



Desenvolvimento e Inovação de um produto endógeno

O caso dos Azeites de Montanha

EDITORES

Fátima Peres

Teresa Paiva

Daniel Raposo

Projeto

Promoção e Valorização de Azeites de Montanha
CENTRO-01-0246-FEDER-000004 / 6756



4. Caraterísticas Organoléticas e Nutricionais dos Azeites de Montanha

Autores

Fátima Peres

Ofélia Anjos

Cecília Gouveia

Catarina Salgueiro

Catarina Lourenço

*Ofélia Anjos
Cecília Gouveia
Fátima Peres*

4.2. Aplicação de Técnicas de Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de “Azeites de Montanha”

4.2.1. Introdução

A espectroscopia no infravermelho tem-se revelado uma técnica de apoio para o estudo de diferentes matrizes, facultando possíveis características diferenciadoras em tempo útil para a tomada de decisões (Anjos et al., 2015; Santos et al., 2016; Qin et al., 2017; Anjos et al., 2018; Ríos-Reina et al., 2018; Lucarini et al., 2018).

A espectroscopia no infravermelho é um método não invasivo que se baseia na análise das vibrações moleculares resultantes da excitação provocada por um feixe de radiação na zona do infravermelho (Cordella et al., 2007).

As diferentes técnicas de espectroscopia, nomeadamente no Infravermelho Próximo (NIR), no infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) e com reflectância total atenuada (ATR) e RAMAN (espectroscopia vibracional), diferem sobretudo no modo de aquisição espectral e na região em que essa aquisição é efetuada.

A técnica de espectroscopia no infravermelho tem-se mostrado muito eficaz para a análise de diversos produtos alimentares, designadamente na determinação de gordura, proteína, humidade, fibras, açúcares, amido, entre outras. Por outro lado, permite ter acesso, de forma muito rápida e simultânea, a um vasto número de parâmetros analíticos, com grande reprodutibilidade e precisão, utilizando pequenos volumes de amostra.

Estes equipamentos existem no mercado, como instrumentos de bancada ou na versão portátil; neste último caso, tem a vantagem de ser facilmente transportado para o campo ou para as linhas de produção, tornando a monitorização mais eficaz.

Toda a informação sobre a composição química do azeite, obtida por equipamento NIR, pode ser usada como uma ferramenta extremamente útil para o controlo e garantia da qualidade do produto, ao longo da linha de produção e durante o seu prazo de validade. Assim, quanto mais rápida for a determinação de um parâmetro de qualidade diferenciador (quer positivo quer negativo), mais cedo existe a possibilidade de atuar, quer numa eventual correção, quer na seleção de um produto de melhor qualidade.

Para além das vantagens referidas, estas tecnologias são “amigas do ambiente”, visto que não envolvem o consumo de reagentes químicos dispendiosos e tóxicos, reduzindo desta forma os resíduos laboratoriais.

Concretamente no caso do azeite, a espectroscopia no infravermelho já é amplamente utilizada, sobretudo, na determinação dos critérios de qualidade e pureza que possibilitam classificar o azeite numa categoria e identificar adulterações do azeite com outros óleos vegetais, respetivamente (Christy et al., 2004; Jimenez-Carvelo et al., 2017; Rohman et al., 2010).

A qualidade do azeite é avaliada em função da acidez, do estado de oxidação e da análise sensorial. A acidez e os parâmetros que medem a oxidação podem ser facilmente avaliados por NIR, existindo atualmente no mercado diversas calibrações comerciais para estes equipamentos. Contudo, nenhuma metodologia rápida se sobrepõe aos métodos oficiais de análise, uma vez que as calibrações comerciais são validadas dentro de certos intervalos, podendo ser ajustadas em qualquer momento

com definição de novos limites, através dos métodos oficiais, em função das especificações e/ou mudanças da legislação.

Relativamente à análise sensorial, é possível desenvolver metodologias por espectroscopia que identifiquem determinados defeitos sensoriais em tempo real, podendo, deste modo, separar lotes com defeito ainda na produção (Sinelli et al., 2010).

Em espectroscopia, o que se obtém são espectros que posteriormente se correlacionam, através de modelos matemáticos, com os dados analíticos. Sempre que um valor se situe fora dos limites de calibração, deve recorrer-se aos métodos oficiais para determinação ou confirmação dos mesmos.

Os espectros adquiridos por estes tipos de equipamento são complexos, por ocorrerem sobreposições e combinações das ligações dos vários grupos funcionais presentes numa mesma amostra, pelo que, para se proceder à interpretação da informação espectral, é necessário recorrer a vários métodos de quimiometria, nomeadamente calibração multivariada, que utiliza vários comprimentos de onda, específicos para cada um dos parâmetros a analisar.

No presente projeto, aplicaram-se calibrações comerciais para avaliar os parâmetros de qualidade e a composição maioritária em ácidos gordos componentes dos azeites em estudo, cujos resultados se apresentaram no capítulo anterior. Neste artigo, pretende-se dar uma perspetiva futura para utilização dos equipamentos (NIR, RAMAN e FTIR-ATR), existentes no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBP-BI), apresentando alguns exemplos das suas potencialidades.

4.2.2. Material e Métodos

Como referido no capítulo anterior, todas as amostras recolhidas na Região da Comunidade Intermunicipal Beiras e Serra da Estrela (CIM-BSE), foram analisadas por NIR para os parâmetros acidez (%), índice de peróxido (meq O₂/kg), K₂₃₂, K₂₇₀ e ácidos gordos [palmítico (C16:0) (%), esteárico (C18:0) (%), oleico (C18:1) (%), linoleico (C18:2) (%) e linolénico (C18:3) (%)]. Analisaram-se 57 amostras de azeites da campanha de 2017/2018 e 61 de 2018/2019, produzidos em 13 dos 15 concelhos da CIM-BSE. Em 2018/2019, foram ainda analisados 63 azeites monovarietais extraídos em sistema Abencor, a partir de 63 amostras de azeitonas colhidas nos mesmos concelhos.

A informação espectral resultou de amostras de azeite, previamente preparadas e filtradas segundo a Norma Portuguesa NP-896/85, à temperatura de 50 °C, nas seguintes condições para cada um dos equipamentos utilizados:

- 1) NIR: equipamento utilizado MPA (Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha). A informação espectral foi adquirida com *vials* de 8 mm em modo de absorvância, no comprimento de onda de 12000 a 4000 cm⁻¹, com resolução espectral de 8 cm⁻¹ e 32 *scans* por amostra;
- 2) RAMAN: equipamento utilizado FT-RAMAN (Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha). A informação espectral foi adquirida com *vials* de 8 mm no comprimento de onda de 4000 a 100 cm⁻¹, com resolução espectral de 4 cm⁻¹ e 64 *scans* por amostra, e uma potência de *laser* de 400 mW;
- 3) FTIR-ATR: equipamento utilizado Alpha FTIR ATR (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanha). A informação espectral foi adquirida no comprimento de onda de 4000 a 400 cm⁻¹ utilizando uma resolução espectral de 4 cm⁻¹ e 32 *scans* por amostras.

O tratamento dos dados foi efetuado pelos *softwares* OPUS®, versão: 7.5.18 (Bruker Optik, Alemanha) e *Unscrambler*® X, versão: 10.5.46461.632 (CAMO Software AS, Oslo, Norway).

4.2.3. Resultados e Discussão

4.2.3.1. Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR)

A aplicação mais comum da tecnologia NIR, na área da olivicultura/tecnologia do azeite, é na determinação dos teores em gordura e humidade da azeitona. O valor do rendimento que é dado ao olivicultor quando chega ao lagar com as suas azeitonas, resulta seguramente de equipamentos que utilizam a tecnologia NIR (equipamentos da FOSS, Zeutec, Viavi, Perkin-Elmer, Bruker, Specstar, entre outros).

No presente projeto, por ter sido possível adquirir as calibrações comerciais, também se usou esta tecnologia para a avaliação dos teores em humidade e gordura de diferentes cultivares. No Quadro 17, podemos verificar os seus resultados, para azeitonas com índices de maturação entre 3,5-4,0, e a respetiva funda (kg de azeitona necessários para obter 1 L de azeite).

Quadro 17. Resultados do teor em humidade (%) e gordura (% na matéria original (mo)) avaliados por NIR, e funda, para azeitonas de diferentes cultivares provenientes da CIM-BSE (campanha 2018/2019).

Cultivar	Humidade (%)	Gordura (% mo)	Funda
Carrasquinha	48,82	18,13	5,0
Cobrançosa	59,50	18,30	5,0
Cornicabra	57,27	15,49	5,9
Galega Vulgar	55,93	18,19	5,0
Madural	52,21	16,48	5,6
Negrinha	65,75	12,47	7,3
Passareira	59,64	11,20	8,2

Para além desta aplicação corrente, a tecnologia NIR permite identificar adulterações, diferenciar e classificar diferentes óleos vegetais e determinar a acidez e o gosto amargo do azeite (Yang et al., 2005; Nunes et al., 2014; Inarejos-García et al., 2013).

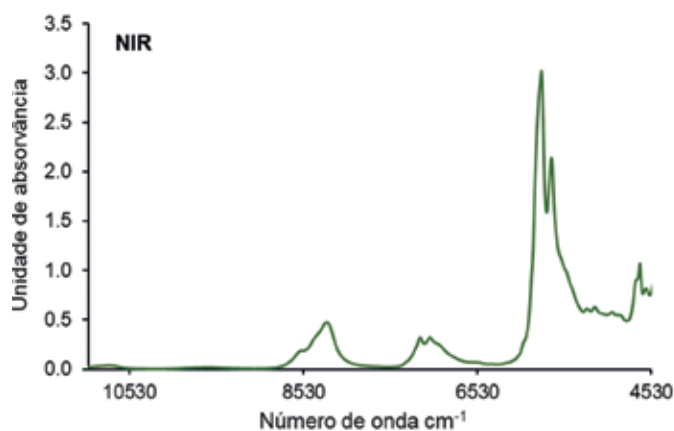


Figura 46. Espectro típico de Azeite de Montanha obtido em NIR.

Os espectros médios obtidos em NIR para os Azeites de Montanha (Figura 46) são semelhantes aos obtidos por outros autores que estudaram azeites de diferentes proveniências (Christy et al., 2004; Li et al., 2019; Armenta et al., 2007).

Assim, com esta informação espectral, podemos obter maior conhecimento

do que, apenas, com as calibrações comerciais. Neste contexto, apresentamos, na Figura 47, a análise em componentes principais (ACP) de um exemplo da utilização da informação espectral, comparando amostras de azeites monovarietais provenientes da Beira Baixa (Idanha-a-Nova) com os azeites monovarietais da campanha 2018/2019 recolhidos neste projeto.

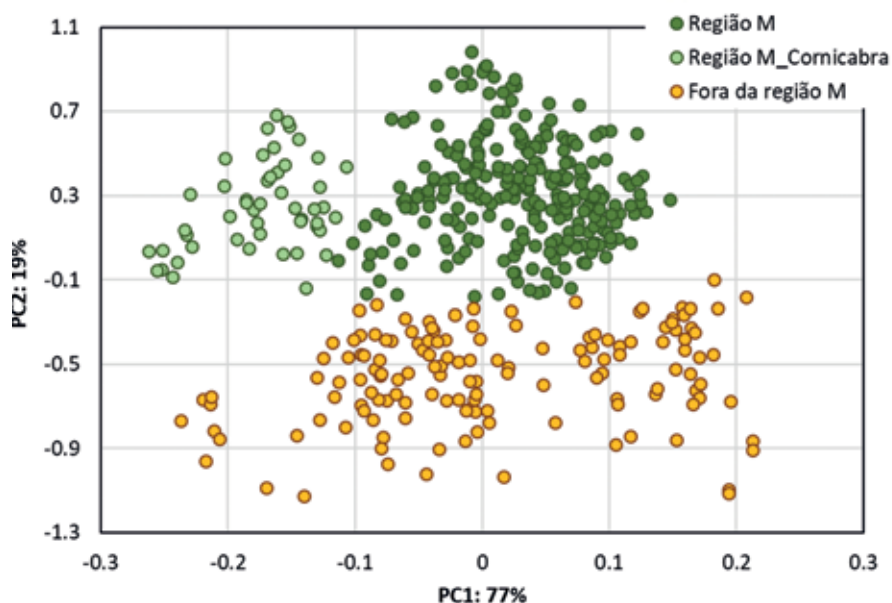


Figura 47. Análise em componentes principais, efetuada com espectros NIR, do conjunto de azeites analisado na Região CIMB-SE vs. azeites da Beira Baixa (Idanha-a-Nova). (Nota: M - Azeites de Montanha)

Para a análise de dados, efetuou-se, numa primeira fase, uma correção multiplicativa de sinal, de modo a minimizar uma eventual falha na homogeneidade das amostras; de seguida, efetuou-se a derivada de primeira ordem do espectro NIR original, com o objetivo de dar maior destaque aos diferentes picos, aumentando a sua resolução e eliminando os efeitos aditivos (Conzen, 2006).

Da análise da ACP podemos concluir, para o grupo de azeites analisados, que há uma clara separação entre os azeites monovarietais produzidos na região da CIM-BSE e o grupo de azeites produzidos fora dessa região. Esta separação explica 19 % do total de variação observada nas diferentes características do azeite, em especial no que se refere aos ácidos gordos componentes (região selecionada para análise entre 6000 e 5000 cm^{-1}). É de assinalar que este grupo de azeites, sendo composto por vários monovarietais, nomeadamente da cv. ‘Galega Vulgar’, não se sobrepõem com o grupo dos Azeites de Montanha, possivelmente porque há variações espectrais de acordo com as condições edafoclimáticas (Sanchez-Rodriguez et al., 2018).

No gráfico, podemos verificar uma evidente separação dos azeites da cv. ‘Cornicabra’, mostrando ser, entre os Azeites de Montanha, aqueles que, pela sua composição química, são mais distintos dos restantes, por serem azeites mais ricos em ácidos gordos polinsaturados. Esta separação representa 77 % da variação total observada. Por seu turno, os outros azeites monovarietais encontram-se mais ou menos distribuídos no grupo situado à direita do gráfico.

4.2.3.2. Espectroscopia Vibracional RAMAN

Os espectros médios obtidos em RAMAN (Figura 48) para os Azeites de Montanha são semelhantes aos obtidos por outros autores que analisaram azeites de diferentes proveniências (Portarena et al., 2019; Jiménez-Carvelo et al., 2017).

Nesta metodologia, para a elaboração da análise em componentes principais (Figura 49), foi utilizada a informação espectral na região entre 2500 e 100 cm^{-1} com os mesmos processamentos prévios indicados para o tratamento de dados em NIR.

Figura 48. Espectro típico de Azeite de Montanha obtido em FT-RAMAN.

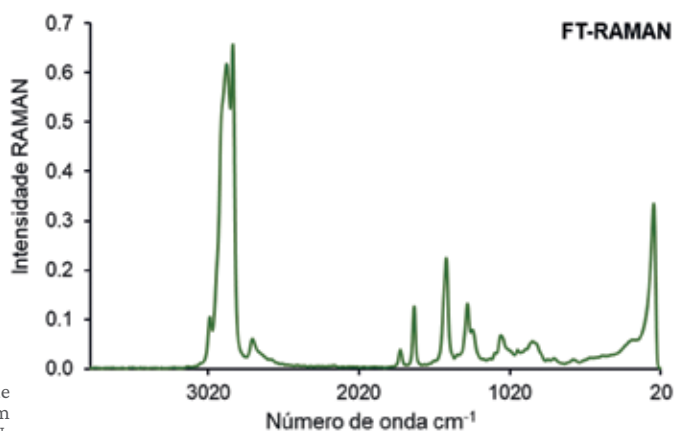
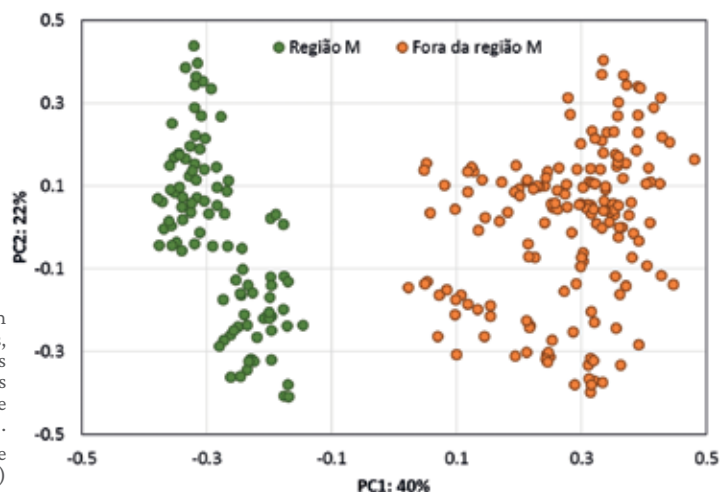
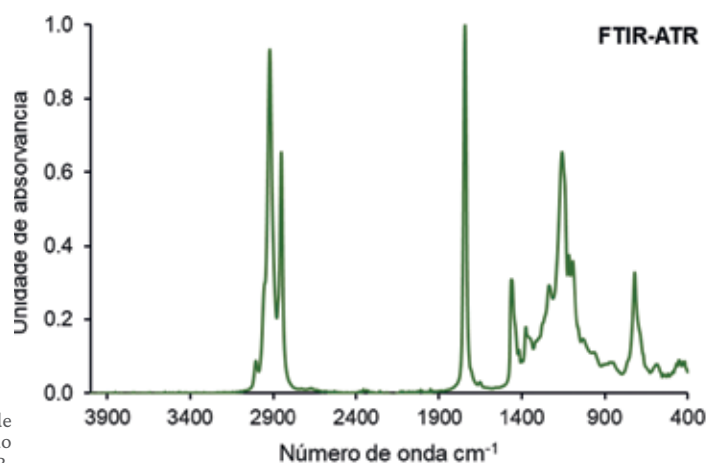


Figura 49. Análise em componentes principais, efetuada com espectros RAMAN, do conjunto de azeites analisados na Região CIM-BSE e da Beira Baixa (Idanha-a-Nova). (Nota: M - Azeites de Montanha)



4.2.3.3. Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)

Figura 50. Espectro típico de Azeite de Montanha obtido em FTIR-ATR.



Neste caso, o eixo 1 explica 40% da variação total observada e é possível constatar uma clara separação entre as duas regiões em estudo. Estes resultados preliminares são prometedores, já que as regiões são relativamente próximas e, nos dois grupos, a cultivar maioritária é a 'Galega Vulgar', pelo que a espectroscopia vibracional RAMAN poderá ser uma técnica potencialmente útil em trabalhos de investigação futuros, permitindo, eventualmente, confirmar a origem geográfica de diferentes amostras (Sánchez-Rodríguez et al., 2018). No entanto, é necessário reafirmar, mais uma vez, que estes resultados devem ser confirmados com mais estudos delineados para este efeito e com maior número de regiões para confirmação desta hipótese.

Os espectros médios obtidos em FTIR-ATR (Figura 50) para os Azeites de Montanha são semelhantes aos obtidos por outros autores que trabalharam com azeites de várias proveniências (Tapp et al., 2003; Rohman et al., 2010; Jiménez-Carvelo et al., 2017).

Na Figura 51, apresentam-se os resultados obtidos com oito cultivares recolhidas na região de CIM-BSE durante a campanha 2018/2019. Neste caso, não havendo espectros em FTIR-ATR com azeites de outras regiões para comparação, apresenta-se apenas uma avaliação com os azeites monovarietais do presente projeto.

A ACP obtida (Figura 51) mostra que se podem

identificar algumas diferenças entre os azeites da cv. ‘Carrasquinha’ quando comparada com os azeites das cvs. ‘Cornicabra’ e ‘Cordovil’ (PC1: 41 %). O azeite da cv. ‘Carrasquinha’ também apresenta características diferenciadoras dos azeites das cvs. ‘Galega’, ‘Cobrançosa’, ‘Negrinha’, ‘Verdeal’ e ‘Passareira’, explicado pela P2: 35 %. No entanto, algumas cultivares como a ‘Cobrançosa’ e a ‘Negrinha’, parecem produzir azeites com características distintas entre si, o que revela que, provavelmente, as plantas fornecidas pelos viveiristas nem sempre se encontram devidamente identificadas ou que existe uma importante variabilidade genética que é importante identificar e/ou controlar. Esta situação já tinha sido detetada na avaliação dos ácidos gordos por NIR, no capítulo anterior, pelo que consideramos que este é um aspeto que deverá ser investigado com novas amostras. Além disso, estas avaliações não podem basear-se apenas num ano de amostragem, face às variações anuais da composição química do azeite.

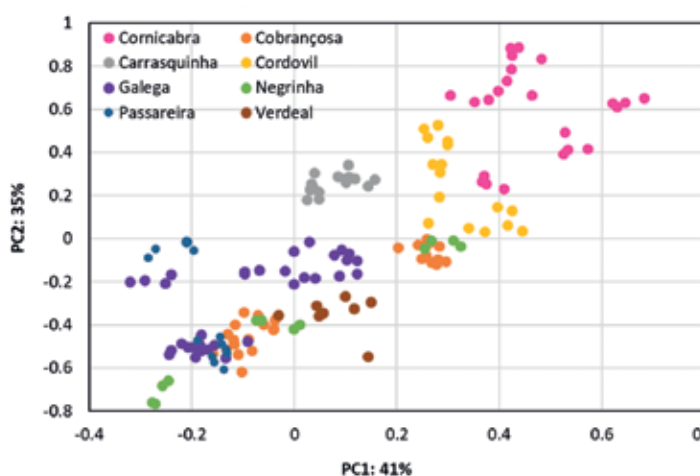


Figura 51. Análise em componentes principais, efetuada com espectros FTIR-ATR, para oito azeites monovarietais de amostras recolhidas na campanha 2018/2019 na Região CIM-BSE.

4.2.4. Conclusões

Apesar do presente projeto não ser de investigação, mas sim de transferência de conhecimento, não quisemos deixar de mostrar as potencialidades dos equipamentos existentes no CBP-BI. Nos trabalhos desenvolvidos durante o projeto “Promoção e Valorização de Azeites de Montanha”, aplicaram-se as calibrações comerciais em equipamento NIR para que, de uma forma rápida, se avaliassem os teores em gordura e humidade das amostras de azeitona, já que permitem conhecer o rendimento em azeite, que é dos parâmetros mais importantes para o agricultor e para a indústria. Além disso, avaliou-se a acidez, o índice de peróxido, o K_{270} e o K_{232} e a composição em ácidos gordos maioritários, parâmetros relacionados com a qualidade e com a rotulagem nutricional.

Neste artigo, mostrámos também como a espectroscopia vibracional RAMAN e o FTIR-ATR, podem ser técnicas a utilizar futuramente na diferenciação de Azeites de Montanha, bem como na distinção dos azeites das cultivares autóctones desta Região. Parece-nos que há um longo trabalho ainda para explorar com estas metodologias, sobretudo para uma caracterização que possa relacionar mais claramente a componente genética com a componente química dos azeites.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Centro de Estudos Florestal (UID/AGR/UI00239/2019), por ter adquirido a licença do *software Unscrambler*® X, versão: 10.5.46461.632 (CAMO). Agradecem também ao centro de investigação LEAF (UID/AGR/04129/2019).

Referências Bibliográficas

- Andrade, T., Vitorino, C., Gouveia, C., Anjos, O., & Peres, F. (2018). Azeites Virgens de Agricultura Biológica na Região de Idanha-a-Nova. Livro de Resumos do VIII Simpósio Nacional de Olivicultura, 7 a 9 de Junho, Santarém, Portugal, pp: 58.
- Anjos, O., Campos, MG., Ruiz, P. C., & Antunes, P. (2015). Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*, 169: 218–223.
- Anjos, O., Santos, A. F. A., Paixão, V., & Estevinho, M. L. (2018). Physicochemical Parameters of Lavandula spp. honey accessed by FT-RAMAN. *Talanta*, 178: 43–48.
- Armenta, S., Garrigues, S., & Guardia, M. (2007). Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 596(2): 330-337.
- Christy, A. A., Kasemsumran, S., Du, Y., & Ozaki, Y. (2004). The Detection and Quantification of Adulteration in Olive Oil by Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Analytical Sciences*, 20 (6): 935-940.
- Conzen, J. P. (2006). *Multivariate Calibration. A Practical Guide for the Method Development in the Analytical Chemistry*. Bruker Optick GmbH. 2nd edition.
- Lachenmeier, D.W. (2007). Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, 101(2): 825–832.
- Inarejos-García, A. M., Gomez-Alonso, S., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2013). Evaluation of minor components, sensory characteristics and quality of virgin olive oil by near infrared (NIR) spectroscopy. *Food Research International*, 50: 250-258.
- Jiménez-Carvelo, A. M., Osorio, M. T., Koidis, A., González-Casado, A., & Cuadros-Rodríguez, L. (2017). Chemometric classification and quantification of olive oil in blends with any edible vegetable oils using FTIR-ATR and Raman spectroscopy. *LWT*, 86: 174-184.
- Li, Y., Xiong, Y., & Min, S. (2019). Data fusion strategy in quantitative analysis of spectroscopy relevant to olive oil adulteration. *Vibrational Spectroscopy*, 101: 20-27.
- Lucarini, M., Durazzo, A., Sánchez Del Pulgar, J., Gabrielli, P., & Lombardi-Boccia, G. (2018). Determination of fatty acid content in meat and meat products: The FTIR-ATR approach. *Food Chemistry*, 267(11): 223-230.
- Nunes, C.A. (2014). Vibrational spectroscopy and chemometrics to assess authenticity, adulteration and intrinsic quality parameters of edible oils and fats. *Food Research International*, 60: 255-261.
- Portarena, S., Anselmi, C., Zadra, C., Farinelli, D., Famiani, F., Baldacchini, C., &

Brugnoli, E. (2019). Cultivar discrimination, fatty acid profile and carotenoid characterization of monovarietal olive oils by Raman spectroscopy at a single glance. *Food control*, 96: 137-145.

Qin, J., Kim, M. S., Chao, K., Schmidt, W. F., Cho, B., & Delwiche, S. R. (2017). Line-scan Raman imaging and spectroscopy platform for surface and subsurface evaluation of food safety and quality. *Journal of Food Engineering*, 198: 17-27.

Rios-Reina, R., Luis García-González, D., María Callejón, R., & Manuel Amigo Rubio, J. (2018). NIR spectroscopy and chemometrics for the typification of Spanish wine vinegars with a protected designation of origin. *Food Control*, 89(7): 108-116.

Rohman A., & Man, Y. B. C., (2010). Potential Use of FTIR-ATR Spectroscopic Method for Determination of Virgin Coconut Oil and Extra Virgin Olive Oil in Ternary Mixture Systems. *Food Analytical Methods*, 4(2): 155–162.

Sánchez-Rodríguez, M. I., Sánchez-López, E. M., Caridad, J. M., Marinas, A., & Urbano, F. J. (2018). Effect of agro-climatic conditions on near infrared spectra of extra virgin olive oils. *SORT-Statistics and Operations Research Transactions*, 1(2): 209-236.

Santos, A. J. A., Anjos, O., & Pereira, H. (2016). Prediction of Blackwood Kraft pulps yields with wood NIR-PLS-R models. *Wood Science and Technology*, 50(6): 1307–1322.

Sinelli, N., Cerretani, L., Di Egidio, V., Bendini, A., & Casiraghi, E. (2010). Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity. *Food Research International*, 43(1): 369-375.

Tapp, H. S., Defernez, M., & Kemsley, E. K. (2003). FTIR spectroscopy and multivariate analysis can distinguish the geographic origin of extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21): 6110-6115.

Yang, H., Irudayaraj, J. M. K. & Paradkar, M. M. (2005). Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 93(1): 25-32.