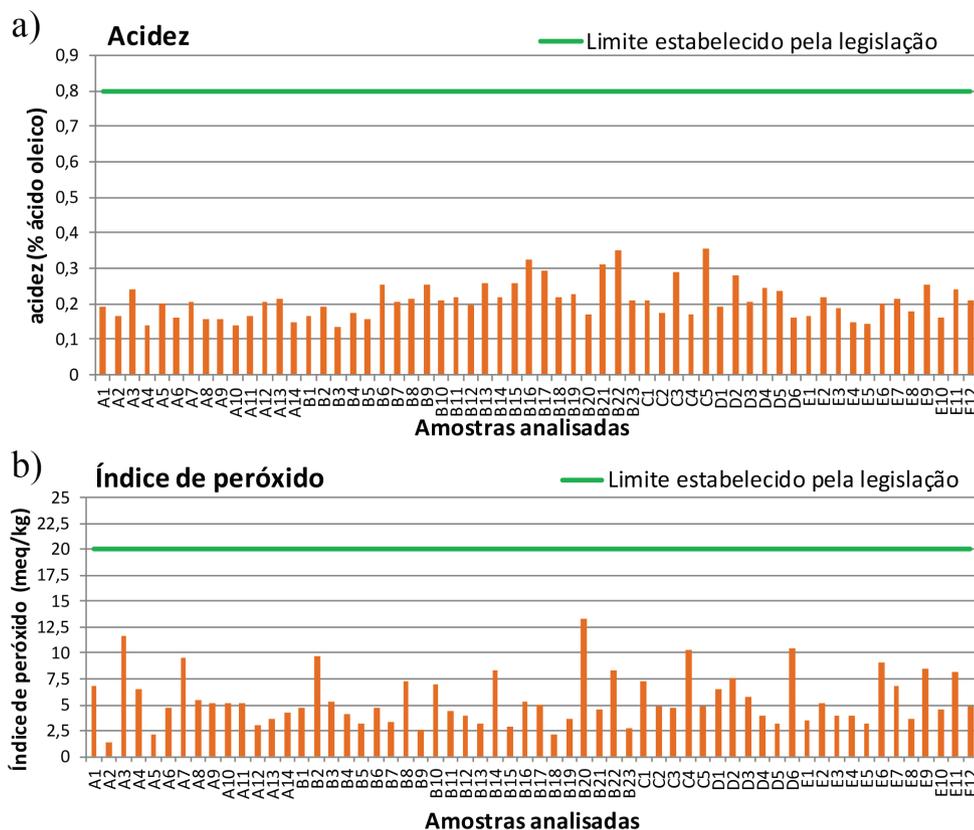


Figura 3. Valores experimentais para as análises de (a) acidez e (b) peróxido realizadas nas amostras apreendidas

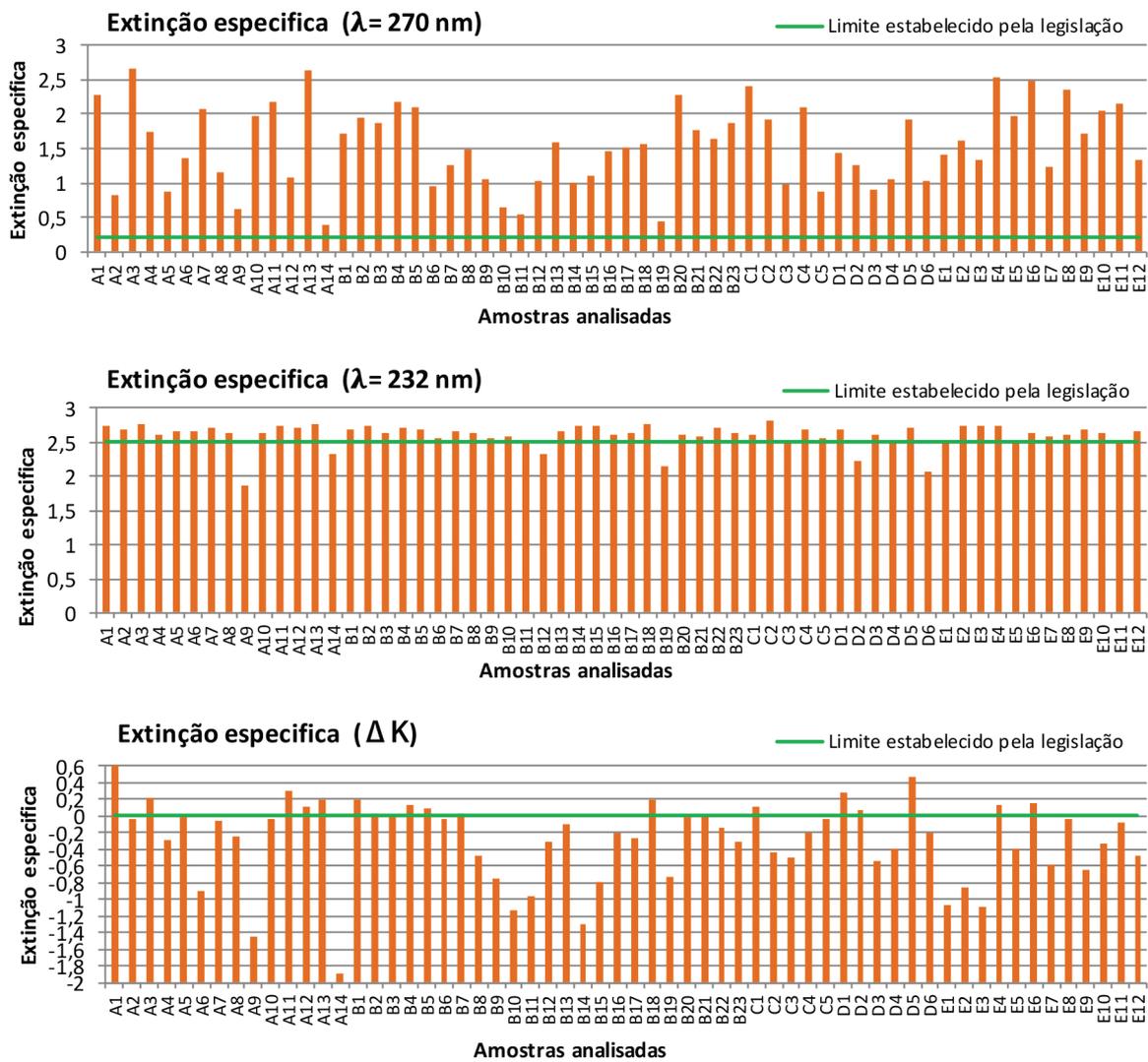


Figura 4. Resultado das análises da absorvância no ultravioleta, com os valores de extinção específica nos comprimentos de onda de 270 e 232 nm assim como ΔK calculado

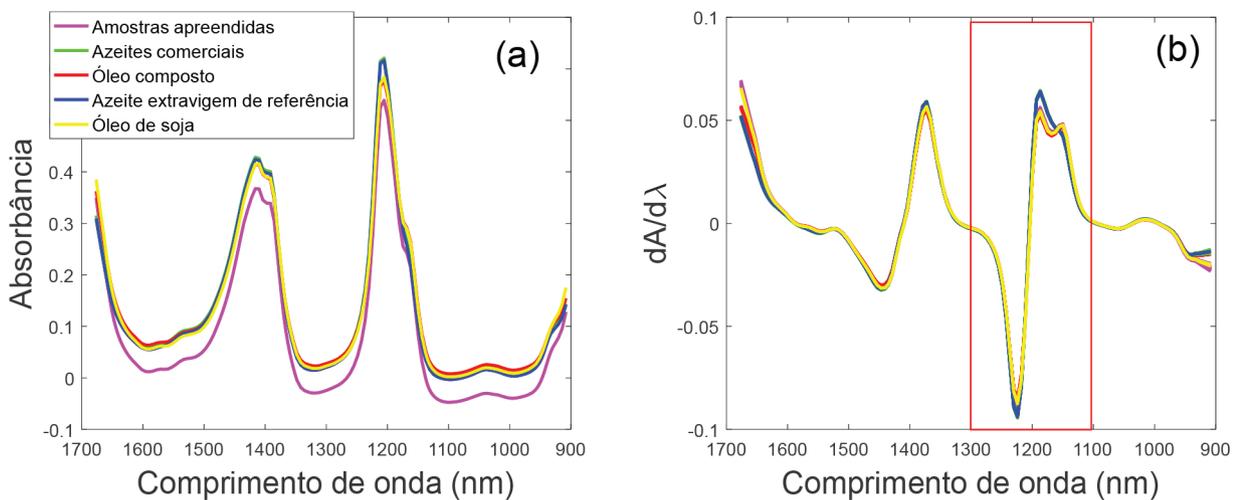


Figura 5. Espectros de infravermelho na região do proximo para as amostras de azeites apreendidas (a) brutos, e (b) tratados com a primeira derivada

construído para estimar o teor de óleo de soja nas amostras apreendidas. Para isso, foram utilizadas 19 blends de óleo de soja em AOEV (com valores de 0 a 100 wt%), o modelo PLS construído com duas variáveis latentes (Figura 7) apresentou um erro quadrático médio

de previsão (RMSEP) de 4,8 wt% e um coeficiente de determinação (R^2) de 0,975, viés do modelo de 0,08 wt% e valores de LD e LQ de 1,0 wt% e 3,4 wt% respectivamente (Figura 7a). Os valores de intervalo com 95% de confiança (IC95) das estimativas variam de

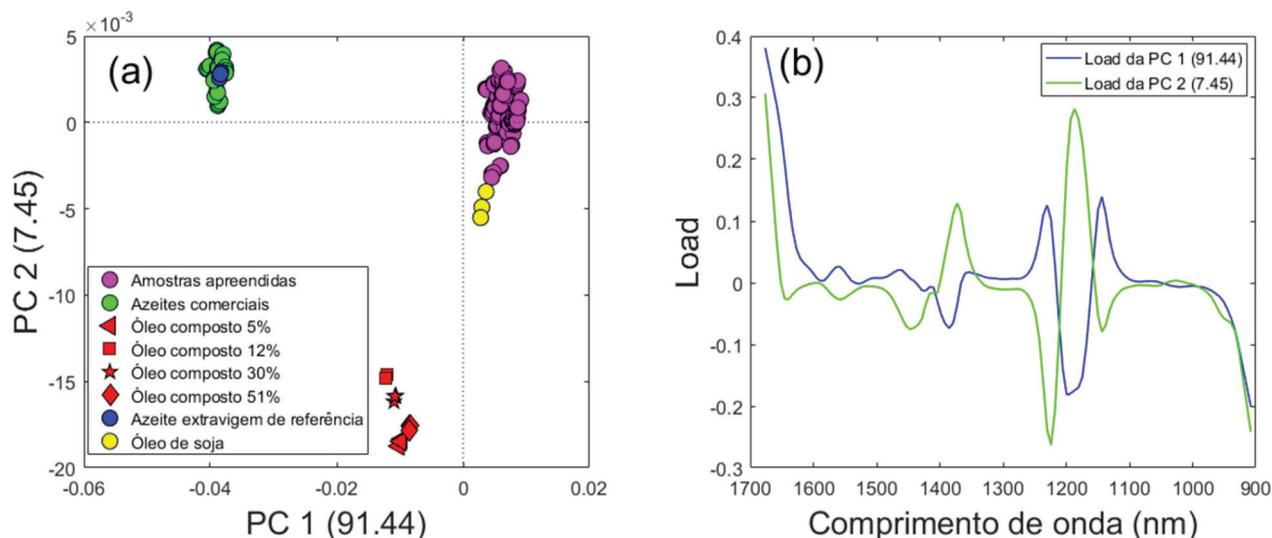


Figura 6. Gráficos de Scores para amostras de azeite apreendidas juntamente com amostras de óleo composto, AOEV comerciais e óleo de soja, e os (b) loadings referentes às PC's 1 e 2

6,9 a 9,8 wt%, valores acima do LQ. Devido ao IC95 ser 6,9 wt% para o ponto inicial da curva, este modelo não se aplica para valores de adulteração abaixo de 7 wt%. O valor de viés apresentou ser não significativo no teste-t ao nível de significância de 5%. O valor de R^2 mostra uma boa relação dos valores estimados pelo PLS com os de referência. A elipse de confiança contém o ponto ideal (1,0) confirmando a validade modelo é válido (Figura 7b).

As amostras de azeite apreendidas foram aplicadas ao modelo de quantificação construído, sendo que, a partir dos valores preditos (Tabela 3), observa-se que todas as amostras apresentaram alto teor de óleo de soja presente. Entre as amostras, apenas quatro (B1, B9, B13 e B16) foram quantificadas com menos de 100 wt% de óleo de soja. O modelo PLS também foi aplicado para as amostras de AOEV (AZ) e óleo de soja (OS), e os valores encontrados foram 0,01% e 105,7 wt% de óleo de soja, respectivamente. Os valores estimados do teor de óleo de soja acima de 100 wt% estão dentro do intervalo de 95% de confiança na estimativa (9,8 wt% para 100% de óleo de soja).

Tanto as análises físico-químicas quanto as espectroscópicas apontaram adulteração nas amostras apreendidas. Apesar dos testes de acidez e índice de peróxido não estarem relacionados com

adulteração, estes evidenciaram que as amostras possuíam boa qualidade, resultado esperado devido às amostras estarem armazenadas há pouco tempo, não sofrendo alta exposição da luz, oxigênio ou umidade. Por outro lado, os resultados das análises de absorção no ultravioleta indicaram a presença de óleo refinado nas amostras analisadas, o que também é observado através dos resultados da PCA, em que as amostras apreendidas se agruparam com as amostras de óleo de soja ($PC1 > 0$) e da quantificação, na qual as amostras apresentaram alto teor desse adulterante.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que o MicroNIR, em conjunto com os modelos quimiométricos (PCA e PLS), mostrou-se uma ferramenta analítica eficaz na determinação da autenticidade das amostras de azeite apreendidas. Através do modelo PCA foi possível identificar as amostras como sendo AOEV autêntico; AOEV adulterado com 100% de óleo de soja (amostras apreendidas); e óleo composto (misturas de AOEV com óleo de soja). A partir do modelo PLS quantificou-se o teor de óleo de soja, encontrando valores de até 100 wt%, na

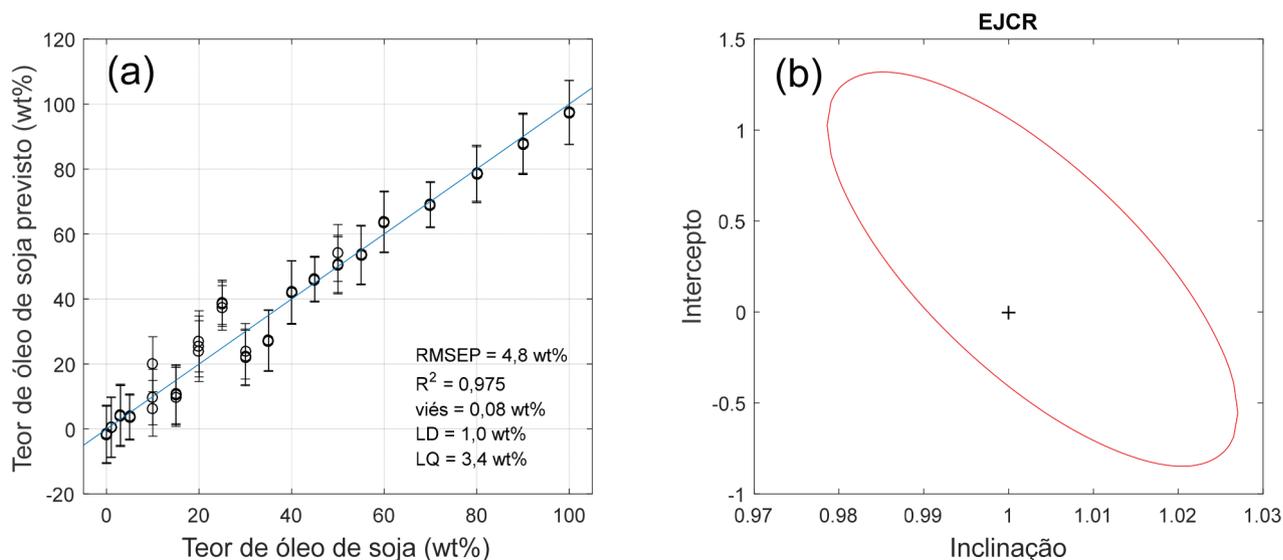


Figura 7. (a) Gráficos dos valores preditos e de referência de óleo de soja na curva de 40 a 100 wt% em AOEV/óleo de soja com 95% de confiança. (b) elipse de confiança EJCR

Tabela 3. Valores de previsão de óleo de soja presente nas amostras de azeites aprendidas pela PC-ES aplicado ao modelo PLS

COD	% de óleo prevista	COD	% de óleo prevista	COD	% de óleo prevista
A1	104,2	B8	102	D1	102,1
A2	105,8	B9	97,9	D2	101,7
A3	101,5	B10	100,5	D3	107
A4	104,8	B11	103,6	D4	107,6
A5	106,5	B12	103,5	D5	107,6
A6	103,7	B13	97,6	D6	101,5
A7	104,2	B14	101,6	E1	109,1
A8	100,9	B15	100,8	E2	102,5
A9	105,3	B16	98,5	E3	108,9
A10	104,1	B17	104,9	E4	109,2
A11	104,3	B18	103,5	E5	109,1
A12	106,6	B19	101,1	E6	107,6
A13	104,5	B20	108,5	E7	102,9
A14	104,1	B21	104,4	E8	109,1
B1	97,3	B22	104,5	E9	106,8
B2	101,9	B23	101,5	E10	109,1
B3	105,3	C1	109,4	E11	107,6
B4	101,8	C2	109,2	E12	102,3
B5	101,6	C3	104,6	AZ	0,01
B6	100,9	C4	108,9	OS	105,7
B7	100,2	C5	104,4		

maior parte dos casos. Comparando esses dados aos resultados das análises físico-químicas, todas as amostras foram classificadas como não sendo de óleo extra virgem, apresentando não conformidade para a propriedade de extinção específica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES (23038.007083/2014-40), FAPES (EDITAL CNPq/FAPES N° 23/2018 – PRONEM (596/2018) e edital EDITAL FAPES N° 11/2018 – PIBICES 2018), e ao CNPq (422555/2018-5, e 305359/2017-7) pelo suporte financeiro. Os autores também gostariam de agradecer ao Núcleo de Competências em Química do Petróleo e ao LabPetro pelo uso de suas instalações e a Polícia Civil do Espírito Santo pelo fornecimento das amostras.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Algumas imagens dos sistemas utilizados neste trabalho estão disponíveis, para melhor compreensão, em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

REFERÊNCIAS

- Peng, G.; Chang, M.; Fang, M.; Liao, C.; Tsai, C.; Tseng, S.; Kao, Y.; Chou, H.; Cheng, H.; *Food Control* **2017**, *72*, 145.
- Kowalska, A.; *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.* **2018**, *66*, 1275.
- Manning, L.; *Curr. Opin. Food Sci.* **2016**, *10*, 16.
- Kalivas, J. H.; Georgiou, C. A.; Moira, M.; Tsafaras, I.; Eleftherios A. P.; Mousdis, G. A.; *Food Chem.* **2014**, *148*, 289.
- Danezis, G. P.; Tsagkaris, A. S.; Brusic, V.; Georgiou, C. A.; *Curr. Opin. Food Sci.* **2016**, *10*, 22.
- Van Durme, J.; Vandamme, J.; *Food Chem* **2016**, *208*, 185.
- http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0270_22_09_2005.html, acessada em Maio 2020.
- <https://azeiteonline.com.br/2012/02/02/publicado-o-regulamento-tecnico-do-azeite-do-mapa/>, acessada em Maio 2020.
- <https://tribunadejundiai.com.br/gastronomia/governo-proibe-venda-de-32-marcas-de-azeites-fraudados/>, acessada em Maio de 2020
- Aued-Pimentel, S.; Separovic L.; Silvestre, L. G. G. R.; Kus-Yamashita, M. M. M.; Takemoto, E.; *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia* **2017**, *5*, 84.
- Stefano, V. di; Avellone, G.; Bongiorno, D.; Cunsolo, V.; Muccilli, V.; Sforza, S.; Dossena, A.; Drahos, L.; Vékey, K.; *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 74.
- Guo, M.; He, M.; Zhong, J.; He, Q.; Ismail, B. B.; Chen, G.; Liu, D.; *Sci. Total Environ.* **2020**, *710*, 134975.
- Shishov, A.; Gagarionova, S.; Bulatov, A.; *Food Chem.* **2020**, *314*, 126097.
- Saridal, K.; Ulusoy, H. I.; *Microchem. J.* **2019**, *150*, 104170.
- Thalhamer, B.; Buchberger, W.; *Food Control* **2019**, *105*, 58.
- Chajduk, E.; Polkowska-Motrenko, H.; *Food Chem.* **2019**, *292*, 129.
- Xie, X.; Zhang, Y.; Yue, Z.; Wang, K.; Mai, X.; Liu, Y.; Zhu, M.; Fan, H.; Zhang, W.; *Microchem. J.* **2019**, *149*, 103995.
- Lim, H. S.; Hwang, J. Y.; C, E.; Lee, G.; Yoon, S. S.; Kim, M.; *Food Chem.* **2018**, *239*, 1167.
- Michalak, J.; Gujska, E.; Kuncewicz, A.; *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *32*, 68.
- Luterotti, S.; Marković, K.; Franko, M.; Bicanic, D.; Madžgalj, A.; Kljak, K.; *Food Chem.* **2013**, *140*, 390.
- Brera, C.; Debegnach, F.; De Santis, B.; Pannunzi, E.; Berdini, C.; Prantera, E.; Gregori, E.; Miraglia, M.; *Talanta* **2011**, *83*, 1442.
- Nie, Q.; Nie, S. In *Evaluation Technologies for Food Quality*; Zhong, J., Wang, X., eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, 2019, cap. 13.
- Santos, I. C.; Smuts, J.; Schug, K. A.; *Food Anal. Methods* **2017**, *10*, 4068.
- Šnidarič, L.; Mlakar, A.; Prosen, H.; *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *134*, 110829.
- Bueno, M.; Resconi, V. C.; Campo, M. M.; Ferreira, V.; Escudero, A.; *Food Chem.* **2019**, *281*, 49.
- Rocchi, R.; Mascini, M.; Faberi, A.; Sergi, M.; Compagnone, D.; Di Martino, V.; Carradori, S.; Pittia, P.; *Food Control* **2019**, *106*, 106736.
- Svečnjak, L.; Jović, O.; Prđun, S.; Rogina, J.; Marijanović, Z.; Car, J.; Matošević, M.; Jerković, I.; *Food Chem.* **2019**, *291*, 187
- Feng, T.; Sun, M.; Song, S.; Zhuang, H.; Yao, L. In *Evaluation Technologies for Food Quality 2019*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Cambridge, pp. 219-265.
- Torreçilla, J. S.; Rojo, E.; Dominguez, J. C.; Rodriguez, F.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1679.
- Anibal, C. V. di; Ruisánchez, I.; Fernández, M.; Forteza, R.; Cerdà, V.; Callao, M. P.; *Food Chem.* **2012**, *134*, 2326.
- Vera, D. N.; Ruisánchez, I.; Callao, M. P.; *Food Control* **2018**, *92*, 341.
- Márquez, C.; Ruisánchez, I.; Callao, M. P.; *Microchem. J.* **2019**, *145*, 686.
- Anibal, C. V. di; Callao, M. P.; Ruisánchez, I.; *Talanta* **2011**, *84*, 829.
- Anibal, C. di; Rodríguez, S.; Albertengo, L.; Rodríguez, M.; *Food Anal. Methods* **2016**, *9*, 3117.
- Anibal, C. di; Rodríguez, M. S.; Albertengo, L.; *Food Anal. Methods* **2013**, *7*, 1090.
- Riovento, R.; Marchi, M. de; Cassandro, M.; Penasa, M.; *Food Chem.* **2012**, *134*, 2459.
- Barbin, D. F.; Felicio, A. L. de S. M.; Sun, D.; Nixdorf, S. L.; Hirooka, E. Y.; *Food Res. Int.* **2014**, *61*, 23.

38. Sørensen, K. M.; Khakimov, B.; Engelsen, S. B.; *Curr. Opin. Food Sci.* **2016**, *10*, 45.
39. Rungpichayapichet, P.; Mahayothee, B.; Nagle, M.; Khuwijitjaru, P.; Müller, J.; *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *111*, 31.
40. Xu, L.; Shi, W.; Cai, C.; Zhong, W.; Tu, K.; *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *61*, 590.
41. Márquez, C.; López, M. I.; Ruisánchez, I.; Callao, M. P.; *Talanta* **2016**, *161*, 80.
42. Pullanagari, R. R.; Yule, I. J.; Agnew, M.; *Meat Sci.* **2015**, *100*, 156.
43. Pedreschi, F.; Segtnan, V. H.; Knutsen, S. H.; *Food Chem.* **2010**, *121*, 616.
44. Sánchez, M.; Haba, M. J. de la ; Benítez-López, M.; Fernández-Novales, J.; Garrido-Varo, A.; Pérez-Marín, D.; *J. Food Eng.* **2012**, *110*, 102.
45. López, M. I.; Trullols, E.; Callao, M. P.; Ruisánchez, I.; *Food Chem.* **2014**, *147*, 177.
46. Kamruzzaman, M.; Sun, D.; Elmasry, G.; Allen, P.; *Talanta* **2013**, *103*, 130.
47. Núñez-Sánchez, N.; Martínez-Marín, A. L.; Polvillo, O.; Fernández-Cabanás, V. M.; Carrizosa, J.; Urrutia, B.; Serradilla, J. M.; *Food Chem.* **2016**, *190*, 244.
48. Pan, L.; Zhu, Q.; Lu, R.; Mcgrath, J. M.; *Food Chem.* **2015**, *167*, 264.
49. Chen, L.; Wang, J.; Ye, Z.; Zhao, J.; Xue, X.; Heyden, Y. V.; Sun, Q.; *Food Chem.* **2012**, *135*, 338.
50. Mishra, P.; Cordella, C. B.Y.; Rutledge, D. N.; Barreiro, P.; Roger, J. M.; Diezma, B.; *J. Food Eng.* **2016**, *168*, 7.
51. Huang, L.; Zhao, J.; Chen, Q.; Zhang, Y.; *Food Chem.* **2014**, *145*, 228.
52. Teye, E.; Anyidoho, E.; Agbemafle, R.; Sam-Amoah, L. K.; Elliott, C.; *Infrared Phys. Technol.* **2020**, *104*, 103.
53. Bosco, G. L.; James, L.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 197.
54. Santos, C. A. T. dos; Páscoa, R. N. M. J.; Lopes, J. A.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2017**, *88*, 100.
55. Rohman, A.; Man, Y. B. C.; *Food Chem.* **2011**, *129*, 583.
56. Georgouli, K.; Rincon, J. M. del; Koidis, A.; *Food Chem.* **2017**, *217*, 735.
57. Horn, B.; Esslinger, S.; Pfister, M.; Faul-Hassek, C.; Riedl, J.; *Food Chem.* **2018**, *257*, 112.
58. Botelho, B. G.; Reis, N.; Oliveira, L. S.; Sena, M. M.; *Food Chem.* **2015**, *181*, 31.
59. Koca, N.; Kocaoglu-Vurma, N. A.; Harper, W. J.; Rodriguez-Saona, L. E.; *Food Chem.* **2010**, *121*, 778.
60. Liu, J.; Wen, Y.; Dong, N.; Lai, C.; Zhao, G.; *Food Chem.* **2013**, *141*, 3103.
61. Miaw, C. S. W.; Sena, M. M.; Souza, S. V. C. de; Callao, M. P.; Ruisánchez, I.; *Food Chem.* **2018**, *266*, 254.
62. Wu, Z.; Xu, E.; Long, J.; Wang, F.; Xu, X.; Jin, Z.; Jiao, A.; *J. Food Sci.* **2015**, *80*, 1670.
63. Xu, M.; Gao, Y.; Han, X. X.; Zhao, B.; *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 6719.
64. Mateescu, C.; Popescu, A. M.; Radu, G. L.; Onisei, T.; Raducanu, A. E.; *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, *7*, 251.
65. Lee, J.; Park, J.; Mun, H.; Shim, W.; Lim, S.; Kim, M.; *Food Chem.* **2018**, *254*, 109.
66. Gukowsky, J. C.; Xie, T.; Gao, S.; Qu, Y.; He, L.; *Food Control* **2018**, *92*, 267.
67. Nedeljković, A.; Rösch, P.; Popp, J.; Miočinović, J.; Radovanović, M.; Pudja, P.; *Food Anal. Methods* **2015**, *9*, 1315.
68. Khalil, I.; Yehye, W. A.; Julkapli, N. M.; Sina, A. A. I.; Rahmati, S.; Basirun, W. J.; Seyfoddin, A.; *The Analyst* **2020**, *145*, 1414.
69. Craig, A.; Franca, A.; Irudayaraj, J.; *Annu. Rev. Food Sci. Technol* **2013**, *4*, 369.
70. Lohumi S.; Lee H.; Kim M. S.; Qin J.; Kandpal L. M.; Bae H.; Rahman, A.; Cho, B.; *PloS One* **2018**, *13*, 1.
71. Tintchev, F.; Wackerbarth, H.; Kuhlmann, U.; Toepfl, S.; Knorr, D.; Hildebrandt, P.; Heinz, V.; *Annu. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1189*, 34.
72. Wang, H.; Guo, X.; Fu, S.; Yang, T.; Wen, Y.; Yang, H.; *Food Chem.* **2015**, *188*, 137.
73. Fan, C.; Hu, Z.; Riley, L. K.; Purdy, G. A.; M, A.; Lin, M.; *J. Food Sci.* **2010**, 302.
74. Mangolim, C. S.; Moriwaki, C.; Nogueira, A. C.; Sato, F.; Baesso, M. L.; Neto, A. M.; Matioli, G.; *Food Chem.* **2014**, *153*, 361.
75. Guyader, S.; Thomas, F.; Portaluri, V.; Jamin, E.; Akoka, S.; Silvestre, V.; Remaud, G.; *Food Control* **2018**, *91*, 216.
76. Tomassini, A.; Capuani, G.; Delfini, M.; Miccheli, A.; *Data Handl. Sci. Technol.* **2013**, *28*, 441.
77. Bo, Y.; Feng, J.; Xu, J.; Huang, Y.; Cai, H.; Cui, X.; Dong, J.; Ding, S.; Chen, Z.; *Food Res. Int.* **2019**, *125*, 108574.
78. Trimigno, A.; Marincola, F. C.; Dellarosa, N.; Picone, G.; Laghi, L.; *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *4*, 99.
79. Palaric, C.; Pilard, S.; Fontaine, J.; Cailleu, D.; Mesnard, F.; Renaud, T.; Petit, A.; Molinié, R.; *Food Control* **2018**, *88*, 217.
80. Sobolev, A. P.; Thomas, F.; Donarski, J.; Ingallina, C.; Circi, S.; Marincola, F. C.; Capitani, D.; Mannina, L.; *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *91*, 347.
81. Minoja, A. P.; Napoli, C.; *Food Res. Int.* **2014**, *63*, 126.
82. Marcone, M. F.; Wang, S.; Alabish, W.; Nie, S.; Somnarain, D.; Hill, A.; *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 729.
83. Siudem, P.; Wawer, I.; Paradowska, K.; *J. Mol. Struct.* **2019**, *1177*, 204.
84. Cai, S.; Zang, Y.; Xia, F.; Shen, G.; Feng, J.; *J. Food Compos. Anal.* **2019**, *84*, 103316.
85. Consonni, R.; Cagliani, L. R.; *Adv. Food Nutr. Res.* **2010**, *59*, 87.
86. Duynhoven, J.; Voda, M.; Witek, M.; As, H.; *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2010**, *69*, 145.
87. Ghasemi-Varnamkhasti, M.; Mohtasebi, S. S.; Rodriguez-Mendez, M. L.; Lozano, J.; Razavi, S. H.; Ahmadi, H.; *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 165.
88. Chen, Q.; Zhao, J.; Chen, Z.; Lin, H.; Zhao, D.; *Sens. Actuators, B* **2011**, *159*, 294.
89. Hong, X.; Wang, J.; Hai, Z.; *Sens. Actuators, B* **2012**, *161*, 381.
90. Qiu, S.; Gao, L.; Wang, J.; *J. Food Eng.* **2015**, *144*, 77.
91. Sanaeifar, A.; Mohtasebi, S. S.; Ghasemi-Varnamkhasti, M.; Ahmadi, H.; *Measurement* **2016**, *82*, 105.
92. Lohumi, S.; Lee, S.; Lee, H.; Cho, B.; *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *46*, 85.
93. Sato, T.; *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1994**, *71*, 293.
94. Wesley, I. J.; Pacheco, F.; McGill, A. E. J.; *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1996**, *73*, 515.
95. Hein, M.; Henning, H.; Isengard, H.; *Talanta* **1998**, *47*, 447.
96. Downey, G.; McIntyre, P.; Davies, A. N.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5520.
97. Cozzolino, D.; Murray, I.; Chree, A.; Scaife, J. R.; *Food Sci. Technol.* **2005**, *38*, 821.
98. Yang, H.; Irudayaraj, J.; Paradkar, M.; *Food Chem.* **2005**, *93*, 25.
99. Pereira, A. F. C.; Pontes, M. J. C.; Gambarra Neto, F. F.; Santos, S. R. B.; Galvão, R. K. H.; Araújo, M. C. U.; *Food. Res. Int.* **2008**, *41*, 341.
100. Cayuela, J.; García, J. F.; *J. Food Eng.* **2017**, *202*, 79.
101. Chen, H.; Lin, Z.; Tan, C.; *Vib. Spectrosc.* **2018**, *99*, 178.
102. Picouet, P. A.; Gou, P.; Hyypiö, R.; Castellari, M.; *J. Food Eng.* **2018**, *230*, 18.
103. Farres, S.; Srata, L.; Fethi, F.; Kadaoui, A.; *Vib. Spectrosc.* **2019**, *102*, 79.
104. Mustorgi, E.; Malegori, C.; Oliveri, P.; Hooshyary, M.; Bounnece, H.; Mondello, L.; Oteri, M.; Casale, M.; *Chemometr. Intell. Lab.* **2020**, *199*, 103974.
105. Rodriguez-Saona, L. E.; Giusti, M. M.; Shotts, M. In *Advances in Food Authenticity Testing*; Downey, G., ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, 2016, cap. 4.

106. Ozaki, Y.; Genkawa, T.; Futami, Y.; In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Lindon, J. C.; Tranter, G. E.; Koppenaal, D. W. eds.; Academic Press: Cambridge, 2017.
107. Manley, M.; Baeten, V. In *Modern Techniques for Food Authentication*; Sun, D. ed.; Academic Press: Cambridge, 2018, cap. 3.
108. Qu, J.; Liu, D.; Cheng, J.; Sun, D.; Ma, J.; Pu, H.; Zeng, X.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *55*, 1939.
109. Inarejos-García, A. M.; Gómez-Alonso, S.; Fregapane, G.; Salvador, M. D.; *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 250.
110. Pereira, C. G.; Leite, A. I. N.; Andrade, J.; Bell, M. J. V.; Anjos, V.; *Food Sci. Technol.* **2019**, *107*, 1.
111. Özdemir, İ. S.; Dağ, Ç.; Özinanç, G.; Suçsoran, Ö.; Ertaş, E.; Bekiroğlu, S.; *LWT--Food Sci. Technol.* **2018**, *91*, 125.
112. Rambo, M. K. D.; Ferreira, Márcia M. C.; *Rev. Virtual Quim.* **2018**, *10*, 421.
113. Sinelli, N.; Casale, M.; Egidio, V. di; Oliveri, P.; Bassi, D.; Tura, D.; Casiraghi, E.; *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 2126.
114. Karunathilaka, S. R.; Kia, A. F.; Srigley, C. Chung, J. K.; Mossoba, M. M.; *J. Food Sci.* **2016**, *81*, 2390.
115. Vanstone, N.; Moore, A.; Martos, P.; Neethirajan, S.; *Food Qual. Saf.* **2018**, *2*, 189.
116. Willenberg, I.; Matthäus, B.; Gertz, Christian.; *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* **2018**, *121*, 1800361.
117. Yan, J.; Stuijvenberg, L.; Ruth, S. M.; *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **2019**, *121*, 1900031.
118. Santos, C. A. T.; Lopo, M.; Páscoa, R. N. M. J.; Lopes, J. A.; *Appl. Spectrosc.* **2013**, *67*, 1215.
119. Malegori, C.; Marques, E. J. N.; De Freitas, S. T.; Pimentel, M. F.; Pasquini, C.; Casiraghi, E.; *Talanta* **2017**, *165*, 112.
120. Basri, K. N.; Hussain, M. N.; Bakar, J.; Sharif, Z.; Khir, M. F. A.; Zoofakar, A. S.; *Spectrochim. Acta A* **2017**, *173*, 335.
121. Kaufmann, K. C.; Favero, F. F.; Vasconcelos, M. A. M.; Godoy, H. T.; Sampaio, K. A.; Barbin, D. F. *J. Food Sci.* **2019**, *84*, 406.
122. Oliveira, M. M.; Cruz-Tirado, J. P.; Roque, J. V.; Teófilo, R. F.; Barbin, D. F.; *J. Food Compos. Anal.* **2020**, *87*, 1.
123. Pan, L.; Lu, R.; Zhu, Q.; Mcgrath, J. M.; Tu, K.; *Postharvest Biol. Technol.* **2015**, *102*, 42.
124. Correia, R. M.; Domingos, E.; Cáo, V. M.; Araújo, B. R. F.; Sena, S.; Pinheiro, L. U.; Fontes A. M.; Aquino, L. F. M.; Ferreira, E. C.; Filgueiras, P. R.; Romão, W.; *Talanta* **2018**, *176*, 26.
125. Liu, N.; Parra, H. A.; Pustjens, A.; Hettinga, K.; Mongondry, P.; van Ruth, S. M.; *Talanta* **2018**, *184*, 128.
126. Savoia, S.; Albera, A.; Brugiapaglia, A.; di Stasio, L.; Ferragina, A.; Cecchinato, A.; Bittante, G.; *Meat Sci.* **2020**, *161*, 108017.
127. Rios, H. C. S.; Pereira, I. R. O.; de Abreu, E. S.; *Ciência & Saúde* **2013**, *6*, 118.
128. Custódio, T. A. da S.; *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, 2009.
129. Instituto Adolfo Lutz; *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3th ed., IMESP: São Paulo, 1985.
130. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A01991R2568-20150101>, acessada em Maio 2020.
131. Cardoso, L. G. V.; Barcelos, M. de F. P.; Oliveira, A. F. de; Pereira, J. de A. R.; Abreu, W. C. de; Pimentel, F. A.; Cardoso, M. das G.; Pereira, M. C. de A.; *Semina: Cienc. Agrar.* **2010**, *31*, 127.
132. Peixoto, E. R. M.; Santana, D. M. N.; Abrantes, S.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **1998**, *18*, 444.
133. Pasquini, C.; *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1026*, 8.
134. Savitzky, A.; Golay, M. J. E.; *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627.
135. Filzmoser, P.; Liebmann, B.; Varmuza, K.; *J. Chemometr.* **2009**, *23*, 60.
136. Portela, N. A.; Oliveira, E. C. S.; Neto, A. C.; Rodrigues, R. R. T.; Silva, S. R. C.; Castro, E. V. R.; Filgueiras, P. R.; *Fuel* **2016**, *166*, 12.
137. Souza, A. M.; Filgueiras, P. R.; Coelho, M. R.; Fontana, A.; Winkler, T. C. B.; Valderrama, P.; Poppi, R. J.; *J. Near Infrared Spectrosc.* **2016**, *24*, 293.
138. Aued-Pimentel, S.; Takemoto, E.; Minazzi-Rodrigues, R. S.; Badolato, E. S. G.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2002**, *61*, 69.
139. Christy, A. A.; Kasemsumran, S.; Du, Y.; Ozaki, Y.; *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 935.
140. Sinelli, N.; Casale, M.; Egidio, V. di; Oliveri, P.; Bassi, D.; Tura, D.; Casiraghi, E.; *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 2126.
141. Hourant, P.; Baeten, V.; Morales, M. T.; Meurens, M.; Aparicio, R.; *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 1168.
142. Galtier, O.; Dupuy, N.; Le Dreau, Y. Ollivier, D.; Pinatel, C.; Kister, J.; Artaud, J.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *595*, 136.