

Autenticação de azeites de oliva extra virgem com diferentes níveis de acidez através de espectroscopia UV-Vis e PLS-DA

RESUMO

Francieli Cassia Gomes Barroso

Simão Alves

fransi.simao@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Paulo Henrique Março

paulohmarco@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Patrícia Valderrama

pativalderrama@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Neste estudo foi desenvolvida uma metodologia para autenticação de azeites de oliva extra virgem com diferentes níveis de acidez através da espectroscopia na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis) acoplada ao método de Mínimos Quadrados Parciais com Análise Discriminante (PLS-DA). A sensibilidade do modelo foi igual a 1.0. Com base nesse resultado, o modelo foi capaz de classificar corretamente todas as amostras de azeite de oliva de acordo com seus diferentes níveis de acidez. A especificidade também apresentou resultado igual a 1.0, o que significa que nenhuma amostra foi classificada de forma errônea em uma outra classe. A habilidade da espectroscopia UV-Vis na autenticação dos azeites de oliva extra virgem baseado em seus diferentes níveis de acidez pode ser atribuída aos deslocamentos hipocrômico e hiperacrômico, devido às absorções entre 250 – 510 nm e 670 nm, que são características de carotenos e clorofilas.

PALAVRAS-CHAVE: azeite de oliva; PLS-DA; espectroscopia molecular; autenticação.

INTRODUÇÃO

O azeite de oliva é classificado de acordo com a sua acidez. Assim para ser considerado extra virgem é necessário que sua acidez máxima não exceda 0,8 g/100 g de ácido oleico, enquanto que para azeite de oliva virgem a acidez máxima é de 2,0 g/100 g em ácido oleico (BRASIL, 2005). Estes níveis estão relacionados com integridade de matéria prima, cuidados com armazenamento e também com o seu processo de extração.

Para a legislação brasileira é considerado azeite de oliva extra virgem o produto obtido somente dos frutos da oliveira por processos de extração sem refino químico, ou seja, sem contato com solventes, processos de re-esterificação ou mistura de óleos. Para o azeite de oliva extra virgem o processamento deve envolver somente processos mecânicos com temperaturas controladas (RUIZ-SAMBLÁS et al., 2011), o que garante ao produto final a conservação de suas características sensoriais e química (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2008).

Os fatores como maturação, estocagem, ação enzimática, qualidade da azeitona e os sistemas de obtenção do azeite (extração mecânica e ou por solvente), grau de refinação ou misturas de óleos tem grande impacto na qualidade, principalmente no índice de acidez, que é de suma importância para classificação e definição da qualidade dos azeites (PEIXOTO; SANTANA; ABRANTES, 1998; SILVA et al., 2012). De acordo com Silva *et al.* (2012), quanto menor a acidez do azeite de oliva, melhor a sua qualidade e maiores os efeitos benéficos à saúde humana.

O ácido oleico é o ácido graxo monoinsaturado predominante do azeite de oliva extra virgem. Este ácido graxo possui menor susceptibilidade a peroxidação lipídica em relação aos ácidos graxos polinsaturados, como o ácido linoleico encontrado em maior proporção, por exemplo, no óleo de girassol (OWEN *et al.*, 2000). Outros componentes menores que possuem atividades biológicas também são encontrados no azeite de oliva extra virgem (BIANCO *et al.*, 2002), como antioxidantes e vitaminas (WILLETT *et al.*, 1995). Além destes, esteróis, álcoois alifáticos, clorofilas, carotenóides, hidrocarbonetos, etc., também fazem parte do conjunto de compostos minoritários, apresentando importância para a qualidade dos azeites e de suma relevância para estudos que avaliam a autenticidade e rastreabilidade de azeite (GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

Devido a sua peculiaridade, o azeite de oliva é o único produto que se encontra no setor de óleos e gorduras com o seu próprio acordo internacional de comércio. O Conselho Oleícola Internacional (COI) é uma organização intergovernamental que estabelece os mínimos de pureza e critérios de qualidade para cada categoria de azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva. Também são estabelecidas normas de higiene, embalagem e rotulagem, além da recomendação de aplicação de determinados métodos analíticos (AUED-PIMENTEL *et al.*, 2008).

A adulteração de azeites e averiguação da veracidade das informações expressas no rótulo tornou-se um problema preocupante tanto para os produtores como os consumidores. Desta forma, é de grande importância o aprimoramento e desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle da qualidade dos azeites de oliva. Estes métodos devem ser capazes de detectar adulterações, bem como apontar se as informações realmente coincidem com as informações presentes nos rótulos. Nesse sentido, o objetivo deste estudo é demonstrar a

aplicabilidade da espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) combinada com o método quimiométrico de reconhecimento de padrão supervisionado PLS-DA (Mínimos Quadrados Parciais com Análise Discriminante), na autenticação de azeites de oliva extra virgem com diferentes níveis de acidez.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 32 amostras de azeites de oliva extra virgem, com 8 amostras para cada percentual de acidez, tais quais, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5% todas da mesma marca produzidos na região de Sevilla na Espanha e adquiridas em comércio Europeu.

Os espectros dos óleos foram adquiridos em um espectrofotômetro UV-Vis da marca *Ocean Optics* (USB-650-UV-VIS) na região de 200-800 nm. As leituras foram realizadas em temperatura de 25 °C utilizando cubeta de quartzo de 1mm de caminho óptico.

Os pré-processamentos dos espectros e a construção do modelo PLS-DA, foram realizados no software MATLAB R2007B (The MathWorks Inc., Natick, USA). Os espectros na região UV-Vis das amostras de óleos de soja estudadas tiveram a linha base corrigida através do algoritmo *baseline* do PLS Toolbox e foram suavizados empregando o algoritmo *savgol* (SAVITSKY; GOLAY, 1964).

PLS-DA é um método de reconhecimento de padrão supervisionado (BARKER; RAYENS, 2003) descrito e discutido em trabalhos prévios (VALDERRAMA *et al.*, 2014; ALVES; VALDERRAMA, 2015). Para a construção do modelo PLS-DA, foram utilizadas 20 amostras na etapa de calibração e 12 amostras de validação, selecionadas pelo algoritmo *Kennard-Stone* (KENNARD; STONE, 1969). Os dados foram centrados na média e o número de variáveis latentes foi escolhido baseado no menor valor encontrado para RMSECV (raiz média quadrática do erro de validação cruzada) através da validação cruzada em blocos contínuos de 5 amostras. As amostras anômalas (*outliers*) do modelo PLS-DA foram avaliadas de acordo com o *leverage* e os resíduos espectrais (*Q Residuals*) de acordo com Alves e Valderrama (2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 são apresentados os espectros UV-Vis dos azeites de oliva extra virgem com diferentes níveis de acidez. Por ser uma técnica não seletiva se torna difícil fazer uma atribuição específica de bandas na região do UV-Vis, uma vez que os grupos cromóforos dos diferentes constituintes do azeite podem absorver no mesmo comprimento de onda gerando bandas sobrepostas.

De acordo com Ayuso, Haro e Escolar (2004), os espectros na região do UV-Vis de azeites de oliva apresentam uma banda com vários picos entre 380 e 500 nm correspondentes a uma sobreposição das bandas de carotenoides, compreendendo o β -caroteno e a luteína, que são os carotenoides mais encontrados nos azeites de oliva (PSOMIADOU; TSIMIODOU, 2002; GIUFFRIDA *et al.*, 2007; DOMENICI *et al.*, 2014). Outro pigmento de impacto na absorção UV-Vis de azeites de oliva é a clorofila, cujas bandas típicas encontram-se próxima a 420 nm, caracterizada por uma banda intensa e sobreposta com uma banda dos

carotenóides, e em cerca de 670 nm (PSOMIADOU; TSIMIDOU, 2002; GIUFFRIDA *et al.*, 2007; DOMENICI *et al.*, 2014). As absorções encontradas na região entre 390 e 670 nm podem facilmente ser relacionadas a estes dois pigmentos (AYUSO; HARO; ESCOLAR, 2004). Estes relatos reforçam os resultados encontrados neste estudo. Estas duas classes de pigmentos (carotenoides e clorofila) são importantes para estudos experimentais, e de importância para a avaliação da qualidade, frescor, e os efeitos do envelhecimento causados nos azeites (DOMENICI *et al.*, 2014).

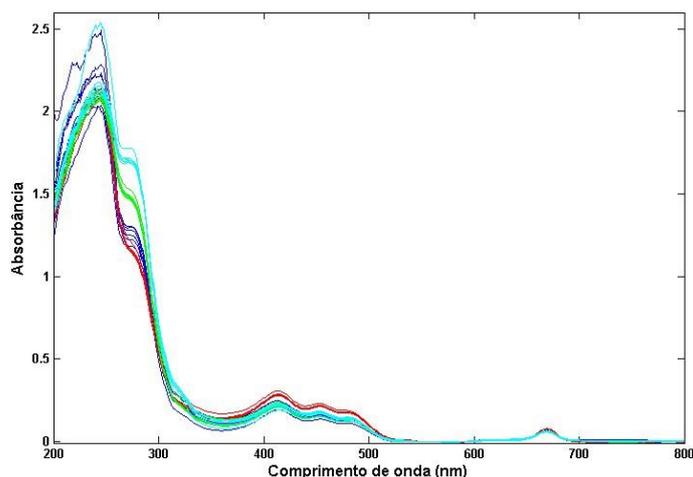


Figura 1. Espectros UV-Vis de azeites de oliva extra virgem com percentuais de acidez 0,2% (—), 0,3% (—), 0,4% (—) e 0,5% (—).

Segundo Peixoto, Santana e Abrantes (1998), alguns fatores como maturação, tempo de estocagem do fruto, ação enzimática, qualidade do fruto e tipo de processamento aplicado na obtenção dos azeites possuem potencial para influenciar no índice de acidez, fatores estes que também influenciam nos pigmentos mencionados acima. Dessa forma, a espectroscopia na região do UV-Vis, apesar de pouco seletiva, fornece informações estruturais químicas, atuando como uma impressão digital (*fingerprint*) da amostra em estudo. Além disso, o *fingerprint* obtido através da espectroscopia UV-Vis aliado ao método PLS-DA pode auxiliar na falta de seletividade da técnica e possibilitar a análise qualitativa de amostras complexas (VALDERRAMA *et al.*, 2014).

Um modelo PLS-DA foi construído para autenticação de azeites de oliva de acordo com os percentuais de acidez, com os dados espectrais centrados na média, empregando 5 variáveis latentes, escolhidas de acordo com os valores do RMSECV. Nesse modelo, as amostras anômalas (*outliers*) foram avaliadas de acordo com o *leverage* e *Q Residuals* no nível de confiança de 99%. O *leverage* corresponde o quanto uma amostra está distante da média das demais, enquanto *Q Residuals* corresponde aos resíduos espectrais não modelados. De acordo com a Figura 2, foram identificadas duas amostras anômalas, pois apresentam simultaneamente alto valor de *leverage* e alto resíduo espectral. Essas amostras são pertencentes ao conjunto de validação dos azeites com acidez 0,3% e 0,5% e foram removidas.

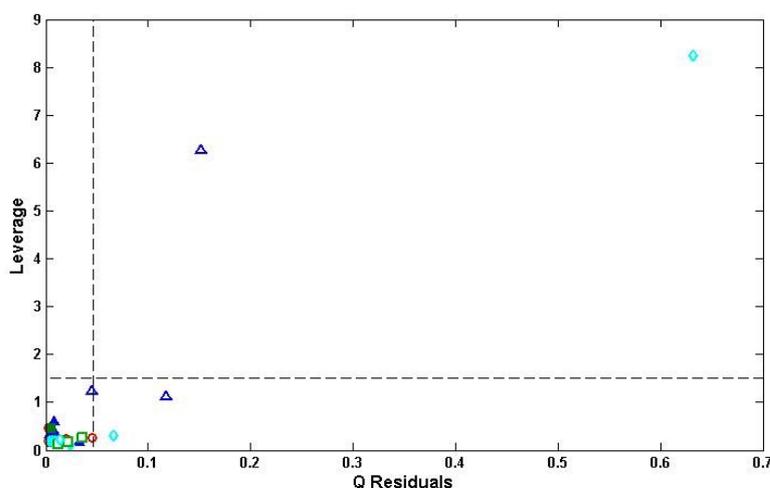


Figura 2. Resíduos espectrais contra *leverage* para o modelo PLS-DA. (●) amostras de calibração com acidez 0,2%. (○) amostras de validação com acidez 0,2%. (▲) amostras de calibração com acidez 0,3%. (△) amostras de validação com acidez 0,3%. (■) amostras de calibração com acidez 0,4%. (□) amostras de validação com acidez 0,4%. (◆) amostras de calibração com acidez 0,5%. (◇) amostras de validação com acidez 0,5%.

A exatidão do modelo construído, apresentada na Tabela 1, foi avaliada de acordo com os valores de RMSECV e RMSEP, confirmando que a escolha do número de variáveis latentes foi adequada e que o modelo não apresenta sobre ajuste ou falta de ajuste (SANTOS *et al.*, 2015). Na Tabela 1, também são apresentados os resultados para o coeficiente de correlação para o ajuste do modelo, este parâmetro pode ser considerado um outro indicador de exatidão para o modelo construído (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Tabela 1. Exatidão e coeficiente de correlação do modelo PLS-DA.

Parâmetro	Azeite de oliva extra virgem			
	Acidez 0,2%	Acidez 0,3%	Acidez 0,4%	Acidez 0,5%
RMSECV	0,199	0,276	0,275	0,181
RMSEP	0,043	0,128	0,233	0,117
R	0,999	0,988	0,932	0,974

Na Figura 3 são apresentadas a distribuição das amostras de calibração e validação para as amostras de azeite de oliva de acordo com seus valores de índice de acidez, separadas pelo valor limite (*threshold*), estabelecido pelo modelo PLS-DA. De acordo com a Figura 3, o modelo PLS-DA construído a partir dos espectros UV-Vis identificar as amostras de acordo com o nível de acidez dos azeites. Como foi identificado a presença de *outliers*, nas Figuras 3(B) e (D), referentes aos teores de acidez 0,3% e 0,5%, o conjunto de validação foi composto somente por duas amostras.

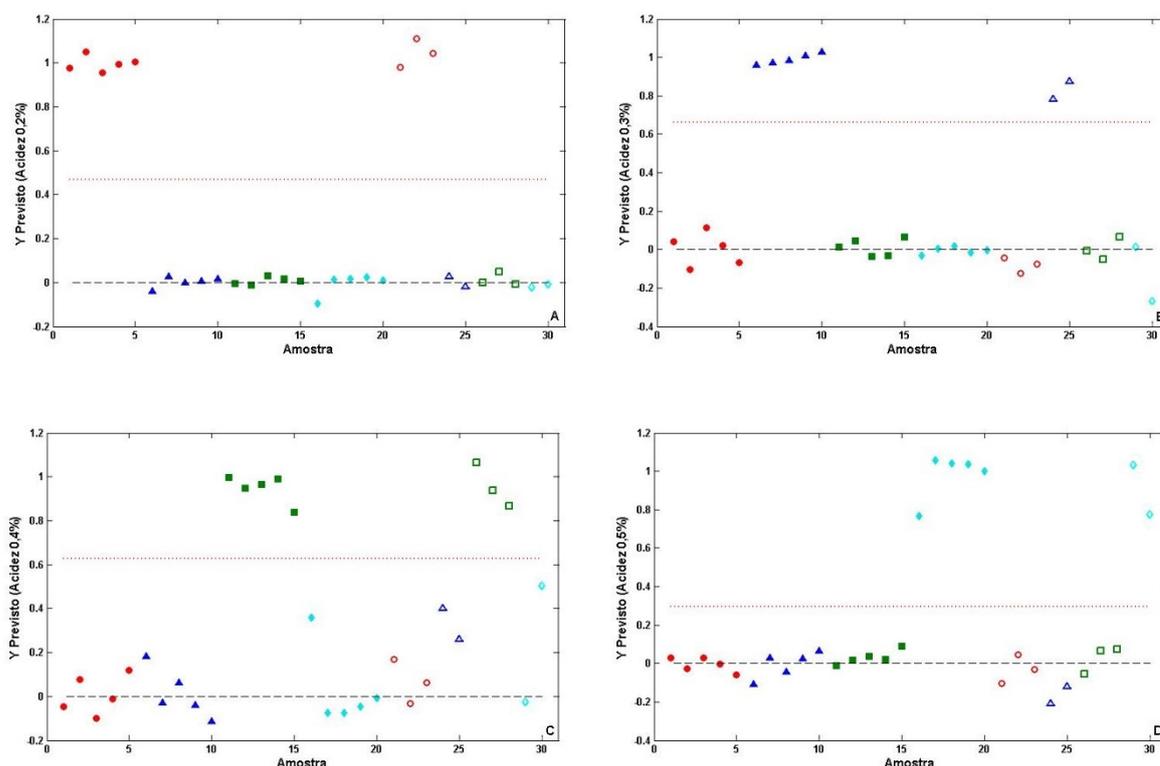


Figura 3. Distribuição das amostras de calibração e validação nas classes de azeite de oliva com acidez 0,2% (A), 0,3% (B), 0,4% (C) e 0,5% (D). (●) amostras de calibração com acidez 0,2%. (○) amostras de validação com acidez 0,2%. (▲) amostras de calibração com acidez 0,3%. (△) amostras de validação com acidez 0,3%. (■) amostras de calibração com acidez 0,4%. (□) amostras de validação com acidez 0,4%. (◆) amostras de calibração com acidez 0,5%. (◇) amostras de validação com acidez 0,5%.

A sensibilidade do modelo PLS-DA, refere-se ao número de amostras previsto como sendo de uma determinada classe, dividido pelo número de amostras presentes realmente naquela classe. A especificidade do modelo refere-se ao número de amostras previstas como não sendo de uma determinada classe, dividido pelo número real de amostras que não pertence àquela classe (ALMEIDA *et al.*, 2013). De acordo com as definições, o resultado para a sensibilidade e especificidade do modelo construído foi igual a 1, indicando que todas as amostras de validação do azeite de oliva com diferentes níveis de acidez foram corretamente classificadas e que nenhuma amostra da validação foi prevista erroneamente.

Os *scores* do modelo PLS-DA são apresentados na Figura 4, onde se observa uma separação entre as amostras de azeite de oliva com níveis de acidez 0,2% e 0,3% na parte negativa da variável latente 1 enquanto as amostras com níveis de acidez 0,4% e 0,5% são separadas pela parte positiva da primeira variável latente.

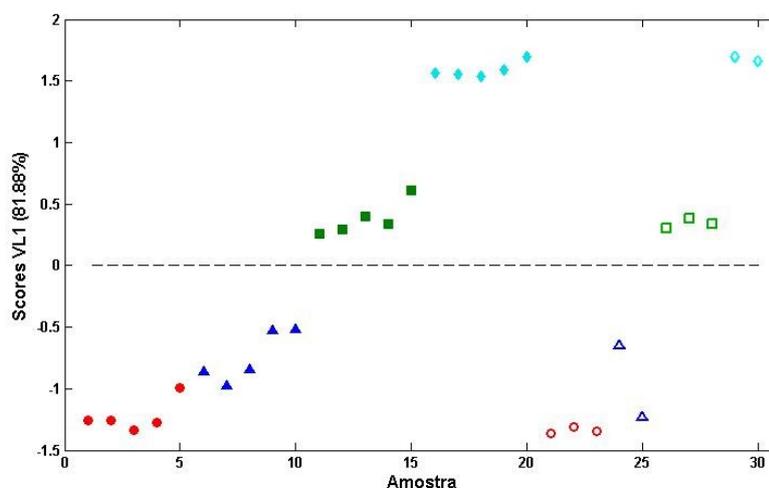


Figura 4. Scores do modelo PLS-DA para autenticação do teor de acidez. Scores do modelo PLS-DA para autenticação do teor de acidez. (●) amostras de calibração com acidez 0,2%. (○) amostras de validação com acidez 0,2%. (▲) amostras de calibração com acidez 0,3%. (△) amostras de validação com acidez 0,3%. (■) amostras de calibração com acidez 0,4%. (□) amostras de validação com acidez 0,4%. (◆) amostras de calibração com acidez 0,5%. (◇) amostras de validação com acidez 0,5%.

Os *loadings*, apresentados na Figura 5, mostram que uma banda centrada em torno de 270–280 nm contribui para identificação dos azeites que apresentam teor de acidez 0,4% e 0,5% porque apresentam *loadings* positivos na VL1. Na classificação das amostras com teor de acidez 0,2% e 0,3%, as regiões espectrais características dos carotenoides e da clorofila se mostraram mais importantes apresentando *loadings* negativo na VL1.

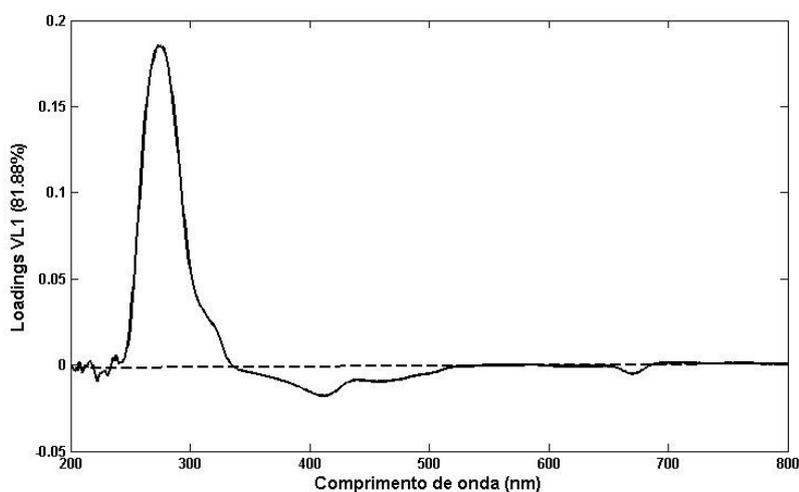


Figura 5. *Loadings* da primeira variável latente do modelo PLS-DA na autenticação do teor de acidez.

Comparando os espectros das amostras de azeite de oliva com diferentes teores de acidez da Figura 1 com os *loadings* da Figura 5 é possível atribuir a diferenciação entre as amostras de acordo com os percentuais de acidez devido a ocorrência de efeitos hiper-crômico e hipocrômico ao longo das regiões espectrais entre 250 – 510 nm e 670 nm. As diferenças observadas são diferenças sutis que se tornam mais evidentes com o emprego do método quimiométrico PLS-DA.

CONCLUSÕES

A espectroscopia UV-Vis aliada ao método quimiométrico PLS-DA mostrou ser uma ferramenta capaz de autenticar as amostras de azeite de oliva extra virgem de acordo com os percentuais de acidez. A metodologia proposta permite uma análise rápida e não destrutiva do azeite, sem a necessidade de preparo da amostra.

Apesar de não ser uma técnica seletiva, a espectroscopia na região do UV-Vis quando acoplada com o método quimiométrico supervisionado PLS-DA, torna possível a autenticação de amostras de azeite de oliva que apresentam diferentes níveis de acidez. A capacidade da espectroscopia UV-Vis para essa autenticação pode ser atribuída a ocorrência de efeitos hiper-crômico e hipocrômico ao longo das regiões espectrais entre 250 – 510 nm e 670 nm, com destaque para as regiões características de absorção dos carotenoides e da clorofila para as amostras com menores teores de acidez.

Authenticity of extra virgin olive oils with different acidity levels by UV-Vis spectroscopy and PLS-DA

ABSTRACT

A methodology was developed in order to authenticity extra virgin olive oils with different acidity levels by using Ultraviolet and Visible (UV-Vis) spectroscopy coupled with Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). For the model, the sensitivities were 1.0. Based on these results, the model was able to rightly classify all extra virgin oil samples with different acidity levels. The specificity was also equal to 1.0, this result means that any sample was classified in the wrong class. The ability of UV-Vis spectroscopy for extra virgin authenticity based on their acidity levels can be assigned to the hypochromic and hyperchromic shift, due to the absorption between 250 – 510 nm and 670 nm, with characteristics absorptions for carotenes and chlorophylls.

KEYWORDS: olive oil; PLS-DA; molecular spectroscopy; authenticity.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. R.; FIDELIS, C. H. V.; BARATA, L. E. S.; POPPI, R. J. Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. **Talanta**, v. 117, p. 305–311, 2013.

ALVES, F. C. G. B. S.; VALDERRAMA, P. Ultraviolet spectroscopy and supervised pattern recognition methods for authentication of transgenic and non-transgenic soybean oils. **Analytical Methods**, v. 7, p. 9702–9706, 2015.

AUED-PIMENTEL, S.; TAKEMOTO, E.; KUMAGAI, E. E.; CANO, C. B. Determinação da diferença entre o valor real e o teórico de triaglicerídeos ECN 42 para detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 31–34, 2008.

AYUSO, J.; HARO, M. R.; ESCOLAR, D. Simulation of the Visible Spectra for Edible Virgin Olive Oils: Potential Uses. **Applied Spectroscopy**, v. 58, n. 4, p. 474-480, 2004.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 3, p. 166-173, 2003.

BIANCO, A.; COCCIOLI, F.; GUIISO, M.; MARRA, C. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. **Food Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 405-411, 2002.

BRASIL. Resolução nº 270, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 set. 2005, Seção I, n. 184, p. 372-373.

DOMENICI, V.; ANCORA, D.; CIFELLI, M.; SERANI, A.; VERACINI, C. A.; ZANDOMENEGHI, M. Extraction of Pigment Information from Near-UV Vis Absorption Spectra of Extra Virgin Olive Oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 62, n. 38, p. 9317-9325, 2014.

GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L.; APARICIO-RUIZ, R.; APARICIO, R. Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 7, p. 602-607, 2008.

GIUFFRIDA, D.; SALVO, F.; SALVO, A.; PERA, L. L.; DUGO, G. Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. **Food Chemistry**, v. 101, p. 833-837, 2007.

KENNARD, R.W.; STONE, L.A. Computer aided design of experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969.

OWEN, R.W.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULE, WE.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoroids, lignans and squalene. **Food Chemistry Toxicology**, v. 38, n. 8, p. 647-659, 2000.

PEIXOTO, E. R. M.; SANTANA, D. M.N.; ABRANTES, S. Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva - proposta para atualização da legislação brasileira. **Ciência & Tecnologia em Alimentos**, v.18, n.4, p. 444-452, 1998.

PSOMIADOU, E.; TSIMIODOU, M. Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 716-721, 2002.

RUIZ-SAMBLÁS, C.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GONZÁLEZ-CASADO, A.; GARCÍA, F. P. R.; MATA-ESPINOSA, P. DE LA.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Multivariate analysis of HT/GC-(IT)MS chromatographic profiles of triacylglycerol for classification of olive oil varieties. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 6, p. 2093-2103, 2011.

SANTOS, D. A.; LIMA, K. P.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Espectroscopia UV e calibração multivariada multiproduto na determinação da acidez total em néctar de frutas. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2015.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627-1639, 1964.

SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F. DE.; PIO, R.; ALVES, T. C.; ZAMBON, C. R. Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Bragantia**, v. 71, n. 2, p.202-209, 2012.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J.; Estado da Arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, 2009.

VALDERRAMA, L.; GONÇALVES, R. P.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Espectroscopia UV-Vis e método quimiométrico na avaliação de adulterações e fraudes em azeite de oliva extra virgem. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 2, p. 32-34, 2014.

WILLET, W. C.; SACKS, F.; TRICHOPOULOU, A.; DRESCHER, G.; FERRO-LUZZI, A.; HELSING, E.; TRICHOPOULOU, D. Mediterranean diet pyramid: a cultural mode for

healthy eating. *American Society for Clinical Nutrition*, v. 61, n. 6(suppl), p. 1402S-1406S, 1995.

Recebido: 17 out. 2016.

Aprovado: 08 set. 2018.

DOI: 10.3895/rebrapa.v9n2.4801

Como citar:

ALVES, F. C. C. B. S.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Autenticação de azeites de oliva extra virgem com diferentes níveis de acidez através de espectroscopia UV-Vis e PLS-DA. *Brazilian Journal of Food Research*, Campo Mourão, v. 9, n. 2, p. 80-91, abr./jun. 2018. Disponível em:

<https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>

Correspondência:

Patrícia Valderrama

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão, Via Rosalina Maria dos Santos, 1233, CEP 87301-899, Caixa Postal 271, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

