

DETECÇÃO RÁPIDA E SUSTENTÁVEL DE ADULTERAÇÃO EM AZEITE DE OLIVA EXTRAVIRGEM

Thaís V. F. Sudré¹; Beatriz S. M. Bastos²; Ricardo Q. Aucélio²; Rosana C. Macedo¹

¹Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, campus Realengo

²Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

tatafeijoli@gmail.com

Palavras-Chave: Amostras oleosas; sistemas hidroalcoólicos; assinatura espectral.

Introdução

O azeite de oliva extravirgem (AOEV) é reconhecido por seus benefícios à saúde, atribuídos à presença de compostos fenólicos, responsáveis por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas (Jimenez-Lopez et al., 2020). O perfil nutricional, aliado à sua qualidade sensorial e ao baixo rendimento de produção, faz do AOEV um óleo comestível de grande valor comercial e, em contrapartida, o tornam um dos produtos mais suscetíveis à adulteração, sendo a mistura com óleo de soja, a prática mais frequente (Casadei et al., 2021). No contexto brasileiro, essa problemática adquire ainda maior relevância, uma vez que o Brasil figura entre os maiores importadores de azeite de oliva do mundo, não possuindo produção interna suficiente para suprir a demanda nacional. Paralelamente, o país é também o maior produtor mundial de óleo de soja, um insumo de baixo custo e ampla disponibilidade, o que favorece economicamente a prática de adulteração e dificulta a rastreabilidade de fraudes no mercado interno (Barros et al., 2023).

Por conta da complexidade dessas amostras em termos de composição, a detecção de adulterações ainda é um desafio analítico, requerendo o uso de múltiplas técnicas. Métodos cromatográficos (a líquido e a gás), espectroscópicos (como espectroscopia Raman) e de ressonância magnética nuclear têm sido amplamente empregados (Hashempour-Baltork et al., 2024; Lozano-Castellón et al., 2022), mas apresentam fragilidades relacionadas ao alto custo de operação e manutenção, elevados tempos de análise e tratamento matemático complexo dos resultados. Nesse contexto, a espectroscopia de fluorescência pode oferecer vantagens significativas, por sua sensibilidade, seletividade e facilidade de execução. A espectrofluorimetria 3D, em particular, permite gerar padrões de impressão digital únicos, conhecidos como assinaturas espectrais, úteis para o controle de qualidade (Andrade-Eiroa; Canle; Cerdá, 2013). Essa técnica tem sido explorada com sucesso na caracterização de alimentos, bebidas e fármacos, demonstrando grande potencial para diferenciar matrizes complexas por meio da análise de emissão e excitação simultânea de múltiplos fluoróforos naturais. Para matrizes oleosas, no entanto, a aplicação dessa técnica é dificultada pelo risco de contaminação cruzada e pela interferência de cromóforos que reduzem a intensidade do sinal.

Devido às vantagens e, visando contornar as limitações, a utilização de sistemas em microemulsão sem surfactante (SFME, do inglês *surfactant-free microemulsion*) é proposta neste trabalho. As microemulsões são dispersões homogêneas, fluidas e termodinamicamente estáveis formadas por fases imiscíveis, após adição de surfactantes. Quando álcoois de cadeia curta são utilizados para promover a interação das fases, esses sistemas são denominados SFMEs (Hou; Xu, 2016). A formação dessas microemulsões ocorre espontaneamente,

resultando em sistemas transparentes e isotrópicos (Figura 1), nos quais os componentes se organizam em estruturas nanométricas capazes de solubilizar compostos de diferentes polaridades. Considerando a aplicação proposta, as SFMEs podem oferecer vantagens significativas como redução do risco de contaminação cruzada, diminuição do consumo de amostra e aumento da sustentabilidade do método por conta da utilização de água em sua composição. Além disso, a simplicidade do preparo e a ausência de surfactantes sintéticos tornam as SFMEs alternativas promissoras devido à facilidade sem comprometer a sustentabilidade que tem sido uma preocupação crescente na pesquisa científica. Adicionalmente, as SFMEs podem reduzir o efeito do filtro interno, além de contribuir para o aumento da intensidade de fluorescência por meio da redução da liberdade vibracional dos fluoróforos, consequência da formação de agregados pseudo-micelares (Macedo et al, 2023). Dessa forma, a integração da espectrofluorimetria 3D com sistemas SFME representa uma estratégia inovadora e sustentável para a detecção de adulterações em azeite de oliva extravirgem, contribuindo para o fortalecimento das práticas de autenticidade e rastreabilidade no setor alimentício.

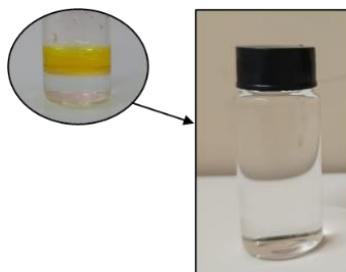


Figura 1. Representação ilustrativa da transição de um sistema bifásico para um SMFE fluido, transparente e isotrópico mediante adição de álcoois de cadeia curta.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo desenvolver e aplicar um sistema em microemulsão sem surfactante para análise espectrofluorimétrica de azeite de oliva extravirgem e misturas adulteradas com óleo de soja. Busca-se, com isso, estabelecer um método alternativo, sustentável e sensível para detecção de fraudes, capaz de combinar simplicidade operacional, baixo custo e potencial de automação. A relevância deste estudo reside na contribuição para o aprimoramento das práticas de controle de qualidade e autenticidade de azeites comercializados no Brasil, fortalecendo a confiança do consumidor e favorecendo o desenvolvimento de métodos analíticos verdes aplicáveis à indústria alimentícia.

Material e Métodos

Em estudos prévios conduzidos pelo mesmo grupo de pesquisa, combinações hidroalcoólicas envolvendo amostras oleosas diluídas em n-octanol, água e n-propanol como solvente anfifílico demonstraram elevada eficiência para obtenção de assinaturas espectrais para óleos essenciais (Bastos; Macedo; Aucelio, 2024; Macedo et al., 2023). No presente trabalho, buscando definir a composição mais adequada para aplicação em amostras de AOEV, foi realizada uma otimização univariada a partir das proporções previamente estabelecidas. Nessa etapa, utilizou-se AOEV 100% puro como amostra e todos os experimentos foram realizados em triplicata, de forma a garantir a reproduzibilidade dos resultados. A influência de variáveis como a natureza do álcool a ser utilizado para estabilização das fases (metanol, etanol

e n-propanol), a proporção entre n-octanol e amostra na fase oleosa e a fração volumétrica de água foi monitorada com base na intensidade de fluorescência emitida para cada condição. Para isso, utilizou-se um espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS-55) e leitura em modo de varredura variando inicialmente o comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 200 a 500 nm com intervalos de 50 nm. Em função da elevada viscosidade das amostras, diferentes mecanismos de coleta de volume (pipetagem direta e reversa) foram avaliados, visando garantir uma melhor reproduzibilidade e a precisão na preparação das SFME (Ewald, 2015).

A partir da definição da condição de compromisso, obtida após o processo de otimização univariada relatado acima, os sistemas foram analisados no mesmo equipamento, porém com varredura tridimensional (espectrofluorimetria 3D) variando-se o comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 240 a 350 nm, em intervalos de 10 nm, e o de emissão (λ_{em}) de 250 a 400 nm, em intervalos de 0,5 nm sendo todas as matrizes de dados tratadas no Software R-Studio para suavização da região de espalhamento. Cabe ressaltar que essa faixa de comprimento de onda foi adotada para obtenção das assinaturas espectrais com base nos resultados obtidos nas análises exploratórias iniciais, buscando aliar detalhamento espectral à redução do tempo de análise. Neste segundo momento, foram analisadas não apenas amostras de AOEV, mas também de óleo de soja e amostras de óleos compostos (formado por 95% de óleo de soja e 5% de azeite de oliva), todas adquiridas no comércio local, abrangendo diferentes marcas, lotes e tipos de embalagem. Contaminações em cinco níveis (0, 25, 50, 75 e 100% v/v) entre AOEV e óleo de soja também foram simuladas, todas em quintuplicatas autênticas, visando verificar a capacidade do método de detectar diferentes graus de adulteração. Por fim, a avaliação da sustentabilidade foi realizada utilizando a métrica *Analytical Eco-Scale* (Gałuszka et al, 2015), que considera penalidades associadas ao uso de reagentes, energia e geração de resíduos, permitindo estimar o impacto ambiental global do método e sua conformidade com os princípios da Química Verde.

Resultados e Discussão

Ao iniciar a otimização univariada, testando diferentes álcoois de cadeia curta, observou-se que metanol e etanol não foram capazes de formar sistemas homogêneos espontaneamente. Para o metanol, esse fato pode ser justificado pela insolubilidade da amostra neste álcool, o que constitui uma das condições primárias para a formação de SFMEs (Hou; Xu, 2016). Para o etanol, a homogeneização dos sistemas foi alcançada apenas após 20 minutos de sonicação (Unique NSC 2800), descaracterizando a formação espontânea. Esse comportamento indica que a energia ultrassônica foi essencial para a dispersão das fases, evidenciando a necessidade de aporte energético externo para a formação do sistema, característica típica de nanoemulsões (sistemas cineticamente estáveis) e não de SFME (sistemas termodinamicamente estáveis) (Kale; Deore, 2017). Por conta da necessidade dessa etapa adicional e com o intuito de manter a sustentabilidade do método, esse álcool foi desconsiderado para a aplicação proposta. Levando em consideração os apontamentos apresentados, optou-se então por prosseguir os estudos utilizando n-propanol. Além da capacidade de formação de SFMEs estáveis, este álcool foi capaz de formar espontaneamente dispersões homogêneas em condições com maiores proporções de água.

Em prosseguimento, um sistema com proporções já utilizadas pelo grupo em outras aplicações (Bastos; Macedo; Aucelio, 2024) foi reproduzido a fim de compreender que novas combinações poderiam ser propostas para a amostra em questão. Essa avaliação foi necessária porque a troca de matriz, acarreta alterações significativas nas condições experimentais, incluindo a região de formação dos sistemas homogêneos e o perfil de fluorescência observado, uma vez que parâmetros como viscosidade, polaridade e composição são relevantes para definir as regiões de formação de SFMEs. Deste modo, mesmo o grupo possuindo expertise em SFMEs com composições similares, uma otimização univariada se fez necessária. A primeira avaliação envolveu a escolha da proporção entre amostra e n-octanol a ser adotada. Diferentes condições foram avaliadas (1:1, 1:2, 1:3, 1:5, v/v), sendo selecionada a proporção 1:3 (amostra:n-octanol, v/v) por equilibrar estabilidade do sistema e intensidade do sinal. A adição de n-octanol na fase oleosa, contribui para uma melhor estabilização das SFMEs formadas e permite maiores proporções de fase oleosa mantendo a homogeneidade e estabilidade dos sistemas. No entanto, optou-se por não ultrapassar a proporção 1:3, pois diluições maiores resultam em perda de intensidade, o que poderia prejudicar as regiões de detalhamento espectral o que é essencial para o estudo. Em seguida e, partindo dessa consideração, a quantidade máxima de água que o sistema suporta foi avaliada. Para este estudo, quantidades de até 1000 µL de água ultrapura formaram SFMEs, porém o volume de 750 µL foi adotado como condição de compromisso, visando evitar regiões próximas à turvação. A partir dos resultados obtidos, foi possível então estabelecer uma nova condição de compromisso a ser levada para obtenção das assinaturas espectrais (Figura 2).

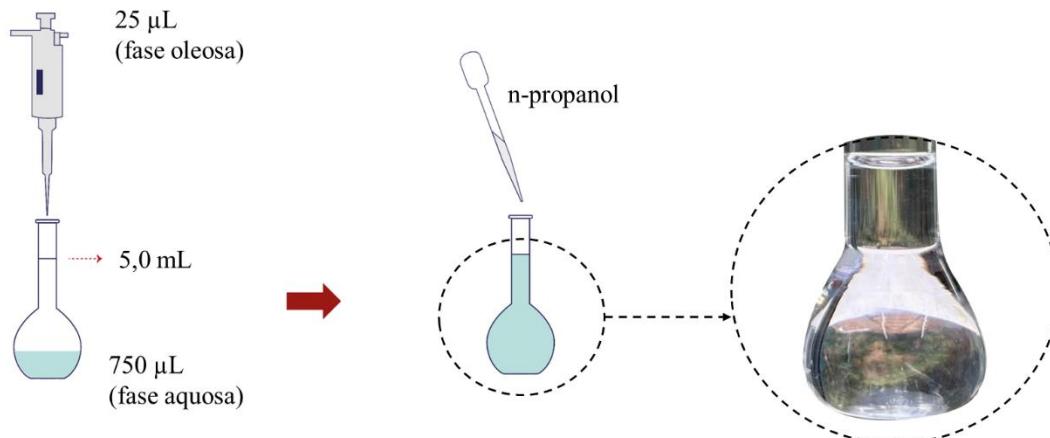


Figura 2. Condição de compromisso adotada no estudo. Como fase oleosa, uma mistura de amostra com n-octanol (1:3, v/v) foi utilizada. Destaque para a foto real de um sistema com a combinação proposta.

Devido à viscosidade da amostra, houve problemas de reprodutibilidade de resultado e por isso, foi adotado o processo de pipetagem reversa (Figura 3). Estudo comparativo, realizado em quintuplicata, mostrou que a técnica escolhida é mais adequada para coleta de amostras oleosas, sendo capaz de melhorar os desvios entre as replicatas, pois minimiza perdas de volume e formação de bolhas.



Figura 3. Mecanismo de pipetagem reversa testado no estudo.

Após análise por espectrofluorimetria 3D, as amostras de óleo de soja e de AOEV apresentaram diferentes perfis de impressão digital atribuídos às distintas composições químicas de cada um. O óleo de soja exibiu fluorescência intensa em 300/340 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), enquanto o AOEV apresentou sinal discreto em 290/320 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) (Figura 4) e todos os resultados foram reproduzíveis em todas as variedades de marcas e embalagens analisadas. As amostras de óleo composto apresentaram alterações características nas assinaturas espectrais obtidas, evidenciando o potencial da técnica como ferramenta de triagem em processos de avaliação e controle de qualidade de AOEV (Figura 5). Esse comportamento reforça que o método proposto pode permitir, com uma única análise, identificar de forma preliminar a possibilidade de adulteração, uma vez que a assinatura espectral reflete diretamente as diferenças na composição química e nas propriedades ópticas das amostras. Assim, variações sutis associadas à presença de outros óleos ou à diluição podem ser detectadas sem a necessidade de etapas adicionais de preparo ou de instrumentos analíticos de alto custo, tornando o procedimento uma alternativa promissora para aplicações de rastreabilidade e autenticação de azeites.

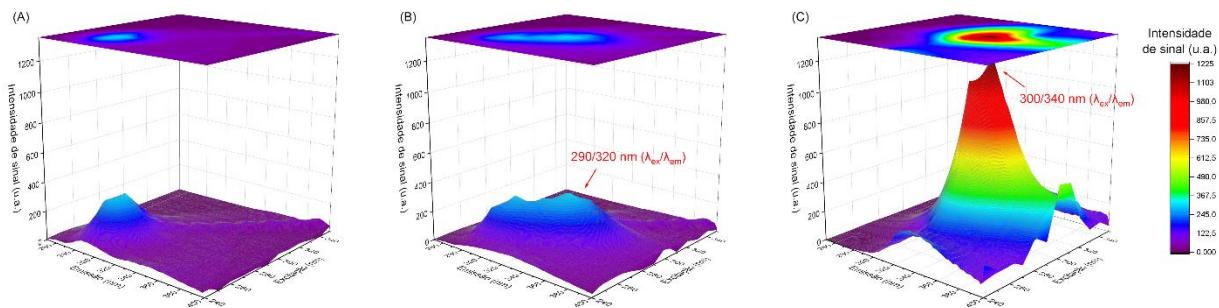


Figura 4. Assinaturas espectrais obtidas por espectrofluorimetria 3D após análise do (A) branco analítico, (B) AOEV e (C) óleo de soja em SFME.

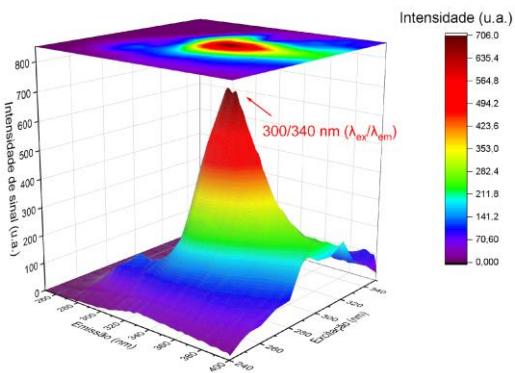


Figura 5. Assinatura espectral obtida por espectrofluorimetria 3D após análise da amostra de óleo composto (95% óleo de soja e 5% azeite de oliva em SFME).

Níveis diferentes de adulteração em laboratório (25%, 50%, 75%, 100%) também resultaram em alterações espectrais significativas com aumento progressivo da intensidade de sinal, proporcional à concentração dos compostos fluorescentes (Figura 6). A curva analítica obtida por meio dos resultados apresentou linearidade satisfatória com equação $y = (12,47 \pm 0,27)x + (134,77 \pm 16,38)$ e valor de $R^2 = 0,9982$. Além disso, os resíduos apresentaram distribuição aleatória, sem tendência aparente, e os baixos erros associados ao coeficiente angular e ao intercepto reforçam a precisão e reproducibilidade da curva analítica. Os coeficientes de variação obtidos por meio dos valores das quintuplicatas foram todos abaixo de 5%. A análise de variância (ANOVA) da regressão linear indicou significância estatística para o modelo proposto, com $p < 0,05$ e F_{calc} expressivamente superior ao F_{tab} ($\alpha = 0,05$), confirmando a adequação do ajuste linear.

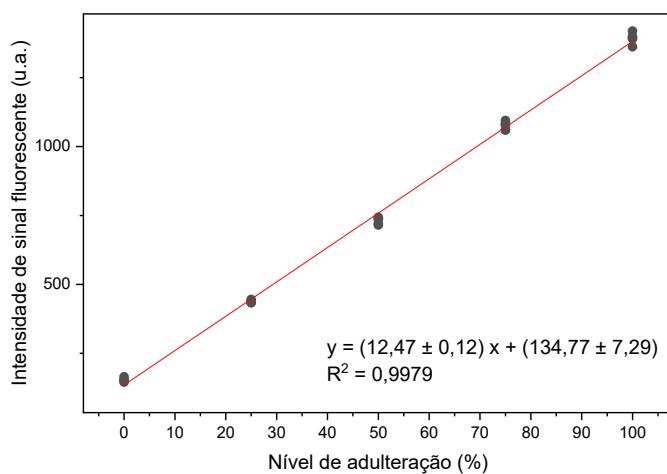


Figura 6. Valores de intensidade de sinal fluorescentes obtidos em 290/340 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) para amostras de AOEV adulteradas em laboratório com óleo de soja (0, 25, 50, 75 e 100% v/v).

A sustentabilidade do método proposto foi avaliada utilizando a métrica *Analytical Eco-Scale* (Galuszka et al., 2015), que considera penalidades relacionadas ao uso de reagentes, energia e geração de resíduos. O procedimento apresentou 84 pontos como pontuação final, refletindo boa conformidade com os princípios da Química Verde. Segundo os autores da

referência, valores acima de 75 são considerados satisfatórios, indicando que o método combina eficiência analítica com baixo impacto ambiental. Os resultados detalhados estão apresentados na Tabela 1, evidenciando o reduzido consumo de reagentes e energia, sem comprometer a qualidade das análises.

Tabela 1. Resultado obtido após aplicação da métrica de sustentabilidade *Analytical Eco-Scale* (Gałuszka et al., 2015)

Reagentes	Pontos por penalidade	Total de penalidades
n-octanol	Quantidade inferior a 10mL (1 ponto) 1 pictograma (1 ponto) Palavra de advertência: Atenção (1 ponto)	$1 \times 1 \times 1 = 1$
n-propanol	Quantidade inferior a 10mL (1 ponto) 3 pictogramas (3 pontos) Palavra de advertência: Perigo (2 pontos)	$1 \times 3 \times 2 = 6$
Instrumentos	Pontos por penalidade	Total de penalidades
Consumo de energia	<0.1 kWh por amostra (0 pontos)	0
Risco ocupacional	Com emissão de vapores (3 pontos)	3
Rejeito	Entre 1-10 mL (3 pontos) Sem tratamento (3 pontos)	3
		$\Sigma 16$
Pontuação: 100-16 = 84		

Conclusões

A metodologia proposta mostrou-se eficiente na obtenção de impressões digitais espetrais, possibilitando a identificação simples e rápida da adulteração de AOEV com óleo de soja. O uso de SFMEs reduziu significativamente o volume de amostra necessário e minimizou o risco de contaminação cruzada, reforçando a viabilidade e reproduzibilidade da técnica. Além da detecção qualitativa, os resultados obtidos indicam a possibilidade de quantificação do grau de adulteração por meio da relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração da amostra, demonstrando o potencial de aplicação do procedimento em monitoramentos de rotina e em estratégias de rastreabilidade e controle de qualidade de azeites. Por fim, a pontuação obtida pela métrica *Analytical Eco-Scale* confirma o caráter sustentável do método, evidenciando sua conformidade com os princípios da Química Verde.

Agradecimentos

PUC-Rio, IFRJ, CNPq, FAPERJ, CAPES.

Referências

- ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; CERDÁ, V. Environmental applications of excitation-emission spectrofluorimetry: An in-depth review I. **Applied Spectroscopy Reviews**, 48 (1), 1-49, 2013.
- BARROS, I. H. S.; SANTOS, N. A.; FRANÇA, H. S.; FILGUEIRAS, P. R.; ROMÃO, V. Espectroscopia Raman portátil no combate a adulteração de azeite de oliva extravirgem por óleo de soja. **Revista Ifes Ciência**, 9, 01-14, 2023.
- BASTOS, M. B.; MACEDO, R. C.; AUCELIO, R. Q. Green method for quantification of lavender and sweet orange essential oils in blends by synchronous fluorescence first derivative. **Green Analytical Chemistry**, 10, 100133, 2024.
- CASADEI, E.; VALLI, E.; PANNA, F.; DONARSKI, J.; GUBERN, J. F.; LUCCI, P.; CONTE, L.; LACOSTE, F.; MAQUET, A.; BRERETON, P.; BENDINI, A.; TOSCHI, T. G. Emerging trends in olive oil fraud and possible countermeasures. **Food Control**, 124, 107902, 2021.
- EWALD, K. Impact of pipetting techniques on precision and accuracy. **Userguide**, (20), 2015.
- HASHEMPOUR-BALTORK, F.; ZADE, S. V.; MAZAHERI, Y.; ALIZADEH, A. M.; RASTEGAR, H.; ABDIAN, Z.; TORBATI, M.; DAMIRCHI, S. A. Recent methods in detection of olive oil adulteration: State-of-the-art. **Journal of Agriculture and Food Research**, 16, 101123, 2024.
- HOU, W.; XU, J. Surfactant-free microemulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 25, 67-74, 2016.
- JIMENEZ-LOPEZ, C.; CARPENA, M.; LOURENÇO-LOPES, C.; GALLARDO-GOMEZ, M.; LORENZO, J. M.; BARBA, F. J.; PRIETO, M. A.; SIMAL-GANDARA, J. Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. **Foods**, 9, 1014, 2020.
- KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, 8, 39-47, 2017.
- LOZANO-CASTELLÓN, J.; LÓPEZ-YERENA, A.; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, I.; SISCART-SERRA, A.; FRAGA, N.; SÁMANO, S.; LÓPEZ-SABATER, C.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M., VALLVERDÚ-QUERALT, A.; PÉREZ, M. Extra virgin olive oil: A comprehensive review of efforts to ensure its authenticity, traceability, and safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 21, 2639-2664, 2022.
- MACEDO, R. C.; PEDROZO-PEÑAFIEL, M. J.; CUNHA, A. L. M. C.; AUCELIO, R. Q. Fingerprinting pattern of orange essential oils in surfactant-free microemulsion by 3D fluorescence spectroscopy. **Food Chemistry Advances**, 3, 100482, 2023.
- GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z. M.; KONIECZKA, P.; NAMIEŚNIK, J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 37, 61–72, 2012.