



AMANDA CAROLINA SOUZA ANDRADA ANCONI

**USO DA COLORIMETRIA POR IMAGEM DIGITAL
PARA A DETERMINAÇÃO DE ÍNDICES DE
QUALIDADE EM AZEITES DE OLIVA**

LAVRAS - MG

2023

AMANDA CAROLINA SOUZA ANDRADA ANCONI

**USO DA COLORIMETRIA POR IMAGEM DIGITAL PARA A
DETERMINAÇÃO DE ÍNDICES DE QUALIDADE EM AZEITES DE OLIVA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Cleiton Antônio Nunes

Orientador

LAVRAS - MG

2024

AMANDA CAROLINA SOUZA ANDRADA ANCONI

**USO DA COLORIMETRIA POR IMAGEM DIGITAL PARA A
DETERMINAÇÃO DE ÍNDICES DE QUALIDADE EM AZEITES DE OLIVA**

**USE OF DIGITAL IMAGE COLORIMETRY TO DETERMINE
QUALITY INDEXES IN OLIVE OIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 15 de dezembro de 2023.

Dr. Matheus Puggina de Freitas UFLA

Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães UFLA

Dr. Roney Alves da Rocha UFLA

Dr. Luiz Fernando de Oliveira da Silva EPAMIG

Prof. Dr. Cleiton Antônio Nunes

Orientador

LAVRAS - MG

2024

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Anconi, Amanda Carolina Souza Andrada.

Uso da Colorimetria por Imagem Digital para a Determinação
de Índices de Qualidade em Azeites de Oliva / Amanda Carolina
Souza Andrada Anconi. - 2023.

78 p.: il.

Orientador(a): Cleiton Antônio Nunes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.
Bibliografia.

1. Análise Colorimétrica. 2. Índice de Peróxidos. 3. Acidez
Livre. I. Nunes, Cleiton Antônio. II. Título.

Ao meu filho Arthur, que dá sentido a tudo,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha Vó Rosa (*in memoria*), fonte de inspiração para o que há de melhor em mim.

À minha mãe Catarina, pelo apoio incondicional e por acreditar em meus sonhos mesmo quando eu perdia a fé.

Ao meu filho Arthur, que ao longo dos últimos anos, gentilmente, cedeu seu tempo de colo e afeto aos meus estudos e atividades no laboratório. Arthur, obrigada. Você é o meu coração.

Ao professor Cleber Anconi, por ter me mostrado o tamanho da minha força e determinação.

Ao querido, Ewerton de Brito, pela inspiração e incentivo para a conclusão deste desafio.

À minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado e nunca deixaram de comemorar minhas conquistas.

Ao meu orientador Cleiton Nunes, pela amizade, pela criatividade e pela inspiração como cientista e acadêmico. Seus ensinamentos transcendem a ciência que estudamos.

Aos colegas do laboratório, pelos ensinamentos, pela ajuda e amizade.

A cada um dos mestres e doutores que me avaliaram e contribuíram para minha formação. Cada comentário foi essencial para meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao programa de Pós-Graduação em Agroquímica e à Universidade Federal de Lavras (UFLA) por fornecerem a estrutura necessária ao desenvolvimento dessa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

RESUMO

Azeites de oliva estão sujeitos a reações de oxidação e hidrólise. Essas reações resultam na formação de hidroperóxidos e ácidos graxos livres, compostos que interferem diretamente na qualidade, classificação e precificação do produto. A extensão da oxidação e da hidrólise pode ser medida por meio de parâmetros químicos de qualidade, denominados índice de peróxidos (IP) e acidez livre (AL), respectivamente. Os métodos padrão para determinação desses indicadores são baseados em titulações que, apesar da baixa complexidade analítica, demandam uma grande quantidade de reagentes e são susceptíveis a erros na detecção do ponto final. A fim de contornar tais desvantagens, essa pesquisa buscou o desenvolvimento de dois métodos inovadores, baseados em Colorimetria por Imagem Digital (CID) usando smartphones, para determinar o IP e a AL em azeites de oliva. No primeiro método, para a determinação do IP, foram construídas curvas analíticas usando uma solução padrão de peróxido de hidrogênio. O iodeto de potássio foi empregado para a reação colorimétrica e as soluções fotografadas. Os parâmetros dos sistemas de cores RGB, CMYK, HSV, L*a*b* e XYZ foram calibrados contra a quantidade de miliequivalentes de O₂ nos padrões, e as curvas analíticas usadas para determinar o IP das amostras. No segundo método, para a determinação da AL, uma solução de ácido oleico foi utilizada para a construção de curvas de adição padrão, empregando-se acetato cúprico para gerar um derivado de coloração azulada. As soluções foram fotografadas e o percentual de ácido oleico nos padrões calibrado contra os respectivos parâmetros do sistema de cor RGB. Finalmente, a AL de cada amostra foi determinada por extrapolação das curvas. Os resultados obtidos revelaram métodos mais confiáveis e de execução mais simples que os comumente empregados, com R² de 0,97 e 0,99, e RMSE de 3,29 meq O₂/Kg e 0,08 %, respectivamente. Os métodos ainda contribuem para a redução de custos e tempo analítico nos laboratórios. Os resultados desta pesquisa foram acrescidos de dados de outros óleos vegetais e publicados nos periódicos *Journal of Food and Composition Analysis* (DOI 10.1016/j.jfca.2022.104724) e *Food Chemistry* (DOI 10.1016/j.foodchem.2024.138555).

Palavras-chave: Análise colorimétrica. Olivicultura. Óleos comestíveis.

ABSTRACT

Olive oils are subject to oxidation and hydrolysis reactions. These reactions produce hydroperoxides and free fatty acids, compounds that directly affect the quality, classification, and pricing of products. The extent of oxidation and hydrolysis can be measured by the chemical quality parameters called peroxide value (PV) and free acidity (FA), respectively. The standard methods for determining these indicators are based on titrations, with low analytical complexity, but that requires a lot of chemicals and are susceptible to errors in detecting the endpoint. To overcome such disadvantages, this research sought to develop two innovative methods based on Digital Image Colorimetry (DIC) using smartphones to determine PV and FA in olive oils. In the first method of PV determination, analytical curves were built using a standard hydrogen peroxide solution. Potassium iodide was used for the colorimetric reaction, and the solutions were imaged. The parameters of the RGB, CMYK, HSV, L*a*b*, and XYZ color systems were calibrated against the milliequivalents of O₂ in the standards, and the analytical curves were used to determine the PV of samples. In the second method, to determine FA, an oleic acid solution was used to construct standard addition curves, using cupric acetate to generate a bluish-colored derivative. The solutions were imaged, and the percentage of oleic acid in the standards was calibrated against the respective parameters of the RGB color system. Finally, the FA of each sample was determined by curve extrapolation. The results showed more reliable and simpler methods than those commonly used, with R² of 0.97 and 0.99 and RMSE of 3.29 meq O₂/Kg and 0.08 %, respectively. The methods also contribute to reducing costs and analytical time in laboratories. The results of this research were added to data from other vegetable oils and published in the journals *Journal of Food and Composition Analysis* (DOI 10.1016/j.jfca.2022.104724) and *Food Chemistry* (DOI 10.1016/j.foodchem.2024.138555).

Keywords: Colorimetric analysis. Olive growing. Edible oils.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	1
	CAPÍTULO 1 - LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	3
	RESUMO.....	3
1	INTRODUÇÃO	4
2	AZEITE DE OLIVA	5
2.1	Aspectos Gerais	5
2.2	Aspectos históricos.....	8
2.3	Aspectos econômicos	10
2.4	Composição química do azeite de oliva	12
2.5	Rancidez oxidativa.....	13
2.6	Rancidez hidrolítica.....	17
2.7	Oxidação e hidrólise na obtenção do azeite de oliva	19
2.7.1	Índices de qualidade relacionados à rancidez oxidativa e à rancidez hidrolítica	23
3	Colorimetria por Imagem Digital	27
3.1	Sistemas de cores	28
3.1.1	Sistema RGB	28
3.1.2	Sistema HSV.....	29
3.1.3	Sistema L*a*b*	30
3.1.4	Sistema XYZ	31
3.1.5	Sistema CMYK	32
4	Estado da arte	33
	REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
	CAPÍTULO 2 - USO DA COLORIMETRIA POR IMAGEM DIGITAL PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS EM AZEITES DE OLIVA	46
	RESUMO.....	46
1	INTRODUÇÃO.....	47
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1	Amostras.....	48
2.2	Preparo e análise dos padrões e das amostras de azeites de oliva..	48
2.3	Aquisição das imagens	50
2.4	Análise estatística.....	51
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS.....	61
	CAPÍTULO 3 - USO DA COLORIMETRIA POR IMAGEM DIGITAL PARA A DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ LIVRE EM AZEITES DE OLIVA.....	62
	RESUMO	62

1	INTRODUÇÃO	63
2	MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1	Amostras.....	64
2.2	Determinação da AL pelo método CID	64
2.3	Aquisição das imagens digitais	66
2.4	Determinação da AL em azeites de oliva pelo método titulométrico	66
2.5	Análise estatística.....	67
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS	77

INTRODUÇÃO GERAL

O azeite de oliva é um dos principais produtos da olivicultura e um dos produtos agrícolas de maior valor agregado. Extraído diretamente das azeitonas, esse óleo está entre os alimentos mais apreciados no mundo devido às suas propriedades químicas e nutricionais.

De acordo o Instituto Brasileiro de Olivicultura, o Brasil vive um cenário de crescente desenvolvimento no setor, com um crescimento anual de 10 % (IBRAOLIVA, 2023). Entretanto, o país ainda é o segundo maior importador de azeite no mundo. Deste modo, um dos maiores desafios da olivicultura nacional é a produção de azeites em quantidade e qualidade suficientes para reduzir a dependência da importação.

A qualidade do azeite de oliva é fortemente influenciada por fatores relacionados à pós-colheita, ao processamento dos frutos e ao armazenamento após a extração. Durante esses processos, podem ocorrer reações de oxidação e hidrólise, que liberam compostos responsáveis pela diminuição da qualidade e valor nutricional, bem como pelo desenvolvimento de características sensoriais desagradáveis no óleo.

Os parâmetros químicos usados para avaliar a extensão das reações de oxidação e hidrólise são, respectivamente, o índice de peróxidos (IP) e a acidez livre (AL). Tais parâmetros também são determinantes para classificar os produtos destinados a consumo como extravirgem, virgem e outros, o que causa um impacto direto no seu valor comercial.

Os métodos padrão para a determinação de IP e AL são baseados em titulometria. Embora estes métodos apresentem baixa complexidade analítica, a alta demanda por reagentes químicos e a subjetividade na detecção do ponto final da titulação torna-os, por vezes, imprecisos e laboriosos, configurando importantes desvantagens à sua execução.

Nos últimos anos, diversos métodos analíticos baseadas em Colorimetria por Imagem Digital (CID), tem sido discutidos. Essa abordagem visa extrair informação analítica de imagens obtidas por dispositivos como smartphones e câmeras digitais, fornecendo resultados de forma rápida, precisa e econômica. A condição para a realização desse tipo de análise é que a amostra seja colorida ou que uma reação química colorimétrica esteja envolvida, de forma que a intensidade da cor varie

proporcionalmente à concentração do analito. As imagens digitais das amostras são usadas para extrair as informações numéricas associadas à sistemas de cores, e essa informação é usada como sinal analítico para a construção de modelos de calibração.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver métodos baseados em CID usando câmeras de smartphones para a determinação de IP e AL em azeites de oliva. Este trabalho possibilitou o desenvolvimento de métodos inovadores e de execução mais simples que os usados atualmente, contribuindo para uma redução de custos e tempo analítico nos laboratórios. Além disso, as alternativas aqui propostas incentivam o controle de qualidade nas unidades produtoras sem alto investimento em equipamentos, contribuindo para modernizar os métodos de análise, que podem vir a ser adotados em todo o mundo.

Esta pesquisa é relatada em três capítulos. No primeiro é apresentado um referencial teórico abordando os principais assuntos relacionados ao trabalho a fim de se aprimorar o conhecimento na área de estudo. No segundo e terceiro capítulos, são apresentados, respectivamente, os métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de IP e AL em azeites de oliva.

CAPÍTULO 1 - LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

RESUMO

O azeite de oliva é um dos alimentos mais tradicionais e de maior valor agregado. Sua importância na história da humanidade foi inicialmente atribuída a aspectos culturais e religiosos das civilizações mediterrânicas. Com a expansão comercial e o desenvolvimento de novas técnicas de extração, as barreiras geográficas foram sobrepostas, e o azeite passou a ser consumido em todo o mundo. A alta e crescente demanda impulsionou expansão da produção para regiões além do Mediterrâneo. Assim, pesquisas para investigar as propriedades químicas e nutricionais, bem como os fatores que interferem na qualidade do produto foram desenvolvidas. Além disso, novas tecnologias otimizaram a extração, visando, ainda, garantir a qualidade durante o processamento e armazenamento do azeite. Atualmente, dentre os principais desafios do setor está o desenvolvimento de métodos que permitam a análise rápida e precisa dos parâmetros de qualidade e classificação do azeite de oliva, e diversos esforços têm sido feitos neste sentido. Este capítulo aborda os principais aspectos que tornaram o azeite de oliva um dos alimentos mais apreciados do mundo, e expõe brevemente o conhecimento acerca da composição química e dos fatores que prejudicam a qualidade do produto. Por fim, uma explanação dos fundamentos da Colorimetria por Imagem Digital (CID), bem como as pesquisas recentes que demonstram sua contribuição para a análise de azeites de oliva, são apresentadas.

Palavras-chave: Olivicultura. Índice de peróxidos. Acidez livre. Imagens Digitais.

1 INTRODUÇÃO

O azeite de oliva é um dos alimentos mais apreciados no mundo. Obtido diretamente das azeitonas, frutos da oliveira (*Olea europaea L.*), o óleo é rico em ácidos graxos monoinsaturados e compostos bioativos que são responsáveis pelas reconhecidas propriedades nutricionais e sensoriais do produto.

O azeite de oliva está presente na história da humanidade desde os primórdios. Pesquisas recentes indicam que esse óleo já era extraído das azeitonas há cerca de 7 mil anos. Desde então, diversas evidências científicas e arqueológicas comprovaram o conhecimento e a manipulação do azeite de oliva pelas civilizações mediterrânicas, que o usavam principalmente como alimento, combustível para iluminação, cosmético, medicamento e em rituais sagrados.

Inicialmente o azeite era empregado apenas para atender as demandas domésticas, sendo a extração feita de forma arcaica, pelos próprios grupos familiares. Com o passar do tempo o produto começou a ser empregado para finalidades comerciais, e os métodos de extração foram aperfeiçoados. Atualmente, o azeite de oliva é consumido em todo o mundo, e o avanço tecnológico tem impulsionado cada vez mais o desenvolvimento de técnicas e equipamentos que otimizem a extração e garantam a qualidade do produto obtido.

A composição química majoritária do azeite de oliva consiste em uma mistura de triacilgliceróis, três moléculas de ácidos graxos (em especial, ácido oleico) ligados ao glicerol. Tal composição, sobretudo devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados, favorece a ocorrência de reações de oxidação, que ocorrem naturalmente em alimentos lipídicos. Além disso, reações de hidrólise podem ocorrer em determinadas condições.

A oxidação rompe as duplas ligações das cadeias insaturadas de ácidos graxos. A partir dessa reação são produzidos radicais livres que interagem com o oxigênio e oxidam outras moléculas de ácidos graxos, formando compostos responsáveis pela perda da qualidade (atributos sensoriais e nutricionais) e segurança do alimento (formação de produtos tóxicos).

A hidrólise, por sua vez, rompe as ligações éster que unem o glicerol aos ácidos graxos, liberando-os do triacilglicerol de origem. A liberação dos ácidos graxos tem

como consequência o aumento da acidez do azeite e o favorecimento de reações de oxidação, levando à gradual degradação do óleo.

As reações de oxidação e hidrólise podem ser prevenidas pelo emprego de técnicas adequadas de extração e armazenamento. A extensão dessas reações pode ser medida por meio do índice de peróxidos (IP) e da acidez livre (AL), parâmetros químicos usados para a determinação da qualidade e para a classificação do azeite de oliva. Os métodos padrão empregados nessas medições apresentam como desvantagens a alta demanda por reagentes químicos e as imprecisões na determinação do ponto final da titulação.

Este capítulo apresenta um levantamento bibliográfico acerca do azeite de oliva e das reações que comprometem sua qualidade, e sugere o uso da Colorimetria por Imagem Digital (CID) para contornar as desvantagens inerentes aos métodos padrão empregados na determinação do IP e da AL.

2 AZEITE DE OLIVA

2.1 Aspectos Gerais

O azeite de oliva é um dos principais produtos da olivicultura, atividade agrícola voltada ao cultivo oliveira *Olea europaea L.* (Figura 1). Essa espécie vegetal arbórea, genuína da região mediterrânea, é adaptada a condições climáticas caracterizadas por verões quentes e secos, e invernos com baixas temperaturas e úmidos (TEJERO e ROSA, 2020).

Figura 1 – Oliveira da espécie *Olea europaea L.* e seu fruto (azeitona), com indicações das partes que o compõem.



Fonte: Adaptada de Luigi Nifosi / Shutterstock.com (2023).

Ao contrário de outros óleos vegetais, que são obtidos de grãos, azeites são extraídos de frutos. O azeite de oliva é extraído do fruto da oliveira, a azeitona (a palavra azeite deriva do idioma árabe *az-zait*, que significa suco de azeitona), e está concentrado principalmente no mesocarpo do fruto (ALBIN e VILLAMIL, 2003).

Diferente do azeite lampante, que não pode ser consumido, o azeite de oliva destinado ao consumo é extraído de forma exclusivamente mecânica (extravirgem ou virgem), e deve atender a alguns requisitos de qualidade, que são definidos em função da análise sensorial e de parâmetros químicos como a acidez livre (AL), o índice de peróxidos (IP) e a extinção específica no UV (MAPA, 2012). Dentre estes, abordaremos neste trabalho a AL e o IP. Esses parâmetros também são usados para diferenciar, entre si, os azeites extravirgens e virgens (de maior qualidade química e nutricional), e diferenciá-los de outros azeites, de qualidade inferior (refinados ou lampante).

De acordo com o Conselho Oleícola Internacional (*International Olive Council* – IOC), organização criada em 1959 com o objetivo de discutir questões políticas e técnicas que englobam a produção de azeites:

Azeites virgens são os azeites obtidos do fruto da oliveira (*Olea europaea L.*) unicamente por meios mecânicos ou outros meios físicos em condições nomeadamente térmicas

que não provoquem alterações do azeite e que não tenham sofrido qualquer tratamento que não seja lavagem, decantação, centrifugação e filtração. (IOC, 2011).

A legislação brasileira, por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Instrução Normativa Nº 1, de 30 de janeiro de 2012, estabelece, no Art. 1º:

Azeite de oliva: o produto obtido somente do fruto da oliveira (*Olea europaea L.*) excluído todo e qualquer óleo obtido pelo uso de solvente, por processo de reesterificação ou pela mistura com outros óleos, independentemente de suas proporções. (MAPA, 2012).

E no Art. 6º, § 1º:

Azeite de oliva virgem: o produto extraído do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros meios físicos, sob controle de temperatura adequada, mantendo-se a natureza original do produto; o azeite assim obtido pode, ainda, ser submetido aos tratamentos de lavagem, decantação, centrifugação e filtração, observados os valores dos parâmetros de qualidade previstos no Anexo I desta Instrução Normativa. (MAPA, 2012).

Azeites de oliva virgens e extravirgens apresentam características químicas e sensoriais que os fazem ser amplamente apreciados e relevantes do ponto de vista comercial, sendo frequentemente relacionado a uma dieta saudável. Uma grande variedade de estudos mostrou que as substâncias químicas presentes no azeite, como os ácidos graxos monoinsaturados, os antioxidantes e as vitaminas A, D, E e K são de extrema importância para a prevenção de doenças (MEDEIROS e HAMPTON, 2019; PREEDY E WATSON, 2021), atuando como antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, anti-inflamatórios e antiolesterol (BIESALSKI et al., 2009; KRIS-ETHERTON et al., 2002; YUBERO-SERRANO, 2018).

O azeite de oliva é considerado o “ouro líquido” do mediterrâneo, pois, ao longo dos séculos foi, e ainda é, uma importante fonte de riqueza para a região (ALBIN e VILLAMIL, 2003).

2.2 Aspectos históricos

O cultivo da oliveira para a obtenção de azeite de oliva é uma das atividades agrícolas mais antigas que se tem conhecimento, datando dos tempos pré-históricos. Ao longo da história da humanidade, este cultivo teve grande importância tanto cultural, como em economias industriais baseadas na produção de azeite.

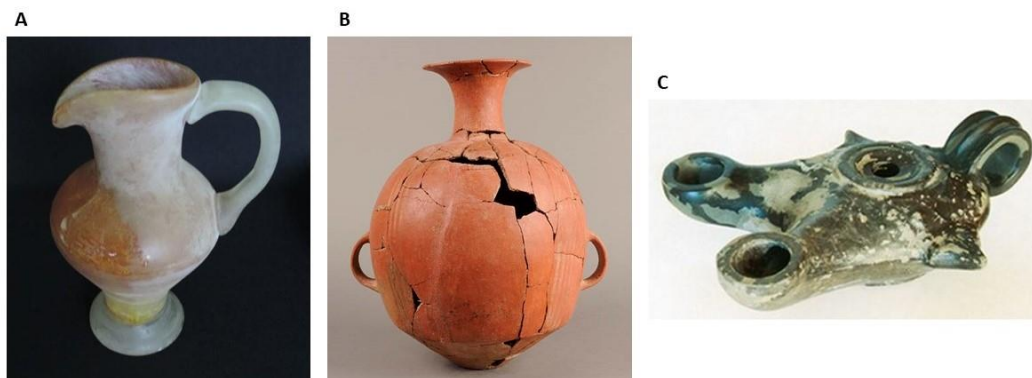
O uso do azeite de oliva foi inicialmente associado a aspectos culturais, patrimoniais e religiosos das civilizações antigas da região mediterrânea. O exemplo mais famoso remete à mitologia grega. Para os gregos antigos, a oliveira era uma árvore nobre por fornecer os frutos com os quais se produzia o azeite, usado como combustível para habitações e templos, e como gênero alimentício (BARAZANI, et al., 2023). Na narrativa mitológica da disputa entre Atena (deusa da sabedoria) e Poseidon (deus do mar) pela posse da região Ática, Atena ofereceu aos habitantes uma oliveira e venceu a disputa, tendo seu nome associado à cidade de Atenas. O azeite também apresenta fortes associações com a religião cristã através do Crisma, óleo consagrado feito à base de azeite e especiarias, usado em diversos rituais e cerimônias católicas (RILEY, 2002).

O caráter milenar do cultivo da oliveira para a obtenção de azeite nas civilizações costeiras ao Mediterrâneo é atestado por diversos relatos científicos e arqueológicos. Numerosos monumentos, esculturas de templos e papiros, que datam de cerca de 1550 a.C., têm frutos e folhas de oliveira representados, e indicam a utilização do azeite como alimento, cosmético, medicamento, combustível para fontes de iluminação e material de embalsamamento no Egito Antigo (El-KHOLY, 2022).

A maioria dos estudos apontam para o início da utilização do azeite na Idade do Bronze (~3600 a.C.), sendo sua obtenção neste período identificada pelas características de artefatos (pedras, cerâmica) e pelos recipientes (aríbalos e alabastros) da indústria de perfumes que utilizavam o óleo como matéria prima (RILEY, 2002). Entretanto, descobertas recentes evidenciam a extração de azeite em um período anterior à Idade do Bronze. Trata-se de instalações encontradas em poços subaquáticos da costa levantina,

datados de 7100-6300 anos, contendo milhares de caroços de azeitonas triturados e resíduos que indicam a obtenção do óleo (CARRIÓN, et al. 2010).

Figura 2 – Evidências arqueológicas - objetos usados no manuseio do azeite de oliva.
(A) alabastro cerâmico, (B) aríbalo e (C) candeeiro (lâmparina).



Fonte: Adaptada de Museo dell'Olivo (2023).

Inicialmente, a produção de azeite foi essencialmente doméstica, atendendo apenas às necessidades das famílias. As azeitonas eram esmagadas com os pés ou como o uso de sapatos de madeira. Mais tarde, o esmagamento passou a ser feito em pilões de pedra (Di GIOVACCHINO 2013), e a pasta era separada do azeite pela adição de água quente, sendo o óleo obtido armazenado em potes de argila (KAPELLAKIS et al., 2007).

Com o passar do tempo, os métodos de produção foram aperfeiçoados para atender o aumento da demanda gerado pelo início da comercialização ao redor do mar Mediterrâneo. O primeiro desenvolvimento tecnológico no processamento da azeitona se deu por volta de 50 a.C., com a introdução dos sistemas de britagem e separação por prensas manuais (KIOURELLIS, 2005). Mas foi somente na segunda metade do século XX que as inovações tecnológicas possibilitaram a substituição dos mecanismos de moagem e separação, aumentando a produtividade e facilitando a expansão da comercialização para outras regiões do mundo (KAPELLAKIS et al., 2007).

A importância cultural do azeite ao longo da história da humanidade, bem como o conjunto de práticas, expressões, representações, conhecimentos e técnicas que envolvem sua extração e utilização, fez com que este óleo fosse declarado pela UNESCO, em 2012, patrimônio imaterial da humanidade.

Figura 3 – Equipamentos antigos usados na extração do azeite de oliva: Prensa (à esquerda) e moinho (à direita).



Fonte: Adaptada de Museu do Azeite Bobadela (2023).

2.3 Aspectos econômicos

A economia do azeite de oliva constitui uma indústria no valor de US\$ 3,03 bilhões, com um mercado liderado por Espanha, Itália, Tunísia, Grécia e Turquia (IOC, 2023). O cultivo da oliveira ocupa 10,5 milhões de hectares em todo o mundo. Deste total, cerca de 97 % ainda se concentram na região do Mar Mediterrâneo, onde a maioria dos países produtores de azeite está localizada (FOOD AGRICULTURE AND ORGANIZATION, 2020).

De acordo com dados do IOC, no panorama mundial, a extração de azeite de oliva cresceu 133 % nos últimos 30 anos. A principal justificativa para esse crescimento reside no fato de que o óleo em questão constitui uma valiosa fonte de antioxidantes (compostos fenólicos) e ácidos graxos essenciais, que têm sido um dos focos mais importantes na dieta humana em todo o mundo (SOUILEM et al., 2017).

Apesar do crescimento acelerado no setor, a safra de 2022/23 foi atípica. Devido às mudanças climáticas, que resultaram em temperaturas extremas e secas no período de crescimento das azeitonas, a União Europeia produziu apenas 1.392 toneladas métricas (t) de azeite, cerca de 40 % menos que a safra anterior (IOC, 2023). A Espanha, maior produtor mundial, que chega a extrair 1.500 t de azeite por ano, produziu apenas 610 t no período. Este cenário favoreceu o aumento exorbitante do preço dos produtos, e a expectativa é de a situação se agrave nos próximos anos, acompanhando o desequilíbrio

nas condições climáticas da região mediterrânea e em todo o globo (CARRANÇA, 2023).

De fato, a expansão na produção do azeite de oliva ao longo dos últimos 30 anos, incentivada pelo aumento do consumo do produto, resultou na difusão da olivicultura por regiões do mundo antes não exploradas. Uma destas regiões é o Brasil, onde essa cultura foi oficialmente introduzida em 1948, no Rio Grande do Sul. Desde então, o setor tem apresentado um dinamismo crescente, com plantação de oliveiras em diferentes regiões do país. Atualmente, o Rio Grande do Sul é a principal região em área cultivada e produção, seguida por Minas Gerais (COUTINHO et al., 2009), onde a produção concentra-se na região da Serra da Mantiqueira (MESQUITA e ANDRADE, 2014). Além disso, São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Espírito Santo, Goiás e Bahia são regiões onde a área plantada está em crescimento (ROMAN et al., 2018).

A expansão da olivicultura pelo país é sustentada pelo fato de que a oliveira, apesar de se desenvolver bem em condições climáticas específicas (clima subtropical e temperado, com temperaturas entre 15 °C e 20 °C, e baixa pluviosidade), pode se adaptar a regiões de boa amplitude térmica e maior precipitação (GONÇALVES, et al., 2014). Outro fator que impulsionou fortemente esse desenvolvimento foi a primeira extração de azeite extravirgem realizada em solo nacional, em 2008, na fazenda experimental da EPAMIG, em Maria da Fé (MG). Desde então, o cultivo da oliveira para a produção de azeite se expandiu ainda mais no país. Atualmente, o país conta com mais de 70 rótulos de azeites extravirgem e diversos prêmios em competições internacionais (PLANT PROJECT, 2020).

Na safra 2022/2023, a Serra da Mantiqueira (RJ, SP e MG) produziu 120 mil litros de azeite. No Rio Grande do Sul foram produzidos cerca de 580,3 mil litros de azeite, representando um aumento de 29 % em relação à safra anterior. Esse crescimento também fica aparente em termos área plantada, que no RS, passou de 2 mil hectares em 2016 para aproximadamente 6,2 mil hectares em 2023 (IBRAOLIVA, 2023, PRÓ-OLIVA, 2020).

Apesar disso, o Brasil ainda produz uma quantidade expressivamente menor (0,6 %) do que sua demanda de consumo, caracterizando-se, como um dos principais importadores do produto. De acordo com relatórios do IOC 2023, o país é o segundo maior importador de azeite fora da Europa, representando 8 % das importações. Na tentativa de modificar este cenário, diversos esforços têm sido realizados com o intuito

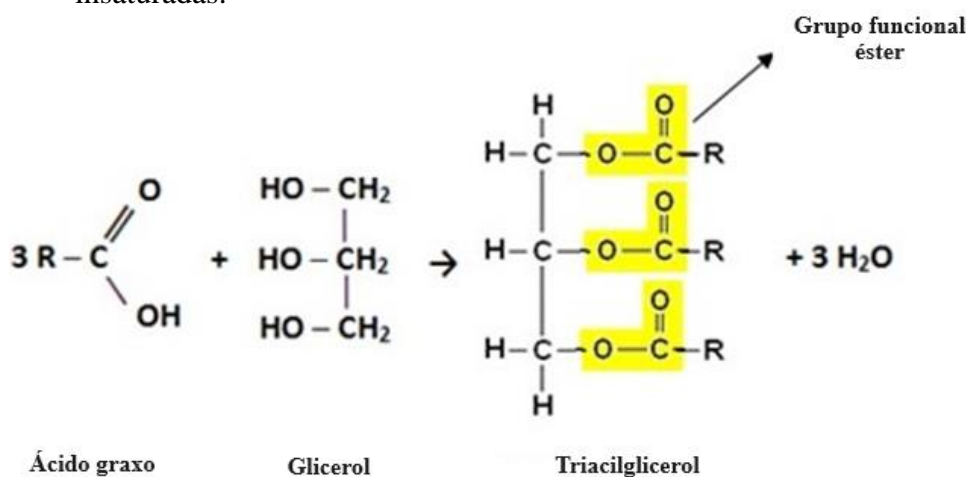
de viabilizar e expandir a olivicultura nacional. Um dos principais desafios consiste na prática de técnicas de cultivo que possibilitem a manutenção dos padrões de qualidade internacionais.

2.4 Composição química do azeite de oliva

O azeite de oliva é um óleo obtido diretamente das azeitonas por extração mecânica. Deste modo, é natural que sua composição química seja dependente de fatores relacionados aos frutos utilizados na extração. Esses fatores geralmente incluem a cultivar, o estágio de maturação e a exposição solar, além do tipo de extração empregado e das condições de armazenamento.

De maneira geral, o azeite de oliva tem sua composição majoritária formada por uma mistura de triacilgliceróis (95 % a 99 %), que são ésteres de glicerol contendo ácidos graxos saturados ou insaturados (KIRITSAKIS et al., 1978; BOSKOU, 1996), conforme mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Reação de formação de um triacilglicerol contendo três ácidos graxos, cujas cadeias carbônicas são representadas por R e podem ser saturadas ou insaturadas.



Fonte: Da autora (2023).

Os principais ácidos graxos que compõem a estrutura dos triacilgliceróis presentes no azeite de oliva são apresentados na Tabela 1, onde se destaca o ácido oleico (monoinsaturado), que aparece em maior proporção.

Tabela 1 – Principais ácidos graxos presentes no azeite de oliva e seus teores em relação ao total de ácidos graxos.

Ácido	Teor (%)	Ácido	Teor (%)
Oleico (18:1)	57-78	Esteárico (18:0)	2,3-2,5
Palmítico (16:0)	10-18	Palmitoleico (16:1)	0,7-2,4
Linoleico (18:2)	7-19	Linolênico (18:3)	0,6 -0,8

Fonte: Adaptado de Salas et al (2000).

A elevada proporção de ácidos graxos monoinsaturados em comparação aos poli-insaturados resulta no aumento da estabilidade oxidativa do azeite, uma vez que um maior número de ligações duplas na cadeia de ácidos graxos está associado a uma maior suscetibilidade à oxidação (CAPANNESI et al., 2000).

A composição minoritária é formada por cerca de 1 % de compostos não triacilgliceróis, chamados de fração insaponificável. Essa fração é formada por compostos voláteis (que conferem ao produto as características sensoriais relacionadas ao odor e sabor) (PERCUSSI, 2019), ácidos graxos livres, glicerol, fosfatídeos (como lecitina), pigmentos, carboidratos e proteínas (KIRITSAKIS et al., 1978).

Devido à sua composição rica em triacilgliceróis, o azeite de oliva é susceptível a reações de oxidação e hidrólise. Essas reações promovem, respectivamente, a conversão de ligações duplas das cadeias insaturadas em ligações simples e a quebra da ligação éster do triacilglicerol. Como consequência, são formados compostos responsáveis pela modificação das propriedades sensoriais, químicas e nutricionais do óleo, que resultam na desvalorização decorrente da desclassificação (como extravirgem) ou reclassificação (como virgem ou lampante), e à rejeição por parte do consumidor.

2.5 Rancidez oxidativa

A oxidação é a principal causa de deterioração de alimentos lipídicos e é comumente conhecida como rancidez oxidativa. Esse processo compromete a qualidade e segurança destes alimentos, influenciando seu valor nutricional, prazo de validade e valor comercial (JIANG et al., 2020). Assim como outros óleos vegetais, o azeite de oliva também está sujeito ao processo oxidativo que, uma vez iniciado, afeta diretamente

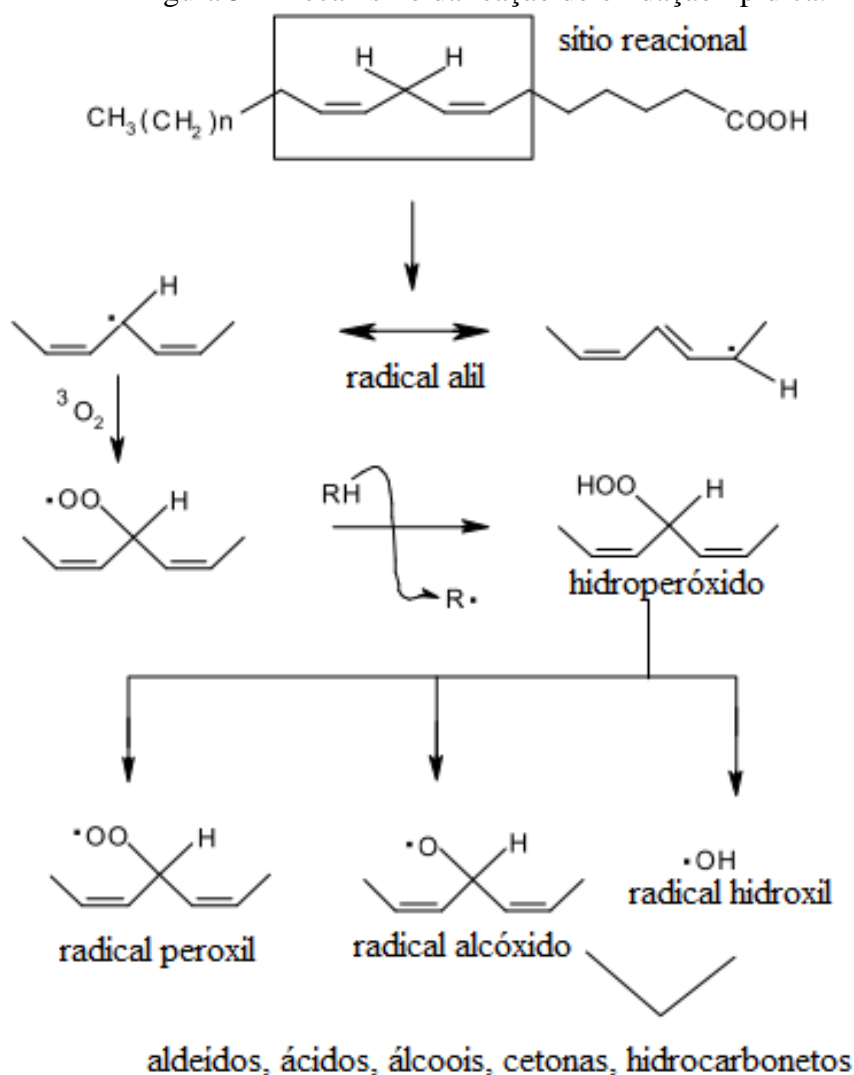
seus índices de qualidade, alterando características como sabor, cor, odor e valor nutritivo (CHAIYASIT et al., 2007).

A oxidação rompe as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados presentes no azeite (JORGE, 2009; XIE et al., 2019). Esses ácidos possuem alto peso molecular e baixa volatilidade, não contribuindo diretamente para o aroma do produto. Entretanto, sua decomposição nas etapas subsequentes do processo oxidativo leva à formação de moléculas pequenas e voláteis, que implicam no desenvolvimento de características sensoriais desagradáveis, associadas à rancidez (NAWAR, 1996).

O processo oxidativo em lipídios envolve uma sequência complexa de reações químicas entre os ácidos graxos insaturados e espécies ativas de oxigênio. Tais reações podem ocorrer de forma espontânea ou serem catalisadas por luz, temperaturas elevadas e presença de enzimas específicas (MCCLEMENTS e DECKER, 2000; MIN e BOFF, 2002).

Conforme mostrado no mecanismo sumarizado na Figura 5, na ausência de radiação luminosa, o processo oxidativo inicia-se com a auto-oxidação de um ácido graxo insaturado.

Figura 5 – Mecanismo da reação de oxidação lipídica.



Fonte: Adaptada de Silva (2007).

A etapa de iniciação envolve a abstração de um átomo de hidrogênio do carbono α -metilênico, formando um radical alquil ou alil. Essa etapa é lenta e não espontânea, podendo ser iniciada pela ação de fótons da radiação luminosa (fotoexcitação - catalisada por íons metálicos), pela interação com o oxigênio atmosférico ou pela ação de enzimas lipoxigenases. Os produtos gerados na etapa de iniciação são inodoros e não promovem alterações nas características sensoriais do óleo.

A etapa subsequente (propagação) é rápida, e nela ocorrem as reações em cadeia de radicais livres, que são altamente reativos. O radical formado na iniciação sofre reação de adição pelo oxigênio atmosférico (O_2), originando o radical peróxido ($\text{ROO}\cdot$). Este, por sua vez, pode abstrair um átomo de hidrogênio do carbono α -metilênico de um

ácido graxo adjacente, produzindo um hidroperóxido lipídico (ROOH). Este último sofre acumulação no óleo, devido à velocidade das reações envolvidas na propagação. Entretanto, os hidroperóxidos são bastante instáveis e, imediatamente após sua formação, sofrem cisões homolíticas produzindo radicais peroxil, alcóxido e hidroxil.

Na etapa de terminação, a interação de dois radicais livres para formar espécies não radicalares encerra o processo, reduzindo a concentração de hidroperóxidos e formando produtos que alteram as características sensoriais e nutricionais do azeite. As moléculas formadas nesta etapa são principalmente monoaldeídos e cetonas, produtos voláteis e sensorialmente desagradáveis; além de ácidos carboxílicos, que contribuem para aumentar a acidez do azeite; alcoóis e hidrocarbonetos, que são potencialmente tóxicos (WSOWICZ et al., 2004; SILVA, 2007; ARAÚJO, 2008; ELDIN, 2010).

O mecanismo apresentado deixa claro que a decomposição dos hidroperóxidos produz radicais responsáveis pelo aumento das taxas de oxidação. Entretanto, o processo ocorre no azeite de forma lenta, podendo demorar de 12 a 24 meses (DAIS e HATZAKIS, 2013).

Uma vez que a reação envolve a quebra da ligação dupla C=C, quanto maior for o grau de insaturação dos ácidos graxos e sua disponibilidade, maior será a propensão do óleo a sofrer oxidação. Em comparação aos outros óleos vegetais, o azeite de oliva apresenta uma maior razão de ácidos graxos monoinsaturados/poli-insaturados, o que o torna mais resistente à oxidação. A quantidade de oxigênio disponível também é um fator de forte influência na oxidação, uma vez que a reação não ocorre na ausência de oxigênio. A temperatura acelera a reação de oxidação como um todo. Assim, manter o azeite em condições adequadas de temperatura e disponibilidade de oxigênio durante a extração e armazenamento é crucial para prevenir a oxidação.

O azeite de oliva é composto por fotossensibilizadores naturais, como a clorofila. Na presença de radiação luminosa, essas moléculas transferem energia para o oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$), gerando o estado excitado singleto ($^1\text{O}_2$). Esse oxigênio excitado é mais reativo, e ao entrar em contato com ácidos graxos insaturados, produz hidroperóxidos por meio da foto-oxidação. Portanto, é extremamente importante manter o azeite protegido da radiação luminosa (ARAÚJO, 2008).

Íons metálicos provenientes de matérias-primas, equipamentos e material de embalagem também atuam como catalisadores na reação de oxidação. A presença de água no azeite aumenta a mobilidade desses íons (WSOWICZ et al., 2004), de forma

que o tipo de material em contato com o óleo e a presença de água devem ser considerados para prevenir as reações de oxidação.

Por fim, o azeite de oliva contém compostos fenólicos (oleuropeína, hidroxitirosol, tirosol e outros) que doam átomos de hidrogênio aos radicais livres formados durante as etapas de iniciação e propagação da reação oxidativa, inativando-os. Deste modo, quanto maior a presença de compostos fenólicos no azeite, maior será sua atividade antioxidante e maior a resistência à oxidação (KIRITSAKIS et al., 1978; CHAIYASIT et al., 2007).

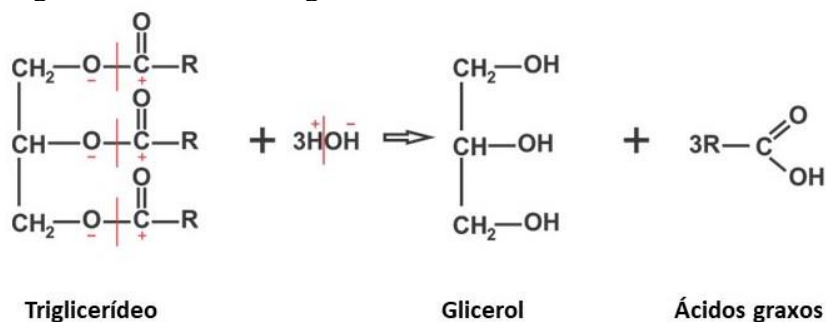
2.6 Rancidez hidrolítica

A hidrólise é uma reação química com potencial para influenciar a qualidade do azeite de oliva. Esse processo, também conhecido como rancidez hidrolítica, não é percebido sensorialmente, mas leva ao aumento da acidez e libera produtos que podem favorecer reações de oxidação no óleo.

A acidificação do azeite pode ser iniciada ainda no fruto como resultado da degradação de sua estrutura celular, que promove o contato do óleo contido nos vacúolos com enzimas presentes no mesocarpo. Além disso, a acidez pode ser ainda associada ao nível de maturação das azeitonas, ao resultado de inadequações na estocagem e no sistema de obtenção do azeite (RAMIREZ-TORTOSA, 2006), e ao contato do óleo com agentes químicos, como ácidos e bases (MURTY et al., 2002; JORGE, 2009).

Reações de hidrólise envolvem o rompimento de ligações químicas pela reação com a água. Conforme discutido anteriormente, o azeite de oliva é constituído majoritariamente por triacilgliceróis, compostos químicos cuja estrutura contém três ácidos graxos ligados ao glicerol (GUNSTONE, 2013). Durante a hidrólise, as ligações éster dos triacilgliceróis são rompidas, liberando glicerol e ácidos graxos (Figura 7).

Figura 7 – Equação global para a reação de hidrólise de um triacilglicerol liberando glicerol e três ácidos graxos.



Fonte: Da autora (2023).

A reação mostrada na Figura 7 ocorre em três etapas que podem ser simultâneas, mas cujas velocidades são diferentes. A primeira etapa envolve a quebra da molécula de triacilglicerol, convertendo-a em um diacilglicerol e liberando o primeiro ácido graxo da molécula original. Nas duas etapas seguintes o diacilglicerol é transformado em monoacilglicerol, liberando o segundo ácido graxo e, por fim, a hidrólise do monoacilglicerol libera o último ácido graxo e o glicerol (SATYARTHI et al., 2011).

A velocidade da reação de hidrólise é influenciada principalmente pela quantidade de água presente no óleo e pela temperatura. Temperaturas elevadas favorecem a difusão da água no óleo, fazendo com que ambas as variáveis apresentem uma relação proporcional com taxa de hidrólise dos triacilgliceróis (SATYARTHI et al., 2011). A reação também pode ser catalisada por enzimas lipases naturalmente presentes na azeitona, cuja temperatura ótima de atividade é 37 °C (WAHLEFELD, 1974). Portanto, o controle da temperatura é essencial tanto no processamento quanto no armazenamento do óleo.

A fração dos ácidos graxos que são liberados em decorrência da hidrólise é expressa pela acidez livre (AL), que mede a porcentagem equivalente à massa de ácido oleico (ácido graxo mais abundante no azeite de oliva) em 100 g de óleo. A AL é um dos parâmetros químicos usados na avaliação da qualidade e classificação dos azeites (GAZELI et al., 2020), conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Limites de tolerância do parâmetro de qualidade AL para azeite de oliva.

	Azeites Virgens			Outros	
	Extravirgem	Virgem	Lampante	Refinado	Azeite de Oliva
Acidez Livre (%)	≤ 0,8	≤ 2,0	≥ 2,0	≤ 0,3	≤ 1,0

Fonte: MAPA (2012).

De acordo com as normas do MAPA, dentre os azeites virgens, o de maior qualidade é o extravirgem, cuja AL deve ser inferior a 0,8 % (m/m), seguido do azeite virgem, com AL inferior a 2 % (MAPA, 2012). O azeite virgem cuja acidez ultrapasse 2 % (lampante) é considerado impróprio para consumo e destina-se principalmente ao refino. Esses limites estão de acordo com a legislação internacional (IOC, 2017).

Azeitonas de baixa qualidade (fermentadas ou muito maduras) são comumente usadas para extração do azeite, fazendo com que o óleo apresente alta acidez e sabor indesejável. Esse azeite pode ser submetido a tratamentos de refino, sendo comercializado como azeite refinado, cuja acidez livre não deve ultrapassar 0,3 %. Por fim, o azeite constituído por uma mistura de azeites refinado e virgem, denominado simplesmente azeite de oliva, deve apresentar acidez igual ou inferior a 1 % (IOC, 2022; CODEX ALIMENTARIUS, 2021).

2.7 Oxidação e hidrólise na obtenção do azeite de oliva

O azeite de oliva se difere de outros óleos vegetais comestíveis, a iniciar-se pelo fato de que a maioria deles é extraída de grãos de plantas, enquanto azeites são extraídos de frutos. Além disso, diferentemente de demais óleos vegetais, o azeite pode ser extraído de forma exclusivamente mecânica, não exigindo a utilização de solventes orgânicos (PERCUSSI, 2019). Dessa forma, sua qualidade depende de três fatores: a qualidade das azeitonas, a tecnologia usada na extração e os cuidados durante o armazenamento (PREEDY E WATSON, 2021).

O azeite de oliva é extraído da polpa e, em menor proporção, do caroço das azeitonas. O processo de obtenção do óleo inicia-se com a colheita das azeitonas, observando-se o estágio de maturação ideal. Nesse estágio, o fruto concentra a maior quantidade de óleo, mas não está maduro o suficiente para terem sido iniciados processos

oxidativos e hidrolíticos, que resultam na degradação precoce do óleo (PERCUSSI, 2019). Uma vez colhidos, os frutos devem ser armazenados por um curto intervalo de tempo, tomando-se as precauções adequadas que previnam o esmagamento e o rompimento da casca, o que levaria à liberação de enzimas responsáveis pelo aumento das taxas de hidrólise e oxidação. A Figura 9 ilustra o processo de extração do azeite de oliva.

Figura 9 – Etapas do processo de extração do azeite de oliva.



Legenda: (1) desfolha; (2) lavagem; (3) malaxação; (4) e (5) centrifugação; (6) filtração; (7) armazenamento.

Fonte: Da autora (2023).

Colhidas as azeitonas, o passo seguinte consiste na desfolha (1) e lavagem (2) dos frutos. As azeitonas são lavadas com água enquanto são agitadas em peneiras metálicas. Esse processo tem como objetivo remover impurezas que podem ser transferidas ao óleo durante a extração (Di GIOVACCHINO, 2013; KALOGIANNI et al., 2019). O efeito da lavagem na qualidade do azeite ainda é uma das lacunas da literatura sobre o assunto.

Em seguida, os frutos são triturados com o auxílio de trituradores metálicos (martelos fixos ou discos) para obtenção da pasta de azeitona (Di GIOVACCHINO, 2013). O azeite está presente nos vacúolos das células mesocarpais da azeitona na forma de minúsculas gotículas (KAPELLAKIS et. al., 2008). O esmagamento (ou trituração) do fruto é o processo físico responsável pela quebra dos tecidos celulares e liberação das

gotículas de óleo (KALOGIANNI et al., 2019). Durante essa etapa, a qualidade do azeite pode ser influenciada pela presença de oxigênio (SÁNCHEZ-ORTIZ et al., 2016) e pela temperatura das azeitonas utilizadas para alimentar o triturador (CAPONIO E GOMES, 2001), uma vez que estes fatores afetam a estabilidade oxidativa do óleo. Além disso, trituradores de martelo parecem favorecer a oxidação em comparação com os de disco (CAPONIO et al., 2003; KOUTSAFTAKIS et al., 2002). Em alguns casos, antes da preparação da pasta pode ser feito o descaroçamento. Os caroços transferem enzimas oxidativas para a pasta (fenoloxidase e lipoxigenase), sendo sua remoção importante para o aumento da estabilidade oxidativa do azeite (LUACES et al., 2007; SERVILI et al., 2007). Entretanto, essa prática é pouco viável e raramente aplicada.

A etapa seguinte consiste na malaxação da pasta de azeitona, processo realizado a fim de auxiliar a coalescência (aumento do tamanho das gotas de óleo) e facilitar a separação das fases oleosa e aquosa na emulsão (KAPELLAKIS et al., 2008). Neste processo, ocorrem reações de oxidação e hidrólise e, novamente, as duas variáveis que influenciam fortemente na qualidade do azeite nesta etapa são a temperatura e a disponibilidade de oxigênio.

O aumento da temperatura de malaxação não afeta a acidez livre do óleo. No entanto, essa variável promove a aceleração da oxidação, evidenciada pelo aumento do IP ou de compostos voláteis resultantes das vias de oxidação. O aumento da concentração de oxigênio no malaxador intensifica reações de oxidação por vias enzimáticas e químicas. Por outro lado, a acidez é apenas ligeiramente afetada por este fator. O aumento de oxigênio disponível também é responsável pela diminuição na concentração de compostos fenólicos, promovendo uma diminuição na estabilidade oxidativa durante o armazenamento (KALOGIANNI et al., 2019).

Ao final da malaxação, o azeite é separado da pasta de azeitona por centrifugação (4 e 5). Embora existam outras formas de extração, atualmente, o sistema de centrifugação é o mais comum devido à sua elevada capacidade de carga e a menor necessidade de mão de obra (Di GIOVACCHINO, 2013). O sistema de centrifugação pode ser de duas ou três fases, e a diferença básica entre eles é que no primeiro, a operação ocorre sem adição, ou com uma pequena adição de água. Já no segundo caso, ocorre a adição de água na separação (cerca de 50 % do peso do fruto seco). Estudos mostram que, para o processamento de azeitonas de má qualidade, os parâmetros de oxidação aumentaram e os de hidrólise diminuíram quando um sistema trifásico foi

usado no lugar de um sistema bifásico. Este último (diminuição da AL) foi atribuído ao particionamento dos ácidos graxos livres entre as fases aquosa e oleosa. Entretanto, para azeitonas de boa qualidade, houve pouco ou nenhum efeito nos parâmetros químicos de qualidade (KALOGIANNI et al., 2019). É importante ressaltar que, mesmo sem adição de água, esta etapa promove a oxidação do óleo através da dissolução do oxigênio proveniente do ambiente (MASELLA et al., 2009).

Ao final da separação o azeite tem aparência turva, devido à dispersão de minúsculas gotículas de água. Por isso, o óleo precisa ser filtrado (6) (KAPELLAKIS et al., 2008).

Por fim, o azeite obtido é armazenado em tanques ou envasado. Essa etapa é crucial para assegurar a qualidade, uma vez que todos os critérios adotados nas etapas anteriores podem ser irrelevantes, caso o armazenamento seja feito de maneira inadequada (BENDINI et al., 2009). Portanto, é essencial adotar medidas que visem controlar os fatores físicos que promovem a oxidação lipídica. Estes fatores incluem a disponibilidade de oxigênio, a permeabilidade ao oxigênio do material usado no armazenamento, a temperatura de armazenamento, a presença de metais de transição e a exposição à luz (ARAÚJO, 2008).

O contato do óleo com o oxigênio atmosférico durante o armazenamento deve ser mínimo, e a oxidação pode ser prevenida utilizando um gás inerte (como nitrogênio) no espaço superior do recipiente, que precisa estar tampado (Di GIOVACCHINO et al., 2002).

O efeito da temperatura sobre a taxa de oxidação é bastante complexo. Temperaturas mais elevadas favorecem a etapa de iniciação da oxidação, aumentando a taxa de formação de hidroperóxidos. Por outro lado, este fator diminui a solubilidade do oxigênio no óleo e aumenta a decomposição de hidroperóxidos, alterando o perfil dos produtos formados. Em geral, durante o armazenamento, a temperatura deve ser mantida na faixa de 12 °C a 18 °C, evitando-se variações bruscas (SANMARTIN et al., 2018).

A incidência de radiação luminosa promove a foto-oxidação do azeite. Portanto, prevenir a exposição à luz durante o armazenamento é extremamente necessário para prolongar a durabilidade do óleo (BENDINI et al, 2009).

Diante do exposto, fica claro que as reações de hidrólise e oxidação são frequentes e comprometem a qualidade do azeite em quase todas as etapas da extração, sendo essencial o controle de todos os fatores que favorecem essas reações. Além disso,

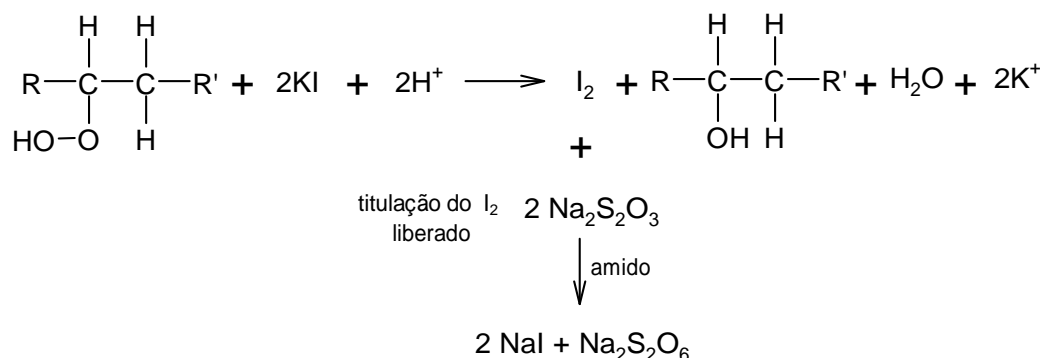
uma análise precisa e rápida dos parâmetros químicos que identificam a ocorrência dessas reações contribui para o controle da qualidade nas unidades produtoras.

2.7.1 Índices de qualidade relacionados à rancidez oxidativa e à rancidez hidrolítica

Conforme discutido, a oxidação lipídica ocorre em vários estágios. Portanto, sua determinação envolve uma variedade de métodos. O índice de peróxido (IP), que mede a concentração de hidroperóxido lipídico no óleo, é geralmente empregado para avaliar a oxidação inicial. Seu valor é expresso em termos de miliequivalentes de O₂ por quilograma de óleo (meq O₂/Kg) (NIELSEN, 2017).

Um método padrão para a determinação IP em azeite de oliva é descrito pelo IOC/T.20/Doc. N° 35/Rev1 2017 e se baseia em uma titulação com tiosulfato de sódio, que mede a concentração do iodo formado a partir do iodeto de potássio devido à sua reação com os hidroperóxidos presentes no óleo. A amostra é solubilizada em uma mistura de solventes, e uma solução de iodeto de potássio é adicionada para que a reação de oxirredução entre o íon iodeto e os hidroperóxidos presentes na amostra ocorra. O iodo formado é então titulado com tiosulfato de sódio usando amido como indicador (IOC 2017). A reação envolvida é mostrada na Figura 6.

Figura 6 – Reação química empregada na determinação do índice de peróxidos em azeite de oliva.



Fonte: Nunes et al. (2016).

O volume de tiosulfato empregado na retrotitulação do iodo é usado para calcular o valor de IP.

O IP fornecido pelo método titulométrico é um dos parâmetros químicos utilizados para estimar a qualidade do azeite de oliva e para classificá-lo, conforme mostrado na Tabela 3. Conforme previsto na Instrução Normativa N° 1, de 30 de janeiro de 2012 do MAPA, os limites estabelecidos são de 20 meq O₂/Kg para azeites virgens, 5 meq O₂/Kg para azeites refinados e 15 meq O₂/Kg para azeites de oliva.

Tabela 3 – Limites de tolerância do parâmetro de qualidade IP para azeite de oliva.

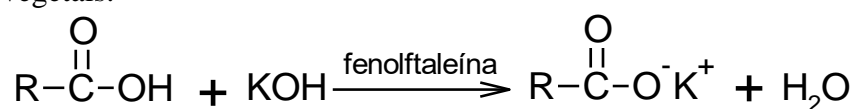
	Azeites Virgens		Outros	
	Extravirgem	Virgem	Refinado	Azeite de Oliva
Índice de Peróxidos (meq O ₂ /Kg)	≤ 20,0	≤ 20,0	≤ 5,0	≤ 15,0

Fonte: MAPA (2012).

Embora forneça um bom indicativo sobre o grau de oxidação, a precisão do método titulométrico para a determinação do IP depende de uma variedade de fatores experimentais, como temporização precisa e proteção da mistura contra a luz. Além disso, os resultados dependem da experiência do analista na detecção do ponto final da titulação (MEHTA et al., 2015). Um agravante consiste no fato de azeites serem solúveis apenas em solventes orgânicos, demandando grandes quantidades desses reagentes, o que resulta em aumento de custos e riscos potenciais à saúde do analista e ao meio ambiente.

A AL é uma medida essencial para a determinação da qualidade do azeite e de sua classificação, sendo importante, ainda, para garantir a viabilidade do produto para o consumo humano. Um método padrão para medir AL em azeites de oliva baseia-se na titulação volumétrica alcalina. Este método é descrito pela IOC/T.20/Doc.No 34/Rev.12017, e consiste em uma reação de neutralização, na qual uma dada massa da amostra de óleo é solubilizada em 100mL de uma mistura de solventes e, posteriormente, os ácidos graxos são titulados com solução de hidróxido de potássio, usando fenolftaleína como indicador. O resultado, comumente referido como grau de acidez, é dado em percentual de ácido oleico por massa de óleo (IOC, 2017). A reação de neutralização dos ácidos graxos é representada na Figura 8.

Figura 8 – Reação química empregada na determinação da acidez total em óleos vegetais.



Fonte: Nunes et al. (2016).

Assim como na determinação do IP, a determinação titulométrica da AL demanda equipamentos simples e de baixo custo. Contudo, além de requerer elevadas quantidades de solventes tóxicos, gerando uma grande quantidade de resíduos, a técnica está sujeita à experiência do analista para detectar o ponto final da titulação, sobretudo na análise de óleos mais pigmentados.

Para contornar as desvantagens inerentes aos métodos apresentados, diversas técnicas têm sido empregadas para a determinação de AL e IP em amostras de azeite.

Spyros e colaboradores (2004) determinaram a AL em função do tempo e das condições de armazenamento de cinco amostras de azeites extravirgem, empregando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (SPYROS et al., 2004). A técnica exigiu equipamentos de custo elevado e analistas altamente treinados.

Balesteros e colaboradores (2007) empregaram a eletroforese capilar para a determinação da AL em azeite de oliva. O método proposto foi comparado à titulação volumétrica alcalina, não sendo encontradas diferenças estatísticas (a 95 % de confiança) (BALESTEROS et al., 2007). Entretanto, o método mostrou-se laborioso e requer elevadas quantidades de reagentes.

Dais e Hatzakis (2013) revisaram diversos trabalhos que usaram RMN para a determinação de AL e IP em azeites de oliva virgens. Nesses trabalhos foram identificados os deslocamentos químicos RMN ^1H de todos os possíveis produtos primários e secundários da oxidação, fornecendo indicativos qualitativos da degradação oxidativa (GUILLÈN e RUIZ, 2001; ALONSO-SALCES et al., 2011). Dados de RMN também foram usados para calcular o IP de vários óleos comestíveis, e validados pelo método de titulação convencional. Uma boa correlação foi obtida para certos óleos comestíveis. Entretanto, desvios consideráveis foram observados para o azeite (SKIERA et al., 2012; DAIS e HATZAKIS, 2013).

Grossi e colaboradores (2014) mediram a AL de 55 amostras de azeite por condutância elétrica, cujos resultados correlacionam-se fortemente à acidez estimada por titulação ($R^2 = 0,93$). O método permitiu medições rápidas e pode ser realizado in loco. Entretanto, exige equipamento adequado e quantidades consideráveis de reagentes químicos (GROSSI, et al, 2014).

Um dos métodos mais utilizados para medições de AL e IP em azeites é a espectroscopia de infravermelho. Garrido-Varo e colaboradores (2017) empregaram a Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR), juntamente com a Quimiometria, para prever AL, IP dentre outros parâmetros de 478 amostras de azeite. Os modelos obtidos produziram resultados promissores, com coeficientes de determinação (R^2) de 0,97 e 0,68 para AL e IP, respectivamente (GARRIDO-VARO et al, 2017). Apesar do bom desempenho na determinação da AL, a técnica exige equipamentos de alto custo.

A voltametria por si só ou juntamente com análises quimiométricas também é relatada para a determinação da AL do azeite de oliva. Baldo e colaboradores (2016) apresentaram uma abordagem voltamétrica/amperométrica para a determinação direta da AL em amostras de azeite de oliva (BALDO et al., 2016). Em um trabalho posterior (2019), os autores usaram respostas voltamétricas como descritores para calibração multivariada em amostras cujos níveis de acidez variaram entre 0,2 % e 1,5 % (m/m). Em ambos os trabalhos, a titulação foi empregada como referência, sendo as diferenças encontradas entre os métodos inferiores a 5 % (BALDO et al., 2016; BALDO et al., 2019). Os métodos demandaram o uso de elevadas quantidades de reagentes e equipamento adequado.

Apesar de muitas das técnicas descritas serem capazes de determinar AL e/ou IP, elas demandam equipamentos caros e procedimentos laboriosos, além de elevadas

quantidades de reagentes. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos, confiáveis e de baixo custo econômico e ambiental, forneceria alternativas úteis para a análise dos parâmetros químicos de qualidade do azeite de oliva. Neste sentido, a Colorimetria por Imagem Digital apresenta-se como uma alternativa em potencial.

3 Colorimetria por Imagem Digital

Nos últimos anos, o desenvolvimento de metodologias analíticas para extrair informações químicas de imagens digitais tem ganhado destaque. Essa abordagem fornece resultados de forma rápida, precisa e barata, além de permitir maior mobilidade (PENG et al., 2017; PESSOA et al., 2017) e ser ambientalmente amigável, devido à menor demanda por reagentes químicos.

O nome dado aos métodos analíticos baseados neste novo conjunto de técnicas é Colorimetria por Imagem Digital (CID), e refere-se à análise colorimétrica baseada na digitalização de imagens coletadas por ferramentas como câmeras digitais, webcams, scanners e smartphones (FIRDAUS et al., 2014).

Quando utilizados como ferramentas de aquisição de imagens digitais, os smartphones são mais interessantes que webcams, scanners e câmeras digitais por serem mais acessíveis e, na maioria das vezes, apresentarem opções de melhoria nas funções da câmera e a possibilidade de uso simultâneo de aplicativos de tratamento de imagens. Além disso, smartphones são dispositivos portáteis e apresentam operação simples e rápida (RODA et al., 2016; NELIS et al., 2020). Assim, a CID aliada a smartphones é considerada uma técnica de análise poderosa para medir as concentrações de analitos de acordo com as variações de cor das imagens (FAN et al., 2021), dispensando o uso de equipamentos caros.

O uso de imagens digitais em química analítica baseia-se na suposição de que, em reações colorimétricas, a intensidade da cor varia proporcionalmente à concentração do analito (DINIZ, 2020). Assim, as imagens digitais são obtidas diretamente de uma amostra colorida ou após uma reação química que produza cor. Nessa estratégia, ao ser direcionada à amostra, uma parte da radiação (luz) é absorvida e outra parte é refletida, sendo a última captada pela câmera digital. A imagem da amostra é adquirida, e os parâmetros de cor são mensurados a partir dos sistemas de cores disponíveis (SANTOS

et al., 2015). Isso é possível porque as imagens digitais possuem um conjunto finito de pixels, sendo as informações de cor convertidas em uma matriz de pontos, onde cada ponto é associado a um pixel e cada pixel tem uma intensidade específica (SHU et al., 2016). As informações de cor, convertidas em valores numéricos, podem ser tratadas como respostas analíticas, sendo relacionadas à concentração das espécies de interesse (SANTOS et al., 2015).

Existem diferentes sistemas de cores, descritos como espaços de coordenadas tridimensionais, onde cada cor é representada por um único ponto. Dentre os espaços de cores mais conhecidos destacam-se RGB, HSV, CMYK, XYZ e La^*b^* , sendo os dois primeiros os mais comuns em análises por CID (FAN et al., 2021). Estes sistemas são comumente usados para classificar, quantificar e padronizar as cores, de acordo com alguns atributos como tonalidade, saturação e luminosidade (LEÃO et al., 2007).

3.1 Sistemas de cores

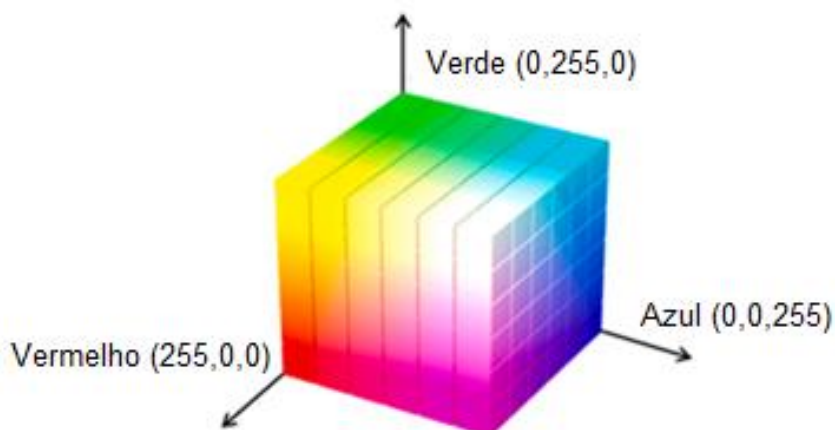
Cada um dos sistemas de cores contempla a informação colorimétrica de maneira diferente e, portanto, sua relação com o analito varia de forma única. Deste modo a compreensão desses sistemas e a forma como suas componentes contribuem para a formação da cor é essencial para seu uso e interpretação adequados.

Para todos os sistemas, a quantificação da cor pode ser realizada com o auxílio de softwares de análise ou aplicativos de imagem, a fim de se obter, de maneira isolada, a intensidade de cada componente correspondente ao sistema utilizado (MORAIS e LIMA, 2015; CHRISTODOULEAS et al., 2015).

3.1.1 Sistema RGB

O sistema RGB pode ser definido como um sistema tridimensional de coordenadas cartesianas, representado pelo cubo na Figura 10, no qual os valores das cores primárias (vermelho, verde e azul) estão em três vértices; as cores secundárias (ciano, magenta e amarelo) estão em outros três vértices; o preto está na origem e o branco está no vértice mais distante da origem (GONZALES e WOODS, 2010; SHU et al., 2016).

Figura 10 – Espaço de cor RGB.



Fonte: Adaptada de Fan et al. (2021).

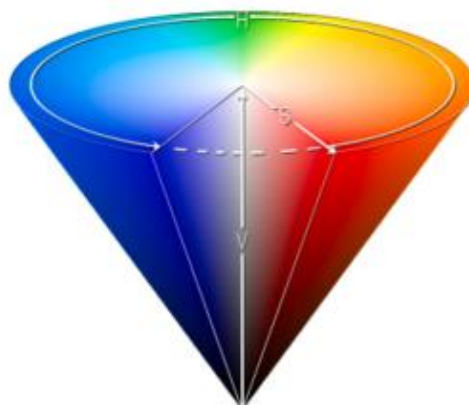
Esse sistema constitui um espaço de cor aditivo, onde a combinação linear das três cores primárias forma uma ampla gama de novas cores, que são pontos na superfície do cubo ou dentro dele, definidas por vetores que se estendem a partir da origem. A intensidade de cada um dos canais (R, G e B) varia de 0 a 255 podendo gerar combinações que levam à descrição de 16.777.216 cores (FIRDAUS et al., 2014).

Como pode ser deduzido a partir do cubo mostrado na Figura 8, o vermelho puro é representado pelas coordenadas 255,0,0; o verde puro pelas coordenadas 0,255,0 e o azul puro pelas coordenadas 0,0,255. O branco é representado pela intensidade máxima das três componentes (255,255,255) e o preto por sua intensidade mínima (0,0,0) (JIA et al., 2015). A escala de cinza, ou seja, os pontos nos quais R, G e B têm a mesma intensidade, estendem-se por uma reta que une o preto ao branco (GONZALEZ; WOODS, 2010; SHU et al., 2016).

3.1.2 Sistema HSV

O sistema HSV, cujo espaço tridimensional é representado pelo cone mostrado na Figura 11, é uma transformação não linear de RGB. Desta forma, as cores não são obtidas por adição ou subtração de cores primárias, mas por transformações matemáticas (ASMARE, et al., 2009). Esse sistema separa a intensidade (luminância) das informações de cor (cromaticidade), o que o diferencia fortemente do sistema RGB.

Figura 11 – Espaço de cor HSV.



Fonte: Adaptada de Fan et al. (2021).

Em HSV, as cores são definidas com base nas componentes H (matiz), S (saturação ou intensidade) e V (valor ou brilho). H é a componente espectral dominante, ou seja, o tipo de cor (vermelho, verde ou azul), e seu valor varia de 0° a 360° . Cada ângulo corresponde a uma tonalidade de cor, sendo 0° vermelho, 120° verde e 240° azul.

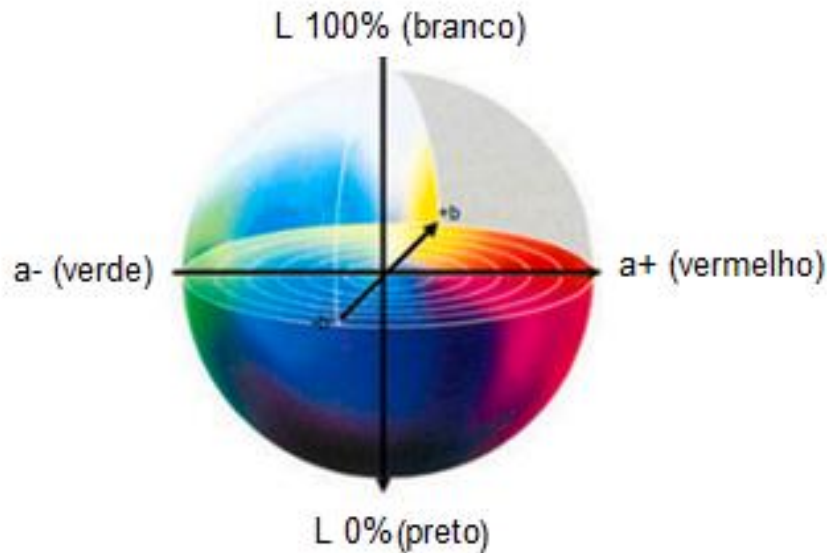
A componente S descreve a intensidade de H, ou seja, a profundidade ou pureza da cor, sendo medida como uma distância radial do eixo central, com valores variando entre 0 (centro) e 100 % (superfície externa). Nesta variação, 0 significa sem cor, ou seja, um tom de cinza, entre preto e branco, e 100 % significa cor intensa. Portanto, quanto mais próximo de 100 %, mais a cor se afasta da escala de cinza e se aproxima da cor representada por seu matiz (SURAL; QIAN; PRAMANIK, 2002). A componente V descreve o brilho. Os valores dessa componente também variam de 0 a 100 %, sendo 0 sempre preto, mas, dependendo da saturação, 100 % pode ser branco ou uma cor mais ou menos saturada (FAN et al., 2021).

3.1.3 Sistema $L^*a^*b^*$

No sistema $L^*a^*b^*$, as cores também são descritas por componentes de luminosidade e cromaticidade. A primeira é representada por L^* (Luminosidade), que varia de 0 a 100, sendo 0 correspondente à cor preta e 100 à cor branca. As componentes relacionadas à cromaticidade são representadas pela coordenada a^* , que varia de valores negativos (verde) a positivos (vermelho); e pela coordenada b^* que também varia de um extremo positivo (amarelo) a outro negativo (azul). Os valores de a^* e b^* cobrem a faixa

de -120 a +120 (LEÃO et al., 2007). O espaço tridimensional deste sistema é representado na Figura 12.

Figura 12 – Espaço de cor $L^*a^*b^*$.



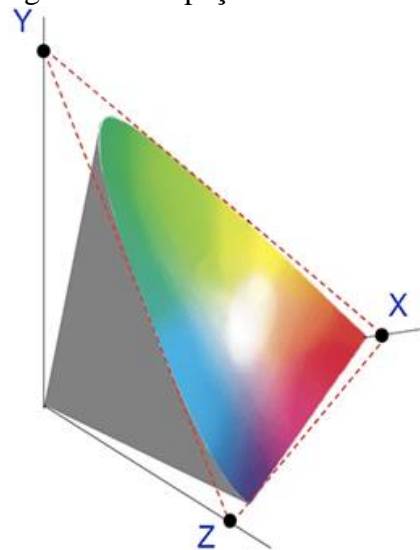
Fonte: Adaptada de Fan et al. (2021).

3.1.4 Sistema XYZ

Em qualquer sistema físico, algumas cores não podem ser visualizadas. Para contornar esta situação, o sistema XYZ foi criado para representar um conjunto de cores primárias teóricas X, Y e Z que são, portanto, cores imaginárias, que não podem ser produzidas por uma fonte de luz física ou percebidas pelo olho humano.

Tal como RGB, XYZ também é um sistema aditivo, cujos parâmetros podem ser obtidos a partir de uma transformação matemática de RGB. No sistema XYZ, a componente Y está relacionada ao brilho de uma cor (claro ou escuro) (FERNANDES et al., 2020); X é uma mistura de três curvas RGB, escolhidas para serem não negativas e, em combinação com Y, pode descrever variações de cor do amarelado ao avermelhado (IBRAHEEM et al., 2012). O espaço tridimensional de XYZ é representado na Figura 13. O triângulo representa a faixa típica de cores produzidas por RGB.

Figura 13 – Espaço de cor XYZ.

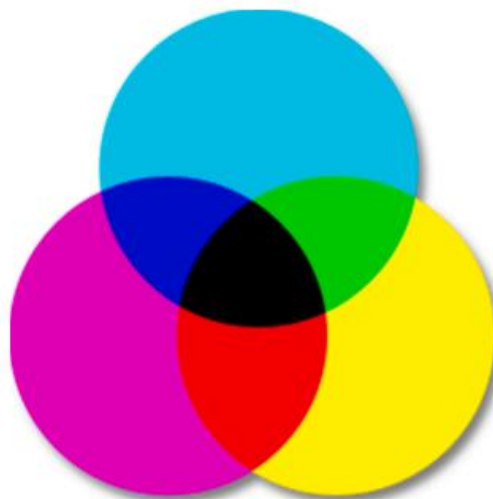


Fonte: GoPhotonics (2022).

3.1.5 Sistema CMYK

O sistema CMYK é um sistema baseado em uma combinação linear subtrativa, sendo formado pelas cores secundárias de RGB: C (ciano), M (magenta), Y (amarelo) e K (preto), com valores variando entre 0 e 100 % (FERNANDES et al., 2020).

Figura 14 – Espaço de cor CMYK.



Fonte: Adaptada de Fan et al. (2021).

4 Estado da arte

A grande vantagem do uso de imagens digitais em para se extrair informação analítica consiste no fato de que os métodos baseados em CID poderiam substituir métodos já existentes, mas que dependem da observação a olho nu. Essa substituição eliminaria o erro subjetivo, que é influenciado principalmente pelas inconsistências do observador, padronizando as análises. Entretanto, para que a tecnologia baseada em smartphones seja finalmente empregada em análises químicas e bioquímicas que visem, por exemplo, o controle e segurança alimentar, pesquisas substanciais são necessárias, a fim de se determinar formatos de reação, ensaios genéricos e padronizar equipamentos e consumíveis (REZAZADEH et al., 2019). Neste sentido, o uso de CID para análise de azeites de oliva tem sido amplamente relatado na literatura. Alguns exemplos recentes são descritos a seguir.

Milanez e Pontes (2014) sugeriram um método simples para classificar diferentes tipos de óleos vegetais (dentre eles azeites de oliva) quanto ao seu estado de conservação. Os autores empregaram CID e técnicas de reconhecimento de padrões com base no sistema de cores RGB, nas componentes HSI (similar ao HSV) e na escala de cinza. Os autores obtiveram taxas de classificação corretas de até 100 %. O método proposto neste trabalho dispensa o uso de reagentes para a realização das análises, e os procedimentos para caracterização química das amostras foram considerados simples e não laboriosos (MILANEZ e PONTES, 2014).

Karagiorgos e colaboradores (2017) descreveram a quantificação de adulterantes em azeite de oliva extravirgem com óleo de soja, usando CID/smartphone com dados RGB convertidos para dados do sistema $L^*a^*b^*$. Foram testadas 11 misturas azeite/óleo e uma curva analítica foi construída com R^2 de 0,99 e erro médio absoluto de 3 % (KARAGIORGOS et al., 2017).

Uma lanterna de LED de 405 nm e um smartphone foram usados por Hakonen e Beves (2018) para autenticação de óleos comestíveis, por meio da fluorescência de clorofilas e polifenóis. Esse estudo comparou os histogramas da componente H do sistema HSV para autenticar 24 óleos comestíveis de 15 marcas, e 9 amostras de azeite de oliva extravirgem, demonstrando que é possível a distinção dos diferentes tipos de óleos (HAKONEN e BEVES, 2018).

Song e colaboradores (2020) usaram vídeos capturados por smartphone, juntamente com técnicas de processamento de imagens e de reconhecimento de padrões, para detectar e quantificar adulteração em 77 amostras de azeite extravirgem. Os vídeos foram usados para detectar as mudanças de cor na superfície das amostras, que foram posteriormente convertidos em dados de RGB e usados para a construção de modelos de calibração multivariada. Os resultados mostraram que a abordagem produziu desempenho comparável às técnicas de espectroscopia, com R^2 de até 0,99 e erro quadrático médio (RMSE - *root mean square error*) de 0,02 (SONG et al., 2020).

Soto e colaboradores (2018) apresentaram uma proposta para determinar os parâmetros de qualidade do azeite de oliva por meio do processamento de imagens adquiridas de frutos de azeitona. Os autores usaram dados dos sistemas de cores RGB, HSV e $L^*a^*b^*$ como descritores para o modelo de regressão multivariada. Foram testados 74 lotes de azeitonas e a predição de IP e AL produziram R^2 de 0,74 e 0,84, e RMSE de 0,12 e 4,12, respectivamente (SOTO et al., 2018).

Singkhonrat e colaboradores (2019) empregaram CID usando uma câmera digital para monitorar a peroxidação lipídica em óleos e emulsões óleo/água, durante a reação com reagente Fenton de 6 amostras, na faixa de IP de 3 a 14 meq O_2 /kg, usando dados do sistema RGB. Os resultados mostraram uma boa correlação ($R^2 = 0,9836$) entre o método proposto e o método UV-Vis, com desvio padrão de $\pm 0,0339$ meq O_2 /kg. O limite de detecção foi de 0,175 meq O_2 /kg e o limite de quantificação foi de 0,35 meq O_2 /kg (SINGKHONRAT et al., 2019).

Vucane e colaboradores (2020) usaram CID empregando um smartphone para determinar a atividade total de eliminação de radicais livres em 11 amostras de óleos vegetais, incluindo azeites de oliva. Os melhores resultados, em comparação com espectrofotometria, foram obtidos usando valores das componentes RG do sistema RGB (VUCANE et al., 2020).

Azimi e colaboradores (2020) empregaram CID e análise discriminante para classificar quatro tipos de óleos vegetais comestíveis, incluindo azeites de oliva, quanto à validade. Os testes foram realizados com base na oxidação das amostras, utilizando dados dos espaços de cores RGB, HSI e $L^*a^*b^*$ com escala de cinza. Os resultados mostraram acurácias de 84 % a 100 %, a depender do tipo de óleo e modelo de cor empregado (AZIMI et al., 2020).

Peamaroon e colaboradores (2021) empregaram CID baseado em câmera de smartphone para a determinação do índice de iodo em óleos vegetais (incluindo azeites de oliva), por meio de dados do sistema RGB. Os resultados mostraram limites de detecção e quantificação inferiores a 0,02 e 0,032 mM I₂ respectivamente, e foram considerados melhores em comparação com o método de referência. O método proposto é menos dispendioso e gera menos resíduos químicos (PEAMAROON et al., 2021).

De Carvalho e colaboradores (2021) empregaram CID usando smartphone na predição dos níveis de clorofilas e carotenoides em azeites de oliva e abacate. Os dados dos sistemas RGB, Y, HSV, CMYK, L*a*b e XYZ foram utilizados para construir modelos de calibração por regressão linear múltipla (MLR) e máquina de vetores de suporte de mínimos quadrados (LS-SVM). O melhor desempenho foi obtido utilizando o modelo XYZ/LS-SVM para clorofilas e Y/LS-SVM para carotenoides, com valores de RMSE de 0,96 e 0,29 mg/kg e R² médios de 0,96 e 0,83, respectivamente (De CARVALHO et al., 2021).

De Carvalho e Nunes (2023) empregaram CID usando um smartphone para prever o teor de óleo de soja em misturas de azeite de oliva extravirgem e azeite de abacate, utilizando diferentes estratégias para mitigar o efeito da iluminação. Os modelos de calibração foram obtidos por regressão linear múltipla (MLR) usando os valores de RGB das imagens. As componentes RG forneceram modelos como melhores habilidades preditivas, para os quais os valores de R² foram maiores que 0,94 e RMSE menores que 0,10 (De CARVALHO; NUNES, 2023).

Resende e colaboradores (2023) desenvolveram e validaram um método CID baseado em smartphone para determinar o teor de esteróis totais em azeites e outros óleos vegetais, usando o método Liebermann-Burchard para a reação colorimétrica. O método proposto teve um desempenho semelhante ao método espectrofotométrico (UV-Vis) usando a componente B do sistema RGB como sinal analítico, com um R² de 0,96 e um erro padrão próximo ao do método de referência. Além disso, os limites de detecção e quantificação calculados foram inferiores às concentrações de esteróis normalmente presentes na maioria dos óleos vegetais (RESENDE et al., 2023).

Todas as abordagens descritas tiveram resultados semelhantes ou melhores do que aqueles obtidos pelos métodos de referência, mostrando que os métodos baseados em CID são promissores para o monitoramento da qualidade dos azeites de oliva.

Visando contribuir para o avanço na aplicação dessas novas tecnologias, essa pesquisa teve por objetivo o desenvolvimento de dois métodos baseados em CID, usando câmeras de smartphones, para acessar os índices de qualidade (IP e AL) de azeites de oliva. Os métodos propostos serão apresentados nos capítulos II e III.

REFÊNCIAS

- ALBIN, A.; VILLAMIL, J. **Aceite de oliva: tradicional sabor mediterrâneo rejuvenecido en tierras Uruguayas**. Montevideo: Editora de Vecho, 2003.
- ALONSO SALCES, R.M.; HOLLAND, M.V.; GUILLOU, C. ¹H-NMR fingerprinting to evaluate the stability of olive oil. **Food Control**, v. 22, p. 2041–2046, 2011.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos Teoria e Prática**. 4ª edição Editora UFV. 2008.
- ASMARE, M. H., ASIRVADAM, V. S., & IZNITA, L. Color Space Selection for Color Image Enhancement Applications. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON SIGNAL ACQUISITION AND PROCESSING**, Kuala Lumpur, Malaysia 2009.
- AZIMI, O.; MOHEBBI, M.; FARHOOSH, R.; SAADATMAND-TARZJAN, M. Discerning expiration status of edible vegetable oils based on color changes during oxidation process: Using digital image and linear discriminant analysis in both primary and secondary oxidations. **Iranian Food Science and Technology Research Journal**, v. 15, n.6, p.145-158, 2020.
- BALDO, M. A.; OLIVERI, P.; FABRIS, S.; MALEGORI, C.; DANIELE, S. Fast determination of extra-virgin olive oil acidity by voltammetry and Partial Least Squares regression. **Analytica Chimica Acta**, v. 1056, p.7-15, 2019.
- BALDO, M. A. ; OLIVERI, P.; SIMONETTI, R.; DANIELE, S. A novel electroanalytical approach based on the use of a room temperature ionic liquid for the determination of olive oil acidity. **Talanta**, v. 161, p.881-887, 2016.
- BALESTEROS, M.R.; TAVARES, M.F.; RIBEIRO, S.J.; POLACHINI, F.C.; MESSADDEQ, Y.; OLIVEIRA M.A. Determination of olive oil acidity by CE. **Electrophoresis**, v. 28, n. 20, p. 3731-3736, 2007.
- BARAZANI, O.; DAG, A.; DUNSETH, Z. The history of olive cultivation in the southern Levant. **Front. Plant Science**, 2023.
- BENDINI, A.; CERRETANI, L.; SALVADOR, M.D.; FREGAPANE, G.; LERCKER, G.; Stability of the sensory quality of virgin olive oil during storage: an overview. **Italian Journal of Food Science**, n. 4, vol. 21, 2009.
- BIESALSKI, H.-K.; DRAGSTED, L.O.; ELMADFA, I.; GROSSKLAUS, R.; MÜLLER, M.; SCHRENK, D.; WALTER, P.; WEBER, P. Bioactive compounds: definition and assessment of activity, **Nutrition**, v. 25, n. 11–12, p. 1202–1205, 2009.
- BOSKOU, D. **Olive oil: chemistry and technology**. Champaign: AOCS, p. 101-120, 1996.
- BOSKOU, D. Olive Fruit, Table Olives, and Olive Oil Bioactive Constituents. **Olive and Olive Oil Bioactive Constituents**, p. 1–30, 2015.

CAPANNESI, C.; PALCHETTI, I.; MASCINI, M.; PARENTI, A. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. **Food Chemistry**, v.71(4), p.553-562, 2000.

CAPONIO, F.; GOMES, T. Influence of olive crushing temperature on phenols in olive oils. **European Food Research and Technology**, v. 212, p.156–159, 2001.

CAPONIO, F.; GOMES, T.; SUMMO, C.; PASQUALONE, A. Influence of the type of olive-crusher used on the quality of extra virgin olive oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, p. 201–206, 2003.

CARRANÇA, Thais. Por que preço do azeite de oliva é recorde e não deve cair. **BBC News Brasil**, São Paulo, 21 agosto 2023. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/articles/cx8ger2e22no>. Acesso em 10 jan. 2024.

CARRIÓN, Y.; NTINO, M.; BADAL, E. *Olea europaea* L. in the North Mediterranean basin during the Pleni-Glacial and the Early-Middle Holocene. **Quaternary Science reviews**, v.29(7–8), p. 952-968, 2010.

CARPENTER, R. P.; LYON, D. H.; HASDELL, T. A. Centro de informação do azeite. **InfoAzeite**, 2021. Disponível em: <http://www.infoazeite.net>. Acesso em: 1 abr. 2021.

CARVALHO, T. C. L., NUNES, C. A. Smartphone-based method for the determination of chlorophyll and carotenoid contents in olive and avocado oils: An approach with calibration transfer. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 104, 2021.

CHAIYASIT W.; ELIAS, R. J.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 299-317, 2007.

CODEX ALIMENTARIUS INTERNATIONAL FOOD STANDARDS. Standard for edible fats and oils not covered by individual standards. CXS 19-1981. Amended in 2021.

COUTINHO, E. F.; WREGGE, M. S.; REISSER JÚNIOR, C.; De ALMEIDA, I. R.; STEINMETZ, S. **Cultivo de oliveira (Olea europaeaL.): clima**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 125p., 2009

CHRISTODOULEAS, D.C., FOTAKIS, C., NIKOKAVOURA, A. Modified DPPH and ABTS Assays to Assess the Antioxidant Profile of Untreated Oils. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 1294–1302, 2015.

DAIS P.; HATZAKIS, E. Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 765, p. 1-27, 2013. Di GIOVACCHINO, L. Technological Aspects. In: Aparicio, R., Harwood, J. (eds) **Handbook of Olive Oil**. Boston, Springer, 2013

Di GIOVACCHINO, L.; MUCCIARELLA, M. R.; COSTANTINI, N.; FERRANTE,

M.L.; SURRICCHIO, G. Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.79, p. 339, 2002.

DINIZ, P. H. G. D. Chemometrics-assisted color histogram-based analytical systems. **Journal of Chemometrics**, v. 34, n. 12, p. 1-27, 2020.

ELDIN, A. K. **Methods to determine the extent of lipid oxidation in foods**. In: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications, Woodhead Publishing, p 181-195, 2010.

El-KHOLY, M. l'olivicultura in egitto: cenni storici. in: **olivae rivista ufficiale del consiglio oleicolo internazionale**. n 127, 2022

FAN, Y.; LI, J.; GUO, Y.; XIE, L.; ZHANG G. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171 (108829), 2021.

FERNANDES, G. M. et al. Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1135, p. 187-203, 2020.

FIRDAUS, M. L. et al. Determination of Chromium and Iron Using Digital Image-based Colorimetry. **Procedia Environmental Sciences**, v. 20, p. 298-304, 2014.

FOOD AGRICULTURE AND ORGANIZATION - Statistical Yearbook World Food and Agriculture 2020. Disponível em <https://www.fao.org/3/cb1329en/online/cb1329en.html>. Acesso em 23 agosto 2023.

GARRIDO-VARO, A.; SÁNCHEZ, M.; HABA, M.D.; TORRES, I.; PÉREZ-MARÍN D. Fast, low-cost and non-destructive physico-chemical analysis of virgin olive oils using near-infrared reflectance spectroscopy. **Sensors**, v. 17, n. 11, p. 2642, 2017.

GAZELI O.; BELLOU, E.; STEFAS, D.; COURIS, S. Laser-based classification of olive oils assisted by machine learning. **Food Chemistry**, v. 302, 2020.

GOPHOTONICS. What is Colorimetry? 2022 Disponível em: <https://www.gophotonics.com/community/what-is-colorimetry>. Acesso em: 13 novembro 2023.

GONÇALVES, E. D.; OLIVEIRA, A. F; da SILVA, L. F. O.; ROMBALDI, C. V.; PEREIRA, L. V.; MOURA, P. H. A. Aspectos agronômicos que influenciam na elaboração de azeite de oliva de qualidade. **Informe Agropecuário**, v. 85, n. 282, p. 13-21, 2014.

GROSSI, M.; LECCE, G.D.; TOSCHI, T.G.; RICCO B. Fast and accurate determination of olive oil acidity by electrochemical impedance spectroscopy IEEE **Sensors Journal**, v.14, n. 9, p. 2947-2954, 2014.

GROSSI, M.; PALAGANO, R.; BENDINI, A.; RICCÒ, B.; SERVILI, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L.; TOSCHI, T. G. Design and in-house validation of a portable system

for the determination of free acidity in virgin olive oil. **Food Control**, v.104, p. 208-216, 2019.

GUILLÈN, M.D.; RUIZ, A. High resolution ¹H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. **Trends in Food Science and Technology**, v.12, p. 328–338, 2001.

GUNSTONE, F. D. Composition and Properties of Edible Oils. In: Hamm, W., Hamilton, R. J., & Calliauw, D. G. (Eds.), In: **Edible Oil Processing** (pp 1-39) John Wiley & Sons Ltd, 2013.

HAKONEN, A.; BEVES, J. E. Hue parameter fluorescence identification of edible oils with a smartphone. **ACS Sensors**, v. 3, n. 10, p. 2061–2065, 2018.

IBRAHEEM, N. A.; HASAN, M. M.; KHAN, R. Z.; MISHRA, P. K. Understanding color models: a review. **ARPN Journal of Science and Technology**, v. 2 (3), p. 265–275, 2012.

IBRAOLIVA – Instituto Brasileiro de Olivicultura. Disponível em <https://www.ibraoliva.com.br>. Acesso em: 09 novembro de 2023.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO **Instrução Normativa Nº 1, de 30 de janeiro de 2012**. Disponível em: http://www.azeiteonline.com.br/wpcontent/uploads/2012/02/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-1-DE-30-DE-JANEIRO-DE2012_MAPA.pdf. Acesso em: 17 junho 2023.

IOC DETERMINATION OF FREE FATTY ACIDS, COLD METHOD. IOC/T.20/Doc. No 34/Rev. 1, 2017.

IOC DETERMINATION OF PEROXIDE VALUE. IOC/T.20/Doc. No 35/Rev.1 2017.

IOC WORLD OLIVE OIL AND TABLE OLIVE FIGURES, 2023. Disponível em <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>. Acesso em: 01 novembro 2023.

IOC – Designations and Definitions of olive oil, 2022. Disponível em <https://www.internationaloliveoil.org/olive-world/olive-oil/>. Acesso em: 01 novembro 2023.

JIANG, S.; XIE, Y.; LI, M.; GUO, Y.; CHENG, Y.; QIAN, H.; YAO W. Evaluation on the oxidative stability of edible oil by electron spin resonance spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 309, 2020.

JORGE, N. **Química e Tecnologia de Óleos Vegetais**. São Paulo: Ed. Cultura Acadêmica, 2009.

KALOGIANNI, E. P.; GEORGIU, D.; HASANOV, J. H. OLIVE OIL PROCESSING: Current Knowledge, Literature Gaps, and Future Perspectives. **J Am Oil Chem Soc**, v. 96, p. 481-507, 2019.

KAPELLAKIS, I. E.; TSAGARAKIS, K.; CROWTHER, J. Olive oil history, production and by-product management. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 7. P.1-26, 2007.

KARAGIORGOS, N.; NENADIS, N.; TRYPIDIS, D.; SIOZIOS, K.; SISKOS, S.; NIKOLAIDIS, S.; TSIMIDOU, M. Z. **An approach for estimating adulteration of virgin olive oil with soybean oil using image analysis**. In: 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON MODERN CIRCUITS AND SYSTEMS TECHNOLOGIES (MOCASST), 2017, Thessaloniki. **Anais [...]**, Thessaloniki: IEEE, p. 1-4, 2017.

KURELLIS, A. **The Technology of Olive Oil Production in the Island of Lesvos in Antiquity**. Prefecture of Lesvos, p 148, 2005.

KIRITSAKIS, A.; MARKAKIS, P.; SCRENCE, F. Olive Oil : A Review. **Advances in Food Research**, v. 31, p. 453-482, 1978.

KOUTSAFTAKIS, A.; KOTSIFAKI, F.; PAPAMANOLILOUDAKI, A.; STEFANOUDAKI, E. Effect of olive crushing parameters on the qualitative characteristics of virgin olive oil. **Acta Horticulturae**, v. 586, p. 645–648, 2002.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p. 71–88, 2002.

LEÃO, A. C.; SOUZA, L. A. C.; ARAÚJO, A. A. Gerenciamento de cores – ferramenta fundamental para a documentação de bens culturais. **Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação**, v. 1, n. 4, p. 215-220, 2007.

LUACES, P.; ROMERO, C; GUTIERREZ, F.; SANZ, C.; PEREZ, A. G. Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2721–2727, 2007.

MASELLA, P.; PARENTI, A.; SPUGNOLI, P.; CALAMAI, L. Influence of vertical centrifugation on extra virgin olive oil quality. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p.1137–1140, 2009.

MCCLEMENTS, D.J.; DECKER E.A. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1270-1282, 2000.

MEDEIROS, D. M.; HAMPTON, M. Olive Oil and Health Benefits. **Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods**. 3rd Edition, 2019.

MEHTA, B. M.; DARJI, V. B.; APARNATHI, K. D. Comparison of five analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized ghee. **Food Chemistry**, v. 185, p. 449–453, 2015.

MESQUITA, D. L.; ANDRADE, H. C. C. Panorama Internacional do mercado de azeite de oliva e a experiência de produção do azeite brasileiro. **Informe Agropecuário**, v. 35, p.7-12, 2014.

MILANEZ, K. D. T. M.; PONTES, M. J. C. Classification of edible vegetable oil using digital image and pattern recognition techniques. **Microchemical Journal**, v. 113, p. 10–16, 2014.

MIN, D. B.; BOFF J. M. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 2, p. 58-72, 2002

MORAIS, C. L. M. & LIMA, K. M. G. Determination and analytical validation of creatinine content in serum using image analysis by multivariate transfer calibration procedures. **Analytical Methods**, v. 7, p. 6904-6910, 2015.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.7, p. 57–66, 2002.

MUSEO DELL'OLIVO. La Collezione Archeologica. Disponível em: <http://http://www.museodellolivo.com/i-tesori>. Acesso em: 10 nov. 2023.

MUSEU DO AZEITE BOBADELA. Disponível em:<https://museudoazeite.com/cantinho-da-ciencia/?lang=em>. Acesso em: 10 nov. 2023.

NAWAR, W.W. **Lipids**. In: Fennema, O.R., Ed., Food Chemistry, Marcel Dekker, New York, 225-314, 1996.

NELIS, J. L. D.; TSAGKARIS, A. S.; DILLON, M. J.; HAJLSLOVA, J.; ELLIOTT, C. T. Smartphone-based optical assays in the food safety field. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, 115934, 2020.

NIELSEN, S. S. **Food Analysis Laboratory Manual**. Indiana, USA: Springer International Publishing 2017.

NUNES, C.A.; MARINHO, M. T. ; SALEM, R. D. S. . Métodos Analíticos para Avaliação da Qualidade de Óleos e Gorduras. In: Granato, D; Nunes, D.S.. (Org.). **Analises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas**. 1ed.Rio de Janeiro: ElSevier, p. 85-114, 2016.

PLANT PROJECT. **O Brasil no mapa-mundi da Olivicultura: Azeites nacionais conquistam prêmios internacionais e ganham um guia de degustação**. Por Emerson Alves – edição 21. Disponível em: <https://plantproject.com.br/2020/10/o-brasil-no-mapa-mundi-da-olivicultura>. Acesso em: 08 março 2023.

PEAMAROON, N.; JAKMUNEE, J.; MOONRUNGSEE, N. A Simple Colorimetric Procedure for the Determination of Iodine Value of Vegetable Oils Using a Smartphone Camera. **Journal of Analysis and Testing**, 2021.

PENG, B.; CHEN, G.; LI, K.; ZHOU, M.; SHENGGUO, J.; ZHAO, Z. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with digital image colorimetric analysis for detection of total iron in water and food samples. **Food Chemistry**, v. 230, p. 667–672, 2017.

PERCUSSI, L. **Azeite: história, produtores e receitas**. Editora Senac São Paulo, 2019.

PESSOA, K. D.; SUAREZ, W. T.; DOS REIS, M. F.; FRANCO, M. O. K.; MOREIRA, R. P. L.; DOS SANTOS, W. B. A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 310–316, 2017.

PREEDY, V. R.; WATSON, R. R. **Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention**. 2nd edition, London – United Kingdom, 2021.

PRÓ OLIVA Programa Estadual de Desenvolvimento da Olivicultura, 2020. Disponível em: www.agricultura.rs.gov.br/pro-oliva. Acesso em: 25 agosto 2021.

RAMIREZ-TORTOSA J. L. **Chemical composition, types and characterization of olive oil**. In: QUILES, J.L.; RAMIREZ-TORTON, C.; YAQOUB, P. (Ed.) *Olive Oil and Health*. London: CABI, 2006.

REZAZADEH, M.; SEIDI, S.; LID, M.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; YAMINI, Y. The modern role of smartphones in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 548–555, 2019.

RESENDE, L. M. B.; MAGALHÃES, E. J.; NUNES, C. A. Optimization and validation of a smartphone-based method for the determination of total sterols in selected vegetable oils by digital image colorimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 117, 2023.

RILEY, R. Olive oil production on Bronze Age Crete: Nutritional properties, processing methods and storage life of Minoan olive oil **Oxford J. Archaeol.**, v. 21 (1), 2002.

RODA, A.; MICHELINI, E.; ZANGHERI, M.; DI FUSCO, M.; CALABRIA, D.; SIMONI, P. Smartphone-based biosensors: a critical review and perspectives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 317–325, 2016.

ROMAN, M.; FIRMINO, A.; VASQUEZ, M.; CABO, P.; RODRIGUES, N.; PEREIRA, J. A. Contributo para a caracterização do setor olivícola e oleícola do Brasil. **8º Simpósio Nacional de Olivicultura**, Santarém. Livro de Resumos - VIII Simpósio Nacional de Olivicultura, p. 139, 2018.

SALAS, J. J.; SANCHEZ, J.; RAMLI, U. S.; MANAF, A. M.; WILLIAMS, M.; HARWOOD, J. L. Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. **Progress in Lipid Research**, v. 39, p. 151-180, 2000.

SÁNCHEZ-ORTIZ, A.; BEJAOU, M. A.; HERRERA, M. P. A.; MÁRQUEZ, A. J.; MAZA, G. B. Application of oxygen during olive fruit crushing impacts on the characteristics and sensory profile of the virgin olive oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 1018–1029, 2016.

SANMARTIN, C.; VENTURI, F.; SGHERRI, C.; NARI, A.; MACALUSO, M.; FLAMINI, G.; QUARTACCI, M. F.; TAGLIERI, I.; ANDRICH, G.; ZINNAI, A. The effects of packaging and storage temperature on the shelf-life of extra virgin olive oil. **Heliyon**, v. 4 2018.

SANTOS, J. L. O.; LEITE, O. D.; VIEIRA, A. D. M.; JESUS, D. J.; KAMOGAWA, M. Y. Use of a Digital Image in Flow Analysis: Determination of Nitrite and Nitrate in Natural Waters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 70-76, 2015.

SATYARTHI, J.; DARBHA, S.; RATNASAMY, P. Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 391, p. 427-435, 2011.

SERVILI, M.; TATICCHI, A.; ESPOSTO, S.; URBANI, S.; SELVAGGINI, R.; MONTEDORO, G. Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7028–7035, 2007.

SHU, J.; DOLMAN, G.E.; DUAN, J.; QIU, G.; ILYAS, M. Statistical colour models: an automated digital image analysis method for quantification of histological biomarkers. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 15, n. 46, 2016.

SILVA, T. O. **Estudo da Emissão de Aldeídos e outros COV por Óleos de Dendê e Soja em Diferentes Condições, sob Aquecimento a Temperatura de Processos de Fritura**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2007.

SOTO, J.N.; MARTÍNEZ, S.S.; GILA, D.M.; ORTEGA, J.G.; GARCÍA J.G. Fast and reliable determination of virgin olive oil quality by fruit inspection using computer vision. **Sensors**, v. 18, p. 3826, 2018.

SPYROS, A.; PHILIPPIDIS, A.; DAIS, P. Kinetics of diglyceride formation and isomerization in virgin olive oils by employing ³¹P NMR spectroscopy. Formulation of a quantitative measure to assess olive oil storage history. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.2, p. 157-164, 2004.

SURAL, SHAMIK, GANG QIAN AND SAKTI K. PRAMANIK. Segmentation and histogram generation using the HSV color space for image retrieval. **Proceedings International Conference on Image Processing**, 2002.

TEJERO, I. P. T.; ROSA, A. L. T. Potencial da olivicultura no sul do Brasil. **Agropampa**, v. 1, n. 1, p. 114-123, 2020.

VUCANE, S.; SABOVICS, M.; LEITANS, L.; CINKMANIS, I. Smartphone-based colorimetric determination of dpph free radical scavenging activity in vegetable oils In:

26TH ANNUAL INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE "RESEARCH FOR RURAL DEVELOPMENT, 35., 2020, Jelgava. Anais [...], Jelgava: LLU, 2020. p. 106-111.

WAHLEFELD, A. W. **Triglycerides Determination after Enzymatic Hydrolysis**, Editor(s): Hans Ulrich Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)*, Academic Press, p. 1831-1835, 1974.

WSOWICZ, E.; GRAMZA, A.; HES, M.; JELEŃ, H. H.; KORCZAK, J.; MATECKA, M.; MILDNER-SZKUDLARZ, S.; RUDZIŃSKA, M.; SAMOTYJA, U.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. Oxidation of lipids in food. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 13, n. 54, p. 87–100, 2004.

XIE, Y.; JIANG, S.; LI, M.; GUO, Y.; CHENG, Y.; QIAN, H.; YAO, W. Evaluation on the formation of lipid free radicals in the oxidation process of peanut oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 104, p. 24–29, 2019.

YUBERO-SERRANO, E. M., LOPEZ-MORENO, J., GOMEZ-DELGADO, F., & LOPEZ-MIRANDA, J. Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2018.

CAPÍTULO 2 - USO DA COLORIMETRIA POR IMAGEM DIGITAL PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS EM AZEITES DE OLIVA

RESUMO

Azeites de oliva podem ser oxidados pela ação de luz ou calor, gerando produtos responsáveis por alterações nas propriedades sensoriais do óleo, levando à sua depreciação. Os primeiros compostos formados na oxidação do azeite são os hidroperóxidos, que podem ser quantificados pela determinação do índice de peróxidos (IP, meq O₂/Kg). O método padrão para a determinação do IP baseia-se em uma titulação iodométrica, que demanda uma grande quantidade de solventes e pode apresentar imprecisões na detecção do ponto final. Neste capítulo será apresentado um método para determinar o IP em azeites de oliva, baseado na Colorimetria de Imagem Digital. Seis padrões de calibração foram preparados a partir de soluções de peróxido de hidrogênio e, após reação com iodeto de potássio, foram obtidas imagens digitais dos padrões usando a câmera de um smartphone. Os parâmetros de cor dos sistemas RGB, HSV, CMYK, L*a*b* ou XYZ foram calibrados contra as quantidades de meq O₂ nos padrões. Um conjunto teste de 43 amostras de azeites de oliva foi utilizado para validação, com base no método titulométrico. Foram obtidos valores de RMSE e R² de 3,29 meq O₂/kg e 0,97, utilizando M do sistema de cores CMYK como sinal analítico. A quantidade de reagentes consumidos no método proposto foi reduzida em aproximadamente 98 % em comparação com o método titulométrico. Os resultados desta pesquisa foram acrescidos de dados de outros óleos vegetais e publicados no periódico *Journal of Food Composition and Analysis* (DOI 10.1016/j.jfca.2022.104724).

Palavras-chave: Lipídios. Oxidação. Smartphone. Hidroperóxidos. Índice de Peróxidos

1 INTRODUÇÃO

Azeites de oliva são constituídos essencialmente por triacilgliceróis, formados por três ácidos graxos ligados ao glicerol. Os principais ácidos graxos presentes no azeite são os ácidos: oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolênico (C18:3), palmítico (C16:0), palmitoleico (16:1) e esteárico (C18:0) (FONSECA E GUTIERREZ, 1974). As duplas ligações dos ácidos graxos insaturados presentes no azeite são susceptíveis a reações de oxidação, que podem ocorrer durante a extração e armazenamento, gerando produtos responsáveis pela perda de qualidade do óleo.

A primeira etapa da oxidação lipídica produz hidroperóxidos, compostos instáveis que, após serem formados, sofrem clivagem homolítica dando origem aos radicais peroxil, alcóxido e hidroxila. Esses radicais reagem entre si e com o oxigênio para formar aldeídos, cetonas e outras moléculas tóxicas e sensorialmente desagradáveis (WSOWICZ et al., 2004), comprometendo a qualidade e a segurança do azeite de oliva. Além disso, a oxidação consome os ácidos graxos insaturados, associados às propriedades nutricionais do azeite, o que também compromete a qualidade nutricional do produto.

O índice de peróxidos (IP) é normalmente utilizado para avaliar a oxidação inicial em azeites de oliva. Um método padrão para a determinação do IP em azeites de oliva é descrito pela IOC (2017), e baseia-se em uma titulação, que mede a concentração iodo libertado do iodeto de potássio devido à reação com os hidroperóxidos presentes na amostra de óleo (IOC, 2017). No entanto, a precisão desse método depende de fatores que envolvem a possível dificuldade do analista em detectar o ponto final da titulação. Além disso, os óleos são solúveis apenas em solventes orgânicos, e a alta demanda desses reagentes impacta o custo e toxicidade da análise.

Para contornar as desvantagens inerentes ao método titulométrico para a determinação do IP em azeites de oliva, este capítulo apresenta um método alternativo, baseado na Colorimetria por Imagem Digital (CID), usando a câmera de um smartphone. Nessa abordagem, o peróxido de hidrogênio presente em soluções padrões reagiu com KI formando soluções coloridas, cuja intensidade da cor variou conforme a concentração de peróxido. Essas soluções foram fotografadas e os valores das componentes dos sistemas de cores da Região de Interesse (ROI, do inglês *Region of Interest*) das imagens digitais foram empregados como sinal analítico para a construção de curvas analíticas. Esses

modelos foram usados para prever o IP de 43 amostras de azeites de oliva, tendo como base comparativa os resultados obtidos pelo método de titulométrico. A proposta buscou simplificar o método titulométrico para determinação do IP, substituindo a etapa de titulação pelo uso de um dispositivo barato e acessível, tornando a análise não subjetiva e reduzindo o tempo de análise, reagentes utilizados e resíduos gerados no processo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram analisadas amostras de azeites de oliva de diferentes marcas, sendo 7 extravirgens (Andorinha, La Rambla Olivenza, Fátima e Quinta da Boa Vista), e 1 azeite de oliva composto (Maria). Misturas dessas amostras com óleos de diferentes IPs foram usadas para expandir a faixa estudada, resultando em 43 diferentes amostras.

2.2 Preparo e análise dos padrões e das amostras de azeites de oliva

Primeiramente, seis padrões de calibração contendo soluções aquosas de peróxido de hidrogênio 30 % (Êxodo Científica), em diferentes concentrações, foram usados para a construção de uma curva analítica. Para cada ponto da curva, 0,5 mL de solução padrão foram transferidos para uma cubeta de vidro de 1 cm, e solubilizados em 1,2 mL de ácido acético. Em seguida, 0,1 mL de solução saturada de KI foram adicionados para a reação colorimétrica e a mistura foi vigorosamente agitada e colocada ao abrigo de luz durante 1 minuto. Após esse intervalo, a solução resultante assumiu uma coloração castanha. A cubeta foi então posicionada em um mini estúdio (Figura 1) para a obtenção das imagens digitais. Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações utilizadas para o preparo dos padrões de calibração.

Tabela 1 – Concentrações usadas para a construção dos padrões de calibração.

	H ₂ O ₂ (mmol.L ⁻¹)*	H ₂ O ₂ (mmol na cubeta)	meq O ₂ em 1.8 mL	meq O ₂ em 1.3 mL
1	0,2515	1,258 x 10 ⁻⁴	2,515 x 10 ⁻⁴	1,816 x 10 ⁻⁴
2	4,078	2,039 x 10 ⁻³	4,078 x 10 ⁻³	2,945 x 10 ⁻³
3	7,702	3,851 x 10 ⁻³	7,702 x 10 ⁻³	5,563 x 10 ⁻³
4	10,874	5,437 x 10 ⁻³	1,087 x 10 ⁻²	7,853 x 10 ⁻³
5	13,819	6,910 x 10 ⁻³	1,382 x 10 ⁻²	9,980 x 10 ⁻³
6	16,991	8,496 x 10 ⁻³	1,699 x 10 ⁻²	1,227 x 10 ⁻²

Nota: * soluções estoque.

Fonte: Da autora (2023).

As amostras foram analisadas pelo mesmo método, substituindo-se a solução padrão por 0,2 g de amostra, que foi solubilizada em 1,2 mL de ácido acético e 0,8 mL de clorofórmio. Após a adição de KI, uma solução bifásica foi formada, o que não aconteceu nos padrões, devido à ausência de clorofórmio. Portanto, os padrões de calibração continham 1,8 mL de uma solução monofásica colorida, enquanto nas amostras somente a fase aquosa (inferior), com 1,3 mL, continha o iodo produzido na reação colorimétrica. Para contornar o efeito da diluição da cor nos padrões, a Equação 1 foi empregada para calcular as quantidades de meq O₂ em 1.3 mL dos padrões, e estes valores foram usados na calibração. As quantidades calculadas são mostradas na Tabela 1.

$$meq O_2(\text{nos padrões}) = \frac{1,3 \times meq O_2(\text{em } 1,8 \text{ mL})}{1,8} \quad (1)$$

Finalmente, o IP das amostras foi calculado por meio da Equação 2, dividindo-se o meq O₂ obtido da curva analítica pela massa de amostra empregada na análise (aproximadamente 0,0002 kg).

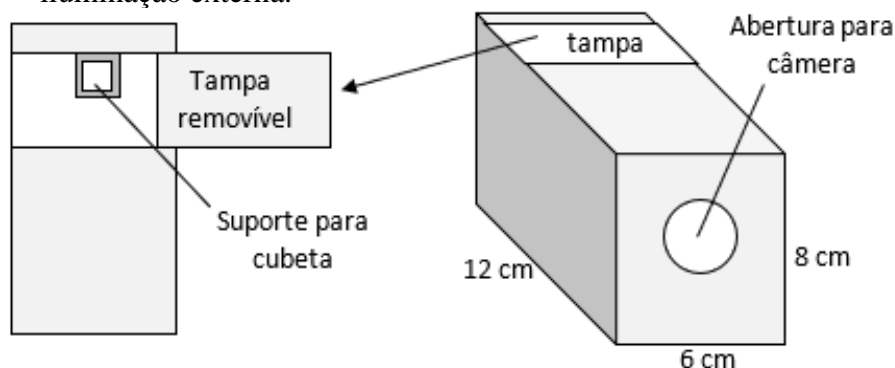
$$IP \left(meq \frac{O_2}{Kg} \right) = \frac{meq O_2}{\text{massa de azeite (Kg)}} \quad (2)$$

Para testar o método CID proposto, as 43 amostras de azeite tiveram seu IP determinado, em duplicata, pelo método titulométrico conforme Nielsen, (2017).

2.3 Aquisição das imagens

A fim de controlar a iluminação, que poderia interferir nas análises, as imagens digitais foram obtidas em um mini estúdio similar ao ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Mini estúdio usado na aquisição das imagens digitais sem a interferência de iluminação externa.



Fonte: Adaptado de De Carvalho, et al. (2021).

Esse aparato foi revestido externamente com papel cartão e internamente com acetato de etileno-vinila (EVA) branco, com dimensões de 6 cm × 12 cm × 8 cm (largura × comprimento × altura). Um suporte para cubeta, feito do mesmo material, foi posicionado no interior do mini estúdio e centralizado na parte inferior. Uma tampa removível garantiu a facilidade na troca das amostras e o bloqueio da luminosidade externa.

Um smartphone Moto C Plus 7.0 com uma câmara de 8 MP ($f/2.2$, $1.12 \mu\text{m}$), resolução de 3264×2448 pixels e distância focal de 3,50 mm foi posicionado no exterior do mini estúdio e encaixado em uma abertura de 2 cm de diâmetro, de modo que a câmera permanecesse à distância fixa de 8,5 cm da amostra.

A iluminação interna correspondeu apenas ao *flash* da câmera. Para a captura das imagens, foram selecionadas as opções de foco fixo, balanço de branco e modo de imagem única. Para fins de padronização, essas configurações foram mantidas durante todas as análises dos padrões e amostras. As imagens digitais foram salvas em formato JPEG e posteriormente decompostas nas componentes de cor dos sistemas RGB, HSV, CMYK, $L^*a^*b^*$, e XYZ, com o auxílio do aplicativo Color Picker®. Os procedimentos

foram realizados em duplicata e a média aritmética dos valores das componentes de cor usadas como descritores para as calibrações.

2.4 Análise estatística

Os valores das componentes dos sistemas de cores foram calibrados contra as quantidades de meq O₂ nos padrões, usando regressão por mínimos quadrados. A qualidade das curvas analíticas foi avaliada pelo RMSE e pelo R².

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir do desvio padrão de 15 brancos (dpb), empregando-se as Equações 3 e 4, respectivamente. Os brancos continham o azeite solubilizado em clorofórmio e ácido acético (sem realizar a reação colorimétrica). A curva analítica foi representada por $y = bx + a$, onde y correspondeu à meq O₂ e x à resposta instrumental (componente de cor).

$$LD = 3.3 \times \frac{dpb}{1/a} \quad (3)$$

$$LQ = 10 \times \frac{dpb}{1/a} \quad (4)$$

Os resultados obtidos pelo método titulométrico foram comparados aos resultados obtidos por CID, em termos de meq O₂ e IP. Para a comparação baseada nos valores de meq O₂, o IP foi multiplicado pela massa das amostras (em Kg) e para a comparação baseadas em IP, o meq O₂ obtido pelo método CID foi dividido pela massa da amostra (Equação 2). Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados com base no RMSE e no R², bem como pelo erro médio relativo (EMR). O parâmetro estatístico R²m foi usado para avaliar a congruência entre os valores medidos e preditos pelos modelos. Valores de R²m maiores que 0,5 são considerados aceitáveis (MITRA et al., 2010).

Para prevenir a influência de amostras anômalas durante a predição, as *outliers* foram detectadas e removidas do conjunto pela análise de *leverages* e resíduos de Student, com um limite de ± 2.5 (FOX, 1991).

Todos os cálculos foram realizados com o auxílio dos programas GNU Octave® versão 5.2.0 (EATON et al., 2019), Chemoface® versão 1.64 (NUNES et al., 2012), e Microsoft Excel® versão 2007.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cores apresentadas pelos padrões de calibração após a reação colorimétrica variaram de amarelo acastanhado (para menores valores de meq O₂) a marrom avermelhado (para valores mais altos de meq O₂), conforme Figura 2.

Figura 2 – Escala de cor obtida de acordo com a quantidade de meq O₂ nos padrões de calibração.



Fonte: Adaptada de Anconi, et al. (2022).

Ao contrário dos padrões, as misturas para análise das amostras continham clorofórmio (usado na solubilização do azeite). Para essas amostras, uma mistura bifásica foi formada (Figura 3) após a adição de solução aquosa de KI. O iodo formado, responsável pela mudança de cor da solução, permaneceu solúvel na fase aquosa. Portanto, para as amostras de validação, a fase aquosa (inferior) foi a ROI, da qual as informações de cor foram obtidas.

Figura 3 – Solução bifásica formada após a reação do KI com os hidroperóxidos presentes na amostra de azeite. O quadrado verde corresponde à ROI usada para a obtenção dos parâmetros de cor das imagens.



Fonte: Adaptada de Anconi, et al. (2022).

Nos sistemas colorimétricos, cada uma das componentes contém apenas uma fração da informação que resulta na coloração final do objeto de estudo. Deste modo, é de extrema importância uma seleção adequada da componente que melhor se correlaciona com a concentração do analito. O estudo da linearidade entre meq O₂ nos padrões e os valores correspondentes às informações de cor dos sistemas colorimétricos avaliados é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Estudo da linearidade das componentes dos sistemas de cores RGB, HSV, CMYK, L*a*b* e XYZ.

Componente de cor	R ²
R	0,85
G	0,99
B	0,47
H	0,98
S	0,47
V	0,81
M	0,98
Y	0,47
K	0,81
L*	0,99
a*	0,96
b*	0,63
X	0,98
Y	0,94
Z	0,74

Nota: Não houve variação para os valores da componente C do sistema de cor CMYK.

Fonte: Da autora (2023).

Os dados apresentados na Tabela 2 evidenciam a alta correlação linear entre meq O₂ nos padrões e os valores das componentes G de RGB, H de HSV, M de CMYK, L* e a* de L*a*b*, X e Y de XYZ ($R^2 \geq 0.90$). Portanto, essas componentes foram consideradas as mais adequadas para serem usadas como descritores na construção dos modelos de calibração para a determinação de meq O₂.

Para compreender a variação observada entre as componentes de cor e a quantidade de meq O₂ nos padrões de calibração, é necessário compreender o significado físico de cada componente, bem como sua variação nos padrões (Tabela 3). Neste contexto, deve-se considerar que, quando a luz branca incide sobre a amostra, uma parte da radiação é absorvida e outra parte é refletida, sendo a última captada pela câmera do smartphone.

Tabela 3 – Valores das componentes de cor obtidas para os padrões de calibração.

Padrão	Componente de cor								
	R	G	B	H	M	L*	a*	X	Y
1	159	157	51	59	1	63	-13	27	32
2	164	126	0	46	23	55	5	23	23
3	157	99	0	38	37	47	17	18	16
4	151	82	0	33	46	42	25	16	13
5	147	68	0	28	54	38	31	14	10
6	140	51	0	22	64	34	36	12	8

Fonte: Da autora (2023).

Como visto na Figura 2, a cor da solução formada após a adição de KI variou de amarelo castanho ao marrom avermelhado. De acordo com a Tabela 3, tais colorações foram formadas pela reflexão de R (vermelho) e G (verde), sendo que a intensidade de R e G nos padrões variou de forma inversamente proporcional à concentração de peróxido. Embora R tenha tido a maior contribuição na formação da cor (os valores da componente R foram maiores), a componente G sofreu a maior variação, o que justifica sua maior correlação com a concentração de peróxido. Por outro lado, o parâmetro B permaneceu praticamente nulo, mostrando que azul absorvido, não sendo, portanto, detectada pela câmera do smartphone.

No sistema CMYK, a componente M (magenta) é formada pelas cores primárias vermelho e azul, e sua cor secundária (complementar) é verde. Isso justifica a variação negativa de G (RGB) e a simultânea variação positiva de M com o aumento do teor de peróxido nos padrões. Além disso, como praticamente não houve variação de B (RGB), correspondente à cor azul, o aumento do parâmetro M também pode estar relacionado à reflexão do vermelho. Em conjunto, essas considerações suportam a melhor descrição da cor produzida na reação pela componente M.

Os valores da componente H (tonalidade) variaram de 59° (amarelado) a 22° (avermelhado), do padrão mais diluído para o mais concentrado. Essas tonalidades correspondem à variação de cor mostrada na Figura 2, o que justifica a alta linearidade dessa componente com a concentração de peróxido nos padrões.

Apesar da excelente linearidade de L* com o teor de peróxido, essa componente varia em escala de cinza e sozinha é insuficiente para descrever a variação de cor dos padrões, o que pode explicar o baixo desempenho do modelo obtido a partir dessa componente (Tabela 3). Contudo, a diminuição de seus valores justifica-se pelo

escurecimento das soluções (em uma imagem em escala de cinza). Já o parâmetro a^* varia de valores negativos (verde) a positivos (vermelho) (LEÃO et al., 2007). Logo, o aumento de a^* indica um aumento da proporção de vermelho na formação da cor, o que é consistente com a mudança de cor nos padrões.

No sistema XYZ, Y está relacionado ao brilho de uma cor (Fernandes et al., 2020). Assim, justifica-se que seus valores variem de forma inversamente proporcional ao teor de peróxidos nos padrões, cuja menor luminosidade (numa imagem em escala de cinza) pode estar relacionada com o aumento da intensidade da cor. Por outro lado, a componente X, em combinação com Y, pode descrever variações de cor de amarelado a avermelhado (IBRAHEEM et al., 2012). No entanto, isoladamente essas componentes não conseguiram produzir modelos com boa qualidade, provavelmente devido à sua interdependência na descrição da variação da cor.

De fato, como mostrado na Tabela 4, as curvas analíticas obtidas a partir das componentes de cor selecionadas (G, H, M, L^* , a^* , X e Y) tiveram um excelente ajuste ao modelo linear, com R^2 variando de 0,94 a 0,99 e RMSE de 0,00044 a 0,001 meq O_2 .

Tabela 4 – Desempenho dos modelos descritos pelas componentes de cor com R^2 de calibração $\geq 0,90$ na determinação de meq O_2 nas amostras de azeite.

		G	H	M	L^*	a^*	X	Y
Curva analítica	RMSE	0,00047	0,00062	0,00063	0,00044	0,00080	0,00065	0,001
	R^2	0,99	0,98	0,98	0,99	0,96	0,98	0,94
Amostras de teste	RMSE	0,0022	0,00071	0,00069	0,0037	0,0016	0,0052	0,003
	R^2	0,84	0,96	0,97	0,77	0,92	0,68	0,74
	R^2_m	0,62	0,90	0,91	0,58	0,88	0,28	0,29
	EMR (%)	34,30	11,07	10,76	57,69	24,95	81,08	46,78
	N	43	41	41	43	42	43	43

Nota: RMSE é expresso em meq O_2 ; N: número de amostras usadas para validar o modelo após remoção de outliers.

Fonte: Da autora (2023).

Considerando a análise das amostras de teste, os resultados da Tabela 4 indicam ainda uma boa qualidade para os modelos nos quais as componentes H, M e a^* foram usadas como descritores, com R^2 de 0,96, 0,97 e 0,92, respectivamente. Para esses modelos, o RMSE variou de 0,00069 a 0,0016 meq O_2 . Os modelos construídos a partir das componentes H e M tiveram um desempenho muito semelhante, com RMSE de 0,00071 e 0,00069 meq O_2 e R^2 de 0,96 e 0,97, respectivamente. Entretanto, dentre os

dois modelos, o melhor desempenho foi obtido pelo emprego da componente M do sistema CMYK, que teve o maior valor de R^2 e menor RMSE, representando um EMR de 10,76 %. Além disso, o alto valor do parâmetro R^2_m (0,91) para esse modelo atestou uma boa congruência entre os valores determinados pelo método proposto e pelo método titulométrico.

Os modelos obtidos a partir das componentes L^* , X, e Y tiveram os piores desempenhos na determinação do meq O_2 nas amostras, com valores de EMR superiores a 46 %, baixos R^2 (0,77, 0,68, e 0,74, respectivamente) e ausência de congruência entre os valores medidos e determinados, principalmente para os modelos X e Y (R^2_m de 0,28 e 0,29, respectivamente). Assim, essas componentes de cor foram consideradas inadequadas para a determinação de meq O_2 em amostras de azeite de oliva.

Embora o sistema de cor RGB seja o mais usado na literatura especializada, o modelo obtido a partir da componente G não apresentou o melhor desempenho na determinação, com R^2 de 0,84 e alto valor de RMSE (0,0022 meq O_2), o que representou um EMR de 34,30 %. Ainda assim, devido a seu grande destaque na literatura, esse modelo foi avaliado na etapa seguinte, a fim de se confirmar sua baixa qualidade comparada aos demais modelos selecionados.

Na etapa seguinte, a fim de validar o método proposto, os valores de meq O_2 determinados pelos modelos desenvolvidos foram convertidos em IP (de acordo com a Equação 2) e comparados com o IP determinado pelo método titulométrico. A faixa avaliada foi de 4,3 a 63,6 meq O_2 /kg. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Desempenho dos modelos de calibração na determinação do IP em azeites de oliva.

	G	H	M	a^*
RMSE	9,94	3,96	3,29	7,40
R^2	0,84	0,96	0,97	0,92
R^2_m	0,90	0,98	0,98	0,94
EMR (%)	32,63	11,27	11,02	24,88

Nota: RMSE é expresso em meq O_2 /kg.

Fonte: Da autora (2023).

A análise dos dados da Tabela 5 evidencia a baixa correlação entre os valores de IP medidos e determinados pelo modelo baseado na componente G, o que pode ser inferido pelo menor valor de R^2 (0,84), maior valor de RMSE (9,94 meq O_2 /kg) e maior

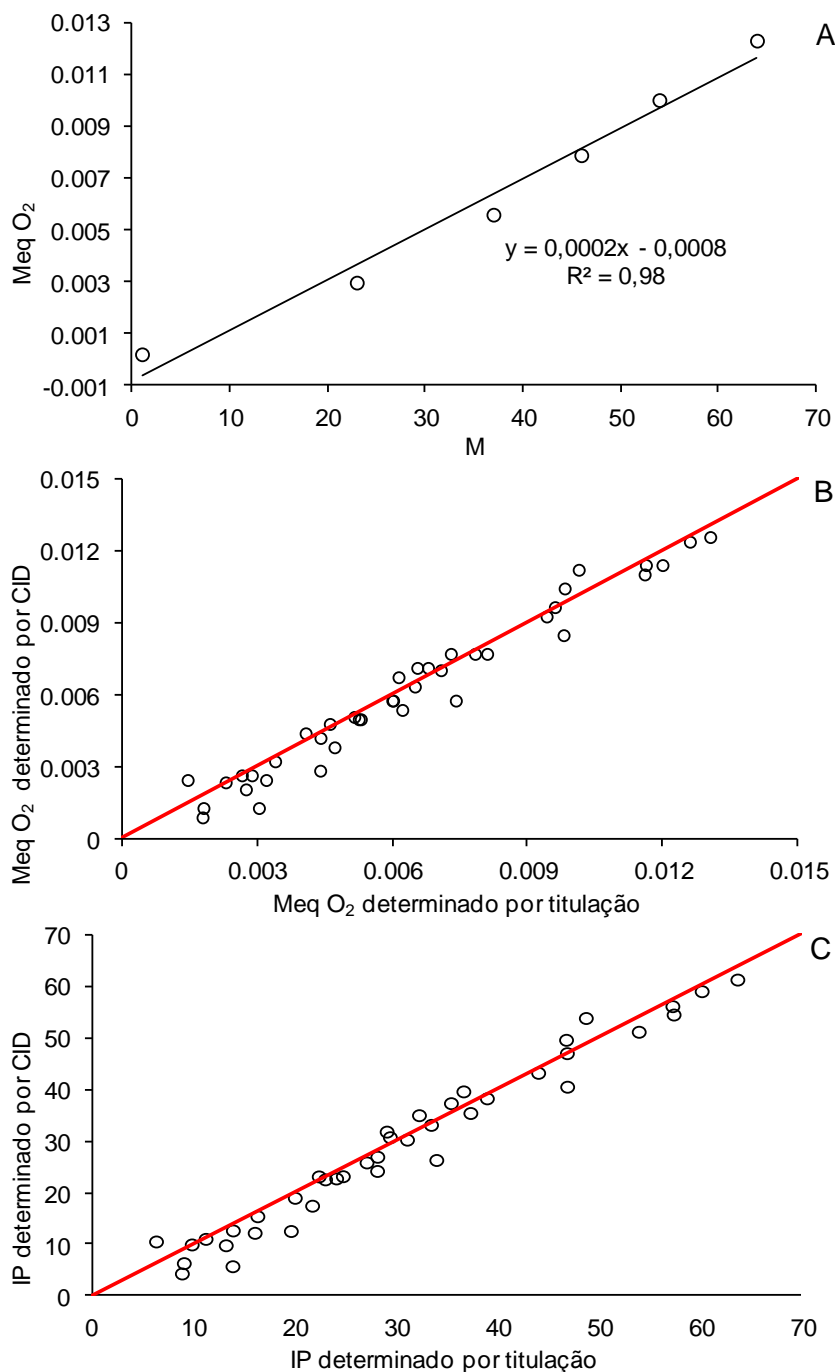
EMR (32,63 %). Portanto, a componente G do sistema RGB não é adequada para descrever a variação cor das soluções usadas na determinação do IP em amostras de azeite de oliva.

O parâmetro a^* também apresentou um baixo desempenho na determinação do IP das amostras, com RMSE de 7,40 meq O₂/kg, produzindo um EMR de aproximadamente 25 %.

No entanto, excelentes resultados foram obtidos para modelos construídos a partir das componentes H e M, que tiveram desempenho similar. Ambos os modelos mostraram uma alta linearidade, com valores de R^2 de 0,98. Contudo, o modelo baseado na componente M teve os menores erros na determinação do IP (RMSE de 3,29 meq O₂/kg e EMR de 11,02 %). Além disso, uma excelente congruência entre os valores medidos e determinados foi observada ($R^2_m = 0,98$). O modelo também apresentou baixos LD e LQ (0,00017 e 0,00050 meq O₂, respectivamente). Portanto, a componente M do sistema de cor CMYK foi considerada a mais indicada para ser usada como descritor na determinação do IP em amostras de azeite de oliva pelo método proposto, embora a componente H possa fornecer uma qualidade semelhante.

As representações gráficas da curva analítica, bem como da comparação do meq O₂ e do IP determinados por titulação e pelo método DIC são mostradas na Figura 4.

Figura 4 - Curva analítica baseada na componente M do sistema CMYK (A) e comparação gráfica entre meq O₂ (B) e IP (C) das amostras de azeite de oliva determinados por CID e por titulação.



Fonte: Da autora (2023).

Singkhonrat e coautores (2019), reportaram o monitoramento da peroxidação lipídica pelo método Fenton usando imagens digitais, e obtiveram resultados comparáveis aos obtidos neste trabalho. Os autores encontraram uma boa correlação (R^2

= 0,98) entre o método proposto e o método UV-Vis. O procedimento também se mostrou menos dispendioso e produziu uma quantidade menor de resíduos químicos, em comparação com o método de referência (SINGKHORAT et. al, 2019).

Finalmente, o emprego do método CID possibilitou uma drástica redução do tempo de análise e da quantidade de reagentes empregada, em comparação ao método titulométrico. O último demanda uma mistura de 10 mL de clorofórmio e 15 mL de ácido acético, além de 0,5 mL de solução saturada de KI, 30 mL de água, 0,5 mL de solução de amido e volumes variáveis de solução de tiosulfato de sódio. Já o primeiro, teve esses volumes consideravelmente reduzidos ou zerados (Tabela 6), o que representou uma redução de aproximadamente 98 %, considerando todos os reagentes (exceto a solução de tiosulfato de sódio).

Tabela 6 – Comparação entre a quantidade de reagentes empregados no método titulométrico e no método CID para a determinação do IP em azeite de oliva.

Reagente	Titulação (ml)	CID (ml)
Ácido acético	15	1,2
Clorofórmio	10	0,8
Solução de KI	1	0,1
Água	75	0
Solução de amido	1	0
Tiosulfato de sódio	variável	0
Total (exceto tiosulfato de sódio)	102	2.1

Fonte: Da autora (2023).

4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostraram que o IP de azeites de oliva pode ser fácil e rapidamente determinado por CID usando um smartphone como ferramenta para a obtenção das imagens digitais.

A componente M do sistema CMYK forneceu o melhor sinal analítico para a calibração, com limites de detecção e quantificação de 0,00017 e 0,00050 meq O₂, respectivamente. Testes com amostras de azeite confirmaram o bom desempenho do método proposto, o qual forneceu resultados muito similares aos obtidos pelo método titulométrico normalmente empregado. Além disso, o método proposto reduziu o tempo de análise, o consumo de reagentes e a geração de resíduos químicos, em

aproximadamente 98 %, tornando o processo mais econômico e menos prejudicial ao meio ambiente.

Por fim, a simplicidade e o baixo custo dos procedimentos permitem que essa abordagem seja utilizada como uma alternativa para a determinação do IP em laboratórios e indústrias, sendo necessário um baixo investimento em equipamentos. Além disso, o método proposto padronizou a análise, eliminando a subjetividade do analista ao substituir a titulação pela análise de dados de imagens digitais.

Os resultados desta pesquisa foram acrescidos de dados de outros óleos vegetais e publicados em 2022 no periódico *Journal of Food Composition and Analysis* (DOI 10.1016/j.jfca.2022.104724).

REFERÊNCIAS

- ANCONI, A. C. S. A.; BRITO, N. C. S.; NUNES, C. A. Determination of peroxide value in edible oils based on Digital Image Colorimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.113, 2022.
- EATON, J.W.; BATEMAN, D.; HAUBERG, S.; WEHBRING, R. **GNU Octave** Version 5.2.0 Manual: A High-level Interactive Language for Numerical Computations. Samurai Media Limited, 2019.
- FONSECA, H.; GUTIERREZ, L. E. Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais. **An. Esc. Super. Agric. Luiz Queiroz** 31, 485–490, 1974.
- FOX, J. **Regression Diagnostics**. Newberry Park, CA: Sage, 1991.
- IBRAHEEM, N. A.; HASAN, M. M.; KHAN, R. Z.; MISHRA, P. K. Understanding color models: a review. **ARPN Journal of Science and Technology**, v. 2 (3), p. 265–275, 2012.
- IOC DETERMINATION OF PEROXIDE VALUE. IOC/T.20/Doc. No 35/Rev.1 2017.
- LEÃO, A. C.; SOUZA, L. A. C.; ARAÚJO, A. A. Gerenciamento de cores – ferramenta fundamental para a documentação de bens culturais. **Revista Brasileira de Arqueometria Restauração e Conservação**, v. 1 (4), p. 215–220, 2007.
- MITRA, I.; SAHA, A.; ROY, K. Exploring quantitative structure-activity relationship studies of antioxidant phenolic compounds obtained from traditional Chinese medicinal plants. **Molecular Simulation**, v. 36, p. 1067–1079, 2010.
- NIELSEN, S. S. **Food Analysis Laboratory Manual**. Indiana, USA: Springer International Publishing, 2017.
- SINGKHORAT, J.; SRIPRAI, A.; HIRUNWATTHANAKASEM, S.; ANGKURATIPAKORN, T.; PREECHABURANA, P. Digital image colorimetric analysis for evaluating lipid oxidation in oils and its emulsion. **Food Chemistry**, v. 286, p. 703–709, 2019.
- WSOWICZ, E.; GRAMZA, A.; HES, M.; JELEN, H.H.; KORCZAK, J.; MATECKA, M.; MILDNERSZKUDLARZ, S.; RUDZINSKA, M.; SAMOTYJA, U.; ZAWIRSKA WOJTASIAK, R. Oxidation of lipids in food. **Journal of Food and Nutricional Science**, v. 13 (54), p. 87–100, 2004.

CAPÍTULO 3 - USO DA COLORIMETRIA POR IMAGEM DIGITAL PARA A DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ LIVRE EM AZEITES DE OLIVA

RESUMO

Azeites de oliva estão sujeitos à reação de hidrólise, que resulta na liberação de ácidos graxos no óleo, ocasionando o aumento da acidez. A extensão da hidrólise pode ser mensurada pela acidez livre (AL), um dos parâmetros químicos de qualidade e classificação do azeite. Um método padrão para a determinação da AL em azeites consiste na titulação volumétrica alcalina que, apesar da baixa complexidade analítica, é susceptível a erros na determinação do ponto final e requer uma grande quantidade de solventes orgânicos para a solubilização das amostras. Neste capítulo é apresentado um método baseado na Colorimetria por Imagem Digital (CID) utilizando uma câmera de smartphone para determinar a AL em azeites de oliva. O método empregou a calibração por adição de padrão usando acetato cúprico para produzir uma reação colorimétrica. As imagens digitais das soluções coloridas foram utilizadas para a obtenção dos valores das componentes de cor do sistema RGB, que foram calibrados contra os respectivos valores de AL nos padrões. A AL das amostras foi determinada por extrapolação das curvas. Por fim, os resultados foram comparados com os valores de AL medidos pelo método titulométrico. Uma excelente correlação entre os métodos foi observada, com R^2 de 0,98 e RMSE de 0,08 %. Além disso, houve uma redução de aproximadamente 90 % no consumo de reagentes em comparação ao método titulométrico. Os resultados desta pesquisa foram acrescidos de dados obtidos para outros óleos vegetais, e publicados no periódico *Food Chemistry* (DOI 10.1016/j.foodchem.2024.138555).

Palavras-chave: Índice de Acidez. Rancidez Hidrolítica. Smartphone. Lipídio

1 INTRODUÇÃO

Azeites de oliva são compostos majoritariamente por triacilgliceróis, que consistem em uma molécula de glicerol unida a três ácidos graxos por ligações éster (GUNSTONE, 2013). Essas moléculas estão sujeitas à hidrólise, que pode ser iniciada por agentes químicos (ácidos e bases) ou enzimas naturalmente presentes nas azeitonas (MURTY et al., 2002; JORGE, 2009).

A hidrólise rompe a ligação éster dos triacilgliceróis e libera glicerol e ácidos graxos, iniciando o processo de degradação gradual do óleo (BOSKOU, 2015). Esse processo, apesar de não alterar as características sensoriais do azeite, promove alterações químicas que impactam sua qualidade e classificação.

A extensão da hidrólise pode ser expressa pela acidez livre (AL), ou grau de acidez, que mede a porcentagem em massa de ácido oleico (principal ácido graxo presente no azeite) em 100 g de óleo. A AL é um dos parâmetros químicos de qualidade e classificação dos azeites (GAZELI et al., 2020). De acordo com as normas do Conselho Oleícola Internacional (*International Olive Council – IOC*), o azeite extravirgem deve apresentar AL menor que 0,8 % (IOC, 2017). Já para os azeites virgens e refinados esse valor não deve ultrapassar 2 % e 0,3 %, respectivamente (CODEX ALIMENTARIUS, 2021).

Um método padrão para medir a AL em azeites de oliva baseia-se na titulação alcalina volumétrica (IOC, 2017), que consiste na neutralização dos ácidos graxos livres na amostra de óleo através da solubilização com uma mistura de solventes, seguida da titulação com hidróxido de potássio. No entanto, apesar da técnica ser de execução simples e requerer equipamentos de baixo custo, uma grande quantidade de solventes é empregada. Outra desvantagem está na subjetividade do analista na detecção do ponto final da titulação, o que pode comprometer a precisão.

Estudos recentes mostraram que a Colorimetria por Imagem Digital (CID), associada à smartphones, é uma técnica promissora para determinar a qualidade de azeites de oliva e outros óleos vegetais. Alguns exemplos descrevem o emprego da abordagem CID na predição dos níveis de carotenoides e clorofilas (De CARVALHO; NUNES, 2021), na determinação do índice de peróxidos (ANCONI et al., 2022), na determinação do teor de esteróis (RESENDE et al., 2023), na predição do teor de óleo de soja em misturas de azeite de oliva e abacate (de CARVALHO et al., 2023), na

detecção e quantificação da adulteração em azeite (SONG et al., 2020) e na determinação do índice de iodo (PEAMAROON et al., 2021).

Um dos requisitos para o uso da CID reside na necessidade de a amostra exibir cor ou existir uma reação colorimétrica que gere um derivado do analito cuja cor varie com sua concentração. Estudos anteriores demonstraram a formação de complexos do grupo carboxilato com íons cobre (Cu (II)) (NORDIN et al., 2015), resultantes da reação colorimétrica entre o acetato cúprico e os ácidos graxos livres em sementes (BAINS et al., 1964) e óleos vegetais (BAKER, 1964; LOWRY e TINSLEY, 1976). Esse complexo é solúvel em alguns solventes orgânicos, como o hexano, e sua presença nestes solventes leva ao desenvolvimento de uma coloração azul. Além disso, o pH da solução de cobre influencia a formação do complexo, a solubilidade e a intensidade da cor, com resultados ótimos em pH 6 (LOWRY e TINSLEY, 1976).

Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento de um método analítico para a determinação da AL em amostras de azeite de oliva, empregando-se a abordagem CID e um smartphone para a obtenção das imagens digitais. A hipótese é de que a cor produzida na reação apresentada acima varie proporcionalmente com AL das amostras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

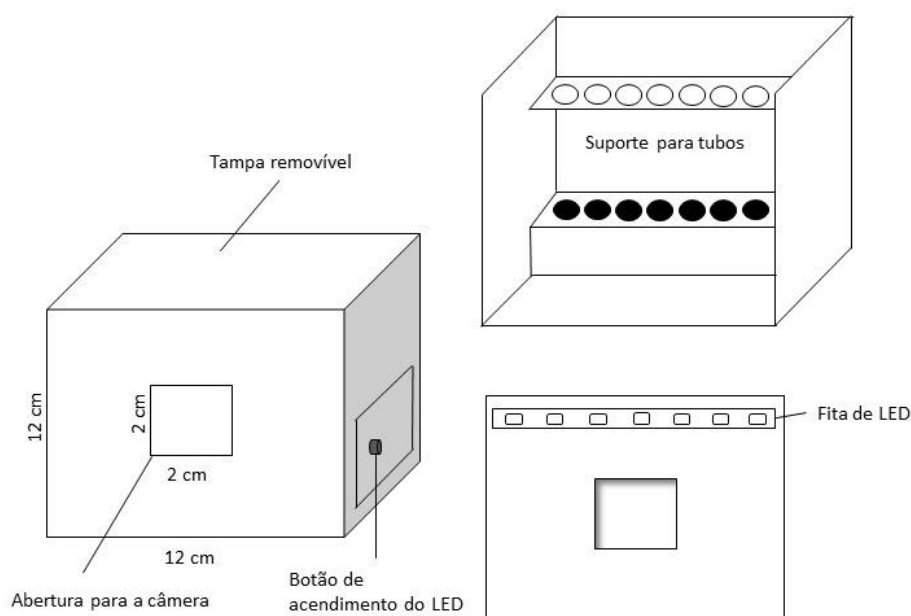
Para avaliar o método proposto, foram utilizadas amostras de azeites de oliva de diferentes marcas: 9 azeites extravirgens (2 Andorinha, 1 La Rambla, 1 Olivenza, 1 Fátima e 1 Quinta da Boa Vista, 1 Irarema, 1 Fazenda Herdade e 1 Serras Altas), 1 óleo composto de azeite e óleo de soja (Maria) e 5 misturas destas amostras para ampliar a faixa estudada.

2.2 Determinação da AL pelo método CID

O método CID baseia-se na obtenção de imagens digitais de uma reação colorimétrica, e na utilização de seus parâmetros de cor como resposta analítica. Nesta pesquisa, uma reação colorimétrica foi produzida utilizando acetato cúprico, que reagiu

com os ácidos graxos livres nas amostras de azeite. Devido às diferenças de coloração das matrizes (alguns azeites são esverdeados enquanto outros são amarelados), o método de calibração por adição padrão foi utilizado. Uma solução de ácido oleico 3 % (Synth) em hexano (Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão. Em três tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 g de amostra de azeite e quantidades variadas da solução padrão, a fim de se obter as concentrações de 0,0 %, 1,0 % e 2,0 % de ácido oleico (Tabela 1). As misturas foram solubilizadas com hexano até o volume final de 2,5 mL e homogeneizadas em um agitador vortex. Em seguida, 0,5 mL de uma solução aquosa de acetato cúprico 5 % foi utilizada como cromóforo. O pH dessa solução foi ajustado para 6,0 com piridina (Synth). Após a adição do acetato cúprico e vigorosa agitação, as misturas resultantes tornaram-se bifásicas. Finalmente, um branco foi preparado adicionando-se a um tubo de ensaio 0,5 g de óleo solubilizados em 2 mL de hexano e 0,5 mL de água no lugar da solução de acetato cúprico. Os tubos contendo o branco e os padrões de calibração foram posicionados em um mini estúdio (Figura 1) para a aquisição simultânea das imagens digitais.

Figura 1 – Mini estúdio usado na aquisição das imagens para a determinação da AL em azeites.



Fonte: Da autora (2023).

2.3 Aquisição das imagens digitais

As imagens digitais foram adquiridas em um mini estúdio (Figura 1) revestido externamente com papel cartão e internamente com EVA, com dimensões de 12 cm × 12 cm × 12 cm (largura × comprimento × altura). Um suporte para tubos de ensaio, feito de EVA e policarbonato transparente, foi posicionado na parte interior do mini estúdio. Uma tampa removível garantiu a troca das amostras e o bloqueio da luminosidade externa. A iluminação interna foi obtida com 7 LEDs (5 V, 0,56 W, 6500 K). Um orifício com 2 x 2 cm foi utilizado para posicionar externamente o smartphone, de forma que este se mantivesse alinhado com o suporte para tubos e a 11 cm de distância das amostras.

As imagens foram capturadas pela câmera de um smartphone Samsung Galaxy A32 (f/1,8, resolução de 10120 x 6328 pixels - 64 MP, distância focal de 26 mm). Foram selecionadas as configurações de foco fixo, *flash-off*, balanço de branco e modo de imagem única. Para fins de padronização do procedimento, essa configuração foi mantida para fotografar todas as amostras e padrões. A aquisição das imagens foi realizada em triplicata, com iluminação ambiente (mini estúdio aberto) e iluminação controlada (mini estúdio fechado). Em seguida, as imagens digitais foram salvas em formato JPEG e o aplicativo gratuito Color Picker® foi utilizado para decompor as imagens no sistema de cor RGB. Os dados foram transferidos para um computador e processados em planilhas do Excel.

2.4 Determinação da AL em azeites de oliva pelo método titulométrico

O método padrão para a determinação da AL em azeite de oliva consiste na solubilização da amostra em mistura de éter etílico e etanol, e posterior titulação para a neutralização dos ácidos graxos livres, empregando-se fenolftaleína como indicador (IOC, 2017). O resultado é expresso em percentagem de ácido oleico por 100 g de óleo (NIELSEN, 2017). Os resultados deste método foram utilizados para validar a AL determinada pelo método CID proposto.

2.5 Análise estatística

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o desempenho de cada parâmetro de cor na determinação da AL em amostras de azeite de oliva. Assim, obtidos os parâmetros de cor R, G e B, as médias aritméticas (das triplicatas) dos valores de cada uma das componentes foram calculadas e calibradas por regressão linear contra os respectivos valores de AL nos padrões (0,0 %, 1,0 % e 2,0 %). Foram testados dados brutos e pré-tratados com base na absorvância da componente de cor, de acordo com a Equação 1 (KUNTZLEMAN e JACOBSON, 2016).

$$V_c = \log\left(\frac{V_{branco}}{V_{amostra}}\right) \quad (1)$$

Onde V_c é o valor da componente (R, G ou B) transformado pela absorvância, V_{branco} é o valor da componente de cor em uma região vazia do tubo de ensaio e $V_{amostra}$ é o valor da componente de cor na ROI.

As curvas de calibração foram representadas pela equação geral $y = ax + b$, sendo y a resposta instrumental (valor da componente de cor) e x a AL nos padrões. Em seguida, a AL das amostras foi calculada por extrapolação das curvas, de acordo com a Equação 2, onde y foi substituído pelo valor da componente de cor do branco de cada amostra.

$$AL(\%) = x = \frac{y-b}{a} \quad (2)$$

Os valores de AL determinados pelo método CID foram comparados com os respectivos valores de AL determinados por titulação, com base no coeficiente de determinação (R^2) e na raiz do erro quadrático médio (*root mean square error*, RMSE), a fim de se determinar a componente mais adequada para descrever a variação de cor nos padrões, ou seja, o valor de R, G ou B que forneceria maiores valores de R^2 e menores valores de RMSE.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir do desvio padrão de 14 ensaios do branco (*dpb*), de acordo com as Equações 3 e 4. O branco foi consistiu em uma solução contendo 2,5 mL de hexano e 0,5 mL de

acetato cúprico.

$$LD = 3.3 \times \frac{dpb}{a} \quad (3)$$

$$LQ = 10 \times \frac{dpb}{a} \quad (4)$$

A repetibilidade ($n = 10$) foi avaliada pelo mesmo analista no mesmo dia (resultados intra-ensaio). A precisão foi expressa como em termos do desvio padrão relativo (% DPR).

A exatidão (Equação 5) foi calculada utilizando o mesmo conjunto de dados empregando-se a média experimental obtida pelo método CID (x_{exp}) e a média obtida pelo método titulométrico (x_{ref}):

$$Exatidão = \frac{x_{exp}}{x_{ref}} \times 100 \quad (5)$$

A robustez foi avaliada comparando-se diferentes condições de luminosidade no momento da aquisição das imagens, ou seja, iluminação não controlada (mini estúdio aberto) e de iluminação padronizada (mini estúdio fechado).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro desafio na execução do método CID proposto foi encontrar uma reação colorimétrica na qual a intensidade da cor do produto variasse linearmente com a concentração de ácidos graxos livres nas amostras. Estudos anteriores mostraram a formação de complexos do grupo carboxilato com íons Cu (II) (NORDIN et al., 2015), bem como uma reação colorimétrica entre ácidos graxos livres e acetato cúprico em sementes (BAINS et al., 1964) e óleos vegetais (BAKER, 1964; LOWRY e TINSLEY, 1976).

A determinação colorimétrica de ácidos graxos baseada em acetato cúprico apresentou alta sensibilidade e reprodutibilidade, com altos coeficientes de correlação ($R^2 > 0,97$) entre a cor produzida e a concentração dos principais ácidos presentes no azeite de oliva: palmítico, esteárico e oleico (KWON e RHEE, 1986). Nesta reação, a

cor se desenvolve em aproximadamente 2 minutos, e é estável por pelo menos 60 minutos (MARCENO et al., 1998). Além disso, apenas os ácidos graxos livres formam o complexo com o acetato cúprico. Assim, o desenvolvimento da cor não é influenciado por mono-, di- e triacilgliceróis, ou por outro lipídeo (LOWRY e TINSLEY, 1976).

O complexo formado na reação colorimétrica é solúvel em alguns solventes orgânicos, como o hexano. Além disso, foi comprovado que o pH da solução de cobre influencia a formação do complexo, sua solubilidade e a intensidade da cor, com resultados ótimos sendo obtidos em pH 6 (LOWRY e TINSLEY, 1976). Assim, neste estudo, a solução de cobre foi empregada na reação colorimétrica e seu pH foi ajustado para 6 utilizando piridina.

Para fornecer um método mais rápido e reduzir o consumo de reagentes, foram utilizadas curvas de adição de padrão com três padrões de calibração. Giannoulas e coautores (2019) usaram uma abordagem parecida realizando ensaios colorimétricos quantitativos, em dispositivos analíticos, com apenas um ponto de calibração (GIANNOULAS et al., 2019). Assim, as amostras de azeite contendo 0 %, 1,0 % e 2,0 % de ácido oleico foram inicialmente tratadas com uma solução de acetato cúprico. As quantidades de cada reagente nos padrões são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Quantidade de amostra e reagentes utilizados nos padrões de calibração.

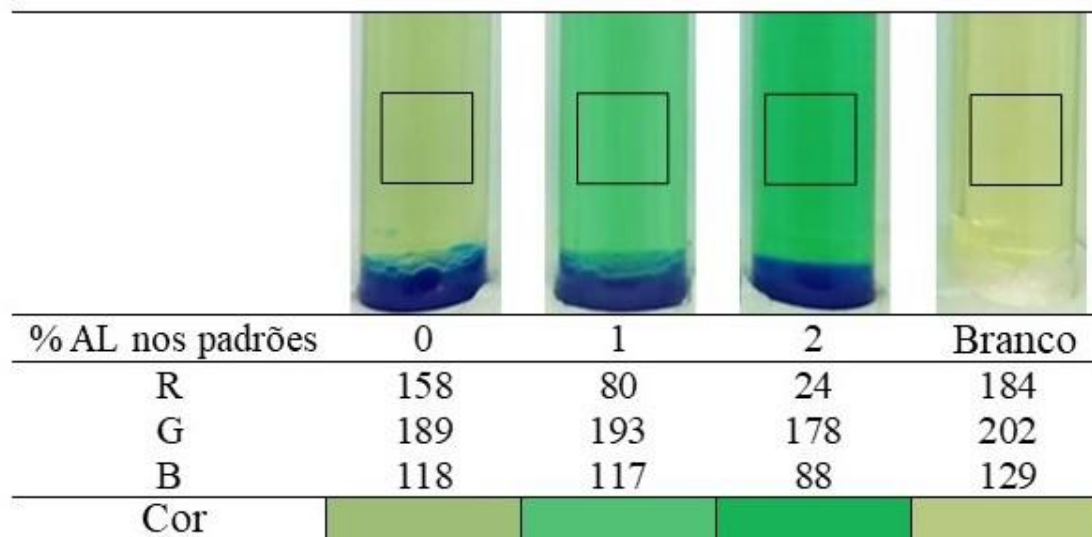
Padrão	Azeite (g)	Sol. Padrão (g)	Hexano (mL)	Acetato Cúprico (mL)
0,0 %	0,50	-	2,00	0,50
1,0 %	0,50	0,1667	1,76	0,50
2,0 %	0,50	0,3340	1,52	0,50
Branco	0,50	-	2,00	0,50 (água)

Nota: Os volumes de hexano adicionados foram calculados considerando a densidade da solução padrão (0,69 g/mL) para obter o mesmo volume final de 2,5 mL em todos os tubos de ensaio.

Fonte: Da autora (2023).

Após a adição da solução aquosa de acetado cúprico às soluções contendo hexano, foram formados sistemas bifásicos. As fases superiores apresentam uma coloração azul-esverdeada (contendo os complexos em hexano) e as fases inferiores continham o excesso de solução aquosa de cobre (Figura 2).

Figura 2 – Exemplo de uma imagem digital das soluções formadas após a reação colorimétrica dos padrões de 0,0 %, 1,0 % e 2,0 % (da esquerda para a direita) de ácido oleico em azeite de oliva. O branco é o último tubo de ensaio. O quadrado é a ROI utilizada para obter os valores das componentes de cor.



Fonte: Da autora (2023).

A formação da cor envolve a absorção e a reflexão da luz, sendo que uma câmara de smartphone pode captar a luz refletida. Nas fases apolares (hexano), o verde e o azul foram as cores refletidas (Figura 2), enquanto o vermelho foi absorvido. A variação de cor dessas soluções também dependeu fortemente da aparência do azeite analisado. Os azeites de oliva podem apresentar uma coloração mais amarelada ou mais esverdeada, levando a variações na cor das fases apolares após reação com a solução azul de cobre. Devido a essas variações, o procedimento de calibração externa não foi capaz de contornar os efeitos da matriz, rica em pigmentos tais como clorofilas e carotenoides. Desta forma, a calibração por adição de padrão foi mais adequada para determinar o AL nas amostras de azeite pelo método CID, a fim de se manter o baixo custo e a simplicidade da análise.

Conforme visto na Figura 2, foi notável a variação da coloração com o aumento do teor de ácido oleico (da esquerda para a direita) nos padrões. Além disso, cada componente de um sistema de cor contém apenas uma fração da informação que descreve a cor final e, portanto, pode ter uma correlação diferente com a resposta de interesse. Deste modo, a avaliação da correlação das componentes de cor isoladas com a concentração do analito é crucial para estabelecer o melhor descritor para a resposta de interesse. Assim, os valores das componentes RGB isoladamente foram calibrados

contra a AL experimental nos padrões a fim de encontrar a mais adequada.

As calibrações foram realizadas a partir de dados brutos e transformados conforme Equação 1. O pré-tratamento de dados é utilizado em CID para corrigir efeitos adversos durante a aquisição das imagens, tais como diferenças de iluminação e sombra (KRIG, 2016). Neste trabalho, o pré-tratamento de dados aplicado converteu os valores das componentes de cor em valores equivalentes à absorbância, com base na análise do branco (Equação 1). Assim, foi considerada a razão entre o fluxo luminoso incidente no tubo de ensaio e o refletido pela amostra (KUNTZLEMAN e JACOBSON, 2016).

O desempenho dos modelos obtidos a partir das componentes de cor R, G e B, para as 15 amostras analisadas, foram comparados com os resultados obtidos pelo método titulométrico, como mostrado na Tabela 2.

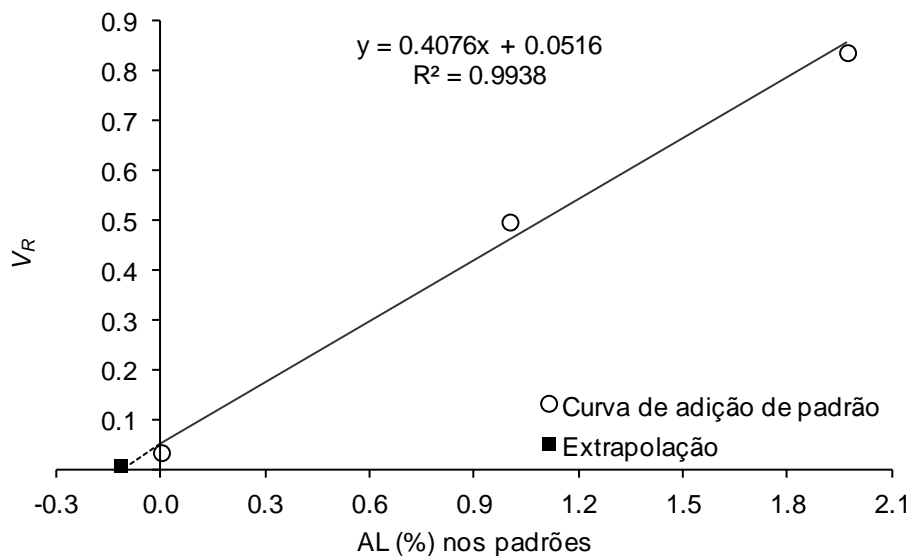
Tabela 2 – Coeficiente de determinação (R^2) e RMSE para a determinação de AL pelo método CID comparado ao método titulométrico.

Componente de cor	Sem Pré-tratamento		Com Pré-tratamento	
	R^2	RMSE (%)	R^2	RMSE (%)
R	0,98	1,14	0,99	0,08
G	0,22	1,29	0,33	2,60
B	0,28	0,54	0,19	0,87

Fonte: Da autora (2023).

Conforme Tabela 2, dados brutos (sem pré-tratamento) forneceram curvas com erros relativamente elevados. As curvas baseadas nas componentes G e B também apresentaram baixa linearidade (baixos valores de R^2) e, portanto, tiveram os piores desempenhos. No entanto, a curva baseada em R apresentou um alto coeficiente de determinação para os dados brutos ($R^2 = 0,98$) e pré-tratados ($R^2 = 0,99$), indicando uma excelente correlação linear entre os valores medidos pelos dois métodos. Entretanto, ao converter o valor de R no respectivo valor equivalente à absorbância, o RMSE foi drasticamente reduzido (de 1,14 % para 0,08 %). Assim, o valor equivalente à absorbância para R (V_R) foi considerado mais adequado para descrever a variação de cor nos padrões e determinar a AL nas amostras de azeite. Um exemplo de curva de adição padrão, baseada em V_R , é apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Exemplo de uma curva de adição de padrão usada para determinar a AL nas amostras de azeite de oliva baseada nos valores da componente R após pré-tratamento dos dados (V_R).



Fonte: Da autora (2023).

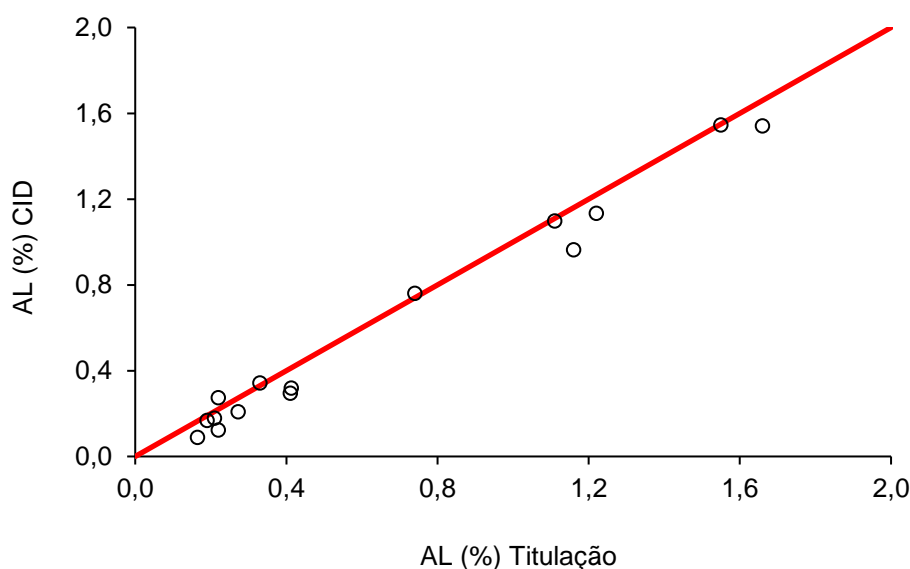
O complexo de cobre é responsável pelo desenvolvimento da cor nas soluções e sua formação depende da disponibilidade de ácidos graxos livres. Como os íons cobre encontram-se em excesso na solução, a intensidade da cor desenvolvida depende apenas dos ácidos graxos e varia proporcionalmente à concentração destes. Além disso, parte da luz branca que incide sobre a amostra é absorvida e parte é refletida. A câmera do smartphone capta a luz refletida, cujo comprimento de onda no espectro visível corresponde ao das cores visualizadas. Essa cor capturada é então decomposta nos parâmetros do sistema de cores RGB, e o desempenho de cada parâmetro pode ser entendido analisando sua variação nos padrões de calibração.

No sistema RGB, vermelho (R), verde (G) e azul (B) são consideradas cores primárias, e as demais cores são formadas por sua combinação linear (FIRDAUS et al., 2014). De acordo com a Figura 2, a variação de cor dos padrões foi influenciada pela absorção do vermelho e pela reflexão do verde e do azul. Notavelmente, as componentes B e G apresentaram pequenas variações, indicando que o azul e o verde foram responsáveis pela formação da cor visualizada. Embora o vermelho tenha contribuído minimamente para a cor refletida, sua absorção influenciou fortemente a variação da cor nos padrões, o que foi demonstrado pela maior variação da componente R, com o aumento da concentração de ácido oleico. A variação negativa dessa componente indica

que o vermelho foi intensamente absorvido. Além disso, com base nos dados da Tabela 2, uma variação numérica mais ampla observada para a componente R foi essencial para o excelente desempenho da calibração baseada nessa componente.

A comparação gráfica dos valores de AL determinados pelos métodos CID e titulométrico, nas 15 amostras analisadas, é apresentada na Figura 4. A elevada congruência entre os valores de AL das amostras revela uma excelente correlação entre os valores obtidos pelos dois métodos.

Figura 4 – Correlação do AL em azeites de oliva determinado pelo método CID e pelo método titulométrico.



Fonte: Da autora (2023).

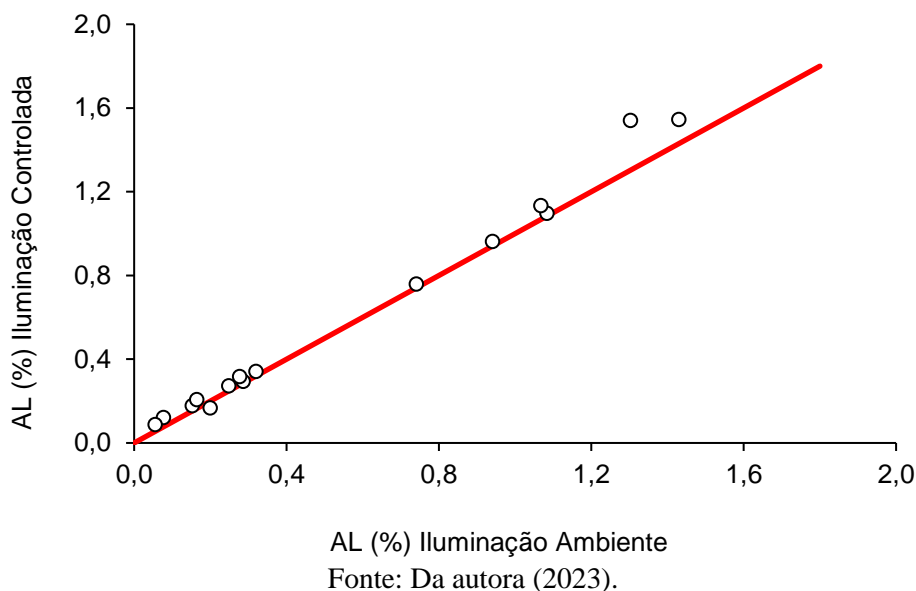
Figuras de mérito como exatidão, precisão, LD e LQ foram calculados para avaliar a qualidade do método proposto. Neste sentido, o método CID apresentou um excelente desempenho, com exatidão de 98,43 % e precisão (DPR) de 1,92 % (média, considerando os 15 casos estudados). Esses resultados estão de acordo com os critérios estabelecidos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), cujos limites recomendados na faixa de concentração entre 0,10 e 1,0 % para o DPR são de 3,7 e 2,7 %, respetivamente, e para a exatidão, de 95 a 105 % e 97 a 103 %, respetivamente (TAVERNIERS et al., 2004).

Os valores estimados de LD e LQ para o método CID foram de 0,033 % e 0,098 % respetivamente. Esses valores são considerados aceitáveis, uma vez que o valor mais baixo de AL nas amostras de azeite foi de 0,16 %. Os resultados desta pesquisa são

comparáveis aos obtidos por Grossi e coautores (2019), que determinaram a AL por condutância elétrica, encontrando LD e LQ de 0,02 % e 0,07 % respectivamente (GROSSI et al., 2019). Assim, considerando as figuras de mérito de validação determinadas, o método CID proposto pode ser considerado promissor para a determinação da AL em azeites de oliva.

A robustez do método foi avaliada considerando-se variações na iluminação. A análise foi efetuada sob iluminação não controlada (mini estúdio aberto) e controlada (mini estúdio fechado). Considerando-se os 15 casos estudados, obtiveram-se valores R^2 de 0,97 e RMSE de 0,14 %, na comparação entre o método CID e o método de referência sob iluminação não controlada, enquanto valores de R^2 de 0,99 e RMSE de 0,08 % foram obtidos sob condição de iluminação controlada. Assim, o controle da luminosidade proporcionado pelo mini estúdio melhorou ligeiramente a linearidade e o erro. Além disso, uma comparação gráfica (Figura 5) mostrou uma alta correlação ($R^2 = 0,99$) entre os resultados obtidos com iluminação controlada e não controlada. Portanto, o efeito da luminosidade foi negligenciável, atestando a robustez do método proposto.

Figura 5 – Comparação gráfica entre AL determinada pelo método CID sob iluminação não controlada (mini-estúdio aberto) e controlada (mini-estúdio fechado).



É importante ressaltar que o processamento e o armazenamento inadequados do azeite de oliva levam a alterações nos valores de AL, implicando na perda da qualidade e comprometendo a segurança alimentar do óleo. Isso ocorre porque os ácidos graxos livres liberados na hidrólise são fortes pró-oxidantes e, ao serem oxidados, produzem

moléculas que alteram as características sensoriais do óleo, podendo gerar, ainda, produtos tóxicos. Nesse sentido, o método DIC proposto é simples e econômico, sendo útil para garantir a qualidade e segurança dos óleos vegetais, garantindo características funcionais e sensoriais, de acordo com a legislação vigente e discussões metabolômicas recentes (LI et al., 2021).

Finalmente, o método CID proposto para determinar a AL em azeites de oliva teve uma grande vantagem em termos de economia de reagentes e redução da quantidade de resíduos gerados na análise. Conforme observado na Tabela 3, enquanto o método titulométrico requer aproximadamente 100 mL de uma mistura de éter e etanol, 0,1 mL de fenolftaleína e volumes variáveis de solução alcalina, o método CID exigiu apenas cerca de 10 mL de reagentes, sendo mais econômico e reduzindo a geração de resíduos em cerca de 90 %.

Tabela 3 – Comparação entre os volumes de reagentes gastos nos métodos titulométrico e CID.

Reagente	Titulação (ml)	Método CID (ml)
Éter/Etanol	50 a 100	0
Fenolftaleína	0,1	0
Hidróxido de Potássio	2+	0
Hexano	0	~ 8
Ácido Oleico	0	0,7
Acetato Cúprico	0	1,5
Total	~ 102	~ 10

Fonte: Da autora (2023).

4 CONCLUSÃO

O método CID proposto pode ser utilizado na determinação da AL em azeites de oliva. O valor equivalente à absorvância baseada no valor da componente R do sistema de cor RGB forneceu um excelente sinal analítico para determinar a AL das amostras. Tal abordagem analítica forneceu resultados para AL altamente congruentes com aqueles obtidos pelo método de referência.

A precisão e a exatidão calculadas estão em conformidade com as diretrizes de validação, e os limites de detecção e quantificação foram inferiores à acidez livre normalmente encontrada em amostras de azeite. O teste de robustez indicou que as

condições de iluminação não afetaram significativamente os resultados.

Por fim, método mostrou-se mais rápido, prático, econômico e confiável para a determinação da AL em azeite de oliva. A baixa demanda de reagentes químicos reduziu a produção de resíduos, em conformidade com a química analítica verde.

Os resultados desta pesquisa foram acrescidos de dados obtidos para outros óleos vegetais e publicados no periódico *Food Chemistry* (DOI 10.1016/j.foodchem.2024.138555).

REFERÊNCIAS

ANCONI, A. C. S. A.; BRITO, N. C. S.; NUNES, C. A. Determination of peroxide value in edible oils based on Digital Image Colorimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.113, 2022.

BAINS, G. S.; RAO S. V.; BHATIA, D. S. A Colorimetric Procedure for the Estimation of Fat Acidity in Peanuts and Peanut Meals. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 41, 831–832, 1964.

BAKER, D. A Colorimetric Method for Determining Free Fatty Acids in Vegetable Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 41, 1, 21-22, 1964.

CODEX ALIMENTARIUS INTERNATIONAL FOOD STANDARDS. Standard for edible fats and oils not covered by individual standards. CXS 19-1981. Amended in 2021.

IOC DETERMINATION OF FREE FATTY ACIDS, COLD METHOD. IOC/T.20/Doc. No 34/Rev. 1, 2017.

de CARVALHO, I. M.; DA SILVA MUTZ, Y.; MACHADO, A. C. G; De LIMA SANTOS, A. A.; MAGALHÃES, E. J.; NUNES, C. A. Exploring Strategies to Mitigate the Lightness Effect on the Prediction of Soybean Oil Content in Blends of Olive and Avocado Oil Using Smartphone Digital Image Colorimetry. **Foods**, 12, 3436, 2023.

de CARVALHO, T. C. L.; NUNES, C. A. Smartphone-based method for the determination of chlorophyll and carotenoid contents in olive and avocado oils: An approach with calibration transfer. **Journal of Food Composition and Analysis**. 104, 2021.

FIRDAUS, M. L.; ALWI, W.; TRINOVELDI, F.; RAHAYU, I.; RAHMIDAR, L.; WARSITO, K. Determination of Chromium and Iron Using Digital Image-based Colorimetry. **Procedia Environmental Sciences**, 20, 298-304, 2014

GAZELI O.; BELLOU, E.; STEFAS, D.; COURIS, S. Laser-based classification of olive oils assisted by machine learning. **Food Chemistry**, 302, 2020.

GIANNOULAS, G.; TSOGAS, G. Z.; GIOKAS, D. L. Single-point calibration and standard addition assays on calibrant-loaded paper-based analytical devices. **Talanta** 201, 149-155, 2019.

GROSSI, M.; PALAGANO, R.; BENDINI, A.; RICCÒ, B.; SERVILI, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L.; TOSCHI, T. G. Design and in-house validation of a portable system for the determination of free acidity in virgin olive oil. **Food Control**, 104, 208-216, 2019.

GUNSTONE, F. D. Composition and Properties of Edible Oils. In: Hamm, W., Hamilton, R. J., & Calliauw, D. G. (Eds.), **Edible Oil Processing** (pp 1-39) John Wiley & Sons Ltd, 2013.

JORGE, N. **Química e Tecnologia de Óleos Vegetais**. São Paulo: Ed. Cultura Acadêmica, 2009.

KWON, D. Y.; RHEE, J. S. A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 63, 1, 1986.

KRIG, S. Image Pre-Processing. In: **Computer Vision Metrics**. Springer, Cham. P 35-83, 2016.

KUNTZLEMAN, T. S.; JACOBSON, E. C. Teaching Beer's Law and absorption spectrophotometry with a smartphone: a substantially simplified protocol. **Journal of Chemical Education**, 93, 1249–1252, 2016.

LI, S.; TIAN, Y.; JIANG, P.; LIN, Y.; LIU, X.; YANG, H. Recent Advances in the Application of Metabolomics for Food Safety Control and Food Quality Analyses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 61, 9, 2021.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, I. J. Rapid Colorimetric Determination of Free Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 53, 7, 470-472, 1976.

MARCENO, D. W.; INDRATI, R.; OHTA, Y. A. Simplified Method for Determination of Free Fatty Acids for Soluble and Immobilized Lipase Assay. **Indonesian Food and Nutrition Progress**, 5, 2, 1998.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 7, 57–66, 2002.

NORDIN, N.; SAMAD, W. Z.; YUSOP, M. R.; OTHMAN, M. R. Synthesis and characterization of copper(II) carboxylate with palm-based oleic acid by electrochemical technique. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, 19, 236–243. 2015.

PEAMAROON, N.; JAKMUNEE, J.; MOONRUNGSEE, N. A Simple Colorimetric Procedure for the Determination of Iodine Value of Vegetable Oils Using a Smartphone Camera. **Journal of Analysis and Testing**, 5, 379–386, 2021.

RESENDE, L. M. B.; MAGALHÃES, E. J.; NUNES, C. A. Optimization and validation of a smartphone-based method for the determination of total sterols in selected vegetable oils by digital image colorimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, 117, 2023.

SONG, W.; VINCENT, J.; WANG, H.; SONG, Z. Quantification of extra virgin olive oil adulteration using smartphone videos. **Talanta**, 216, 120920, 2020.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends Analytical Chemistry**, 23, 535–552, 2004.