



Desarrollo de procedimientos de evaluación rápida de calidad de aceites basados en técnicas espectroscópicas

Paola Baltazar¹, Natalia Hernández Sánchez¹, Belén Diezma Iglesias¹, Lourdes Lleó García¹

¹ Laboratorio de Propiedades Físicas-Tecnologías Avanzadas en Agroalimentación (LPF-TAGRALIA), ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid, Av. Puerta de Hierro, 2 - 4, 28040 Madrid, España, paola.balatazar.delcastillo@alumnos.upm.es

Resumen: El objetivo de este trabajo fue desarrollar un procedimiento basado en espectroscopia de fluorescencia ultravioleta/visible de análisis rápido, de bajo coste y respetuoso con el medio ambiente, para la evaluación de la calidad del aceite de oliva, que pueda ser integrado en cualquier eslabón de su cadena de valor. Se utilizaron 8 muestras iniciales de AOVE. De cada muestra se obtuvieron 6 réplicas contenidas en frascos de vidrio transparente. Dos réplicas fueron sometidas a 4 semanas de luz indirecta natural; otras dos réplicas a 2 días; y la tercera pareja se utilizó como control, manteniéndola en oscuridad. De cada pareja un frasco se utilizó para las medidas espectroscópicas y el otro se envió a un laboratorio externo acreditado por ENAC para la obtención de las medidas físico-químicas. Para la adquisición de espectros de fluorescencia se dispusieron de 4 ml de cada muestra en cubetas de cuarzo de sección cuadrada, de 10 mm de lado. Los parámetros físico-químicos considerados fueron: grado de acidez, índice de peróxidos, espectrofotometría K270, espectrofotometría K232, tocoferoles totales, polifenoles totales. Todos se vieron afectados por la exposición a la luz. Los parámetros que presentaron mayor coeficiente de variación fueron el índice de peróxidos (53%), al α -tocoferol (19%), β -tocoferol (20,8%) y γ -tocoferol (24,3%). Finalmente se muestra la posibilidad del desarrollo de modelos de estimación puesto que con un número muy limitado de muestras se obtuvieron R² de casi 0,9 en los PLSR de cada una las características físico-químicas estudiadas.

Palabras clave: aove, fluorescencia, UV/VIS, productos de oxidación, espectros.

1. Introducción

La elección del aceite de oliva se debe a que es uno de los productos bandera del Gran Consumo. Su producción y consumo se han incrementado y extendido desde la zona mediterránea hacia otras regiones del mundo. El creciente interés por este producto, en especial por el aceite de oliva virgen extra (AOVE), se fundamenta en sus cualidades beneficiosas para la salud y en sus atributos sensoriales, ya que es rico en ácidos grasos monoinsaturados y en compuestos antioxidantes; y presenta una amplia gama de matices aromáticos y gustativos.

Aproximadamente el 78% del consumo mundial de aceite corresponde a los países productores, siendo Italia el primer país consumidor (38,5%) seguido de España (28,4%). Sin embargo el mayor incremento del consumo de aceite de oliva se está produciendo en los países no productores [2] y, en consecuencia, los países productores europeos se han convertido también en exportadores de aceite de oliva.

En este contexto, la comercialización del AOVE se ha vuelto cada vez más exigente en la evaluación de la calidad. El sector oleícola está sometido al cumplimiento de reglamentos y normativas que afectan a la comercialización de los aceites de oliva tanto en el marco europeo [1] como en el internacional (COI/T.15/NC nº3), apareciendo incluso, normas de control específicas en ciertos países. Esta reglamentación establece la categorización del aceite de acuerdo a numerosas características físico-químicas analizadas en laboratorios acreditados, así como a una valoración organoléptica llevada a cabo por un panel de cata específico y acreditado. Estos análisis son por lo general laboriosos, lentos y costosos.

El aceite de oliva contiene compuestos que son fluorescentes y están directamente relacionados con efectos beneficiosos sobre la salud, así como con la resistencia a la oxidación y el nivel de frescura. Los compuestos fluorescentes son: polifenoles y tocoferoles, productos de oxidación primaria, productos de oxidación secundaria y clorofilas.

El sector oleícola demanda herramientas fáciles de implementar, rápidas y de menor coste económico y medioambiental. El presente trabajo avanza en este sentido, ya que, a diferencia de los procedimientos tradicionales, la aplicación de la espectroscopia de fluorescencia supone la ausencia de disolventes y reactivos; rapidez y sencillez en las medidas; y disminución de la necesidad de personal cualificado. De todo ello se deriva un menor coste y la posibilidad de implementar este procedimiento en cualquier eslabón de la cadena de valor.

2. Materiales y métodos

2.1. Datos de la muestra

Se utilizaron 8 muestras iniciales (mostradas en Tabla 1) de aceites de oliva virgen extra procedentes de diferentes depósitos de la almazara Finca La Pontezuela S.L., con Denominación de Origen Montes de Toledo; y Cornicabra como variedad emblemática.

Tabla 1. Muestras iniciales del experimento

Nº muestra inicial	Variedad	Abreviatura	Depósito
1	Cornicabra	C	D5
2	Picual	P	D7
3	Cornicabra	C	D8
4	Hojiblanca	H	D10
5	Redondilla	R	D11
6	Cornicabra	C	D16
7	Cornicabra	C	D17
8	Cornicabra	C	D19

2.2. Tratamiento de la muestra

Estas muestras se sometieron a 3 tratamientos diferentes con la finalidad de incrementar la variabilidad en el estado de oxidación de las mismas.

Se dispuso de un litro de cada una de las 8 muestras de aceite. Se generaron 6 réplicas de cada muestra contenidas en frascos de vidrio transparente de 100 ml. De los frascos se expusieron dos a luz ambiente indirecta durante 4 semanas y dos durante 2 días. Como control se utilizaron dos réplicas mantenidas en oscuridad. Las réplicas fueron en parejas de forma que el aceite de un frasco se utilizó para las medidas espectroscópicas y el otro frasco, sin abrir, se envió a un laboratorio externo acreditado por ENAC para la obtención de las características físico-químicas, como se ilustra en la Figura 1. Este procedimiento proporcionó un total de 24 muestras (8 muestras x 3 tratamientos de almacenamiento = 24 muestras analizadas). Para la

adquisición de espectros de fluorescencia se dispusieron de 4 ml por a muestra en cubetas de cuarzo numeradas. El cuarzo se eligió como material de las cubetas por ser transparente en los rangos espectrales UV y VIS.

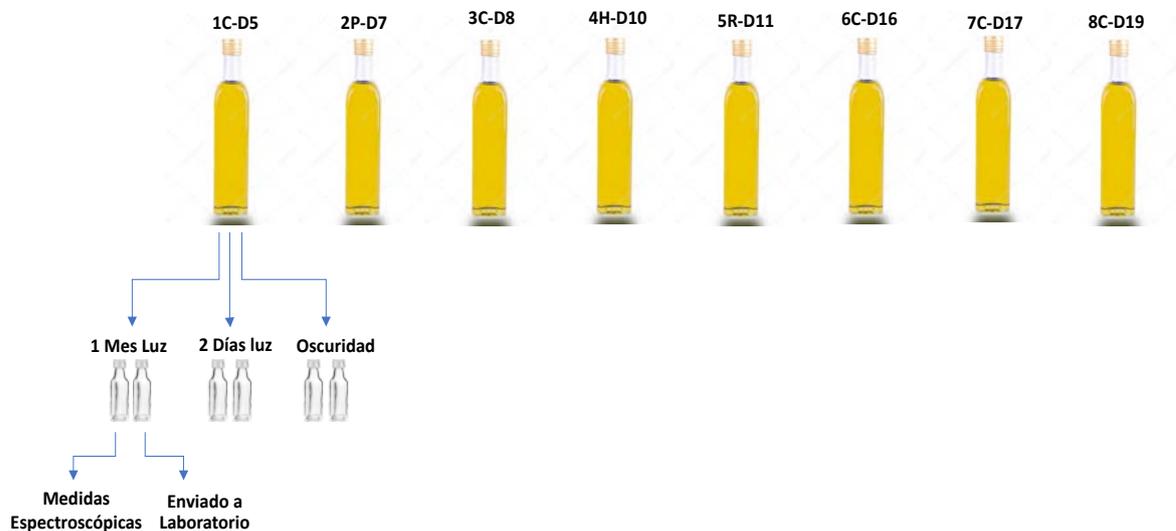


Figura 1. Obtención de las 24 muestras analizadas.

2.3. Determinaciones físico-químicas

Se acordó con el laboratorio externo que los análisis físico-químicos de las muestras se desarrollaran de forma casi simultánea a los análisis espectroscópicos en nuestro laboratorio (LPF-TAGRALIA). De esta forma había una correspondencia total entre características físico-químicas y espectrales. Los análisis llevados a cabo por el laboratorio externo se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción de parámetros y protocolos empleados por el laboratorio acreditado.

Ensayo	Unidades	Norma
Grado de acidez	% (ac. Oleico)	PNT 1.08
Índice de peróxidos	meq O ₂ /k	PNT 1.09
Espectrofotometría K270	-	PNT 1.10
Espectrofotometría K232	-	PNT 1.10
Espectrofotometría ΔKc	-	PNT 1.10
Tocoferoles totales	mg/kg	PNT 1.18b
α-Tocoferol	mg/kg	PNT 1.18b
β-Tocoferol	mg/kg	PNT 1.18b
γ-Tocoferol	mg/kg	PNT 1.18b
δ-Tocoferol	mg/kg	PNT 1.18b
Polifenoles totales	Ac.Cafeico/kg	PNT 1.56 (Folin-Ciocalteu)

2.4. Procedimiento de análisis espectroscópico

Los resultados de las determinaciones físico-químicas se analizaron mediante:

- Determinación de parámetros estadísticos básicos como media, rango, desviación estándar y coeficiente de variación.

- . Análisis de la variabilidad mediante diagramas radiales para los aceites sometidos a diferente duración de exposición a la luz.

Las medidas de fluorescencia se sometieron a los siguientes procesos:

- . Selección del rango de longitudes de onda de interés.
- . Eliminación de ruido de los espectros mediante pretratamiento consistente en el suavizado mediante el algoritmo Savitsky-Golay, ajustado a un polinomio de grado 2, con ventana de 5 datos, sin aplicación de diferenciación.
- . Representación gráfica de los espectros y análisis de los picos característicos de los espectros.
- . Comparación de espectros de los aceites sometidos a diferente duración de exposición a la luz.

Ambos resultados, los físico-químicos y los espectrales se analizaron de forma conjunta mediante aplicación de técnicas multivariantes para la obtención de modelos de regresión por mínimos cuadrados parciales (Partial Least Square Regression PLSR, por sus siglas en inglés) para la estimación de las características físico-químicas a partir de los datos espectrales.

3. Resultados y discusión

3.1. Análisis de los parámetros obtenidos en laboratorio

Tabla 3. Resumen de los resultados de los análisis químicos de las 24 muestras.

	Índice		Tocoferoles		α	β	γ	Polifenoles	
	Acidez	Peróx.	K ₂₃₂	K ₂₇₀	Tocoferol	Tocoferol	Tocoferol	totales	
Medias	0,13	9,08	0,14	1,83	244,99	233,91	2,43	8,65	563,88
Máx.	0,15	24,00	0,16	2,16	348,20	332,10	3,30	13,50	683,00
Mín.	0,10	3,80	0,12	1,68	165,70	157,50	1,70	6,40	410,00
Rango	0,05	20,20	0,04	0,48	182,50	174,60	1,60	7,10	273,00
Desv. St.	0,01	4,83	0,01	0,14	46,72	44,56	0,50	2,11	78,25
CV (%)	9,25	53,22	6,96	7,49	19,07	19,05	20,79	24,34	13,88

La Tabla 3 muestra los coeficientes de variación con la variabilidad de los datos y oscilan entre un 7% y un 53%, dependiendo del parámetro considerado. Los parámetros con mayor coeficiente son el índice de peróxidos (53%), al α -tocoferol (19%), β -tocoferol (20,8%) y γ -tocoferol (24,3%). Por lo tanto, el índice de peróxidos aparece como el parámetro que presenta más variabilidad; los diferentes tocoferoles también están afectados pero en menor medida. Los parámetros acidez, las K₂₃₂ y K₂₇₀ son los que tiene el coeficiente de variación más bajo.

Para observar la evolución de cada muestra de aceite durante la exposición a la luz (oscuridad, 2 días y 1 mes), se calcularon los diagramas radiales de forma que cada radio del polígono corresponde a una muestra. Se calcularon para cada parámetro químico: acidez, índice de peróxidos, K₂₃₂, K₂₇₀, tocoferoles totales, α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y polifenoles totales.

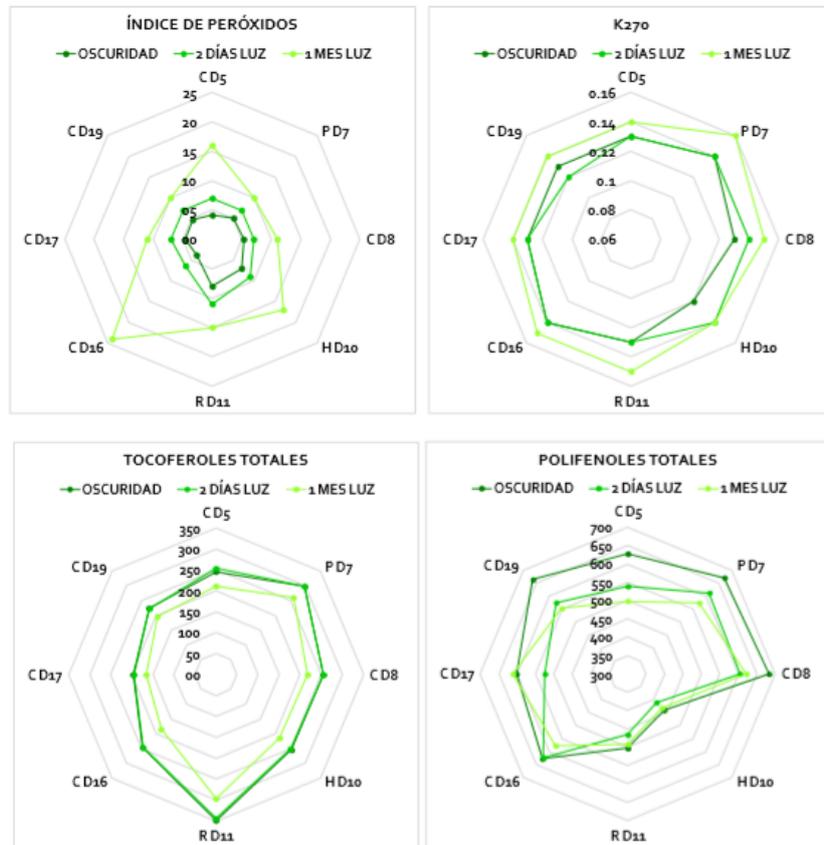


Figura 2. Diagrama radial para los tres tratamientos del índice de peróxidos, K_{270} , tocoferoles totales y polifenoles totales.

La Figura 2 presenta los diagramas de índice de peróxidos, K_{270} , tocoferoles totales y polifenoles totales. Se puede observar que los valores del índice de peróxidos y la K_{270} crecen con la exposición a la luz, por tanto, con el estado de oxidación. Ambos parámetros reflejan el nivel de oxidación de los aceites siendo más relevante la evolución en el índice de peróxidos. Cada muestra presenta un patrón de evolución diferente, destacando CD16 en el caso de índice de peróxidos. Por otra parte, como cabría esperar, los compuestos antioxidantes tocoferoles y polifenoles totales disminuyen con el tiempo.

3.2. Análisis de los espectros de fluorescencia

Los espectros obtenidos mostraron picos de emisión en diferentes rangos de longitudes de onda. La Figura 3 corresponde a una de las configuraciones de adquisición de espectros empleadas. En a) se aprecia un pico dominante alrededor de 670 nm, correspondiente a la emisión de las clorofilas. Con menor intensidad aparecen una serie de picos en el rango desde 300 nm hasta 600 nm aproximadamente (zona ampliada en b)). Estas áreas de emisión corresponden a productos de oxidación y tocoferoles, relacionados con el estado de oxidación de los aceites. Por ello, se selecciona el rango desde 350 nm hasta 550 nm para los posteriores desarrollos de modelos de estimación de las características físico-químicas. El pico a 670 nm no se consideró por no ser la clorofila un parámetro recogido en la normativa de calidad de los aceites.

La emisión en el rango desde 350 a 550 nm mostró un incremento paulatino de la intensidad con el tiempo de exposición a la luz en todas las muestras de aceite (Figura 3 a y b). La Figura 3 c) muestra la evolución de la señal de fluorescencia de la muestra Cornicabra C D5.

Este resultado es congruente con el hecho de que los procesos de oxidación primaria y secundaria que experimenta el aceite suponen la aparición de productos de oxidación que son fluorescentes. Igualmente, la detección del incremento de las señales pone de manifiesto la sensibilidad de la técnica empleada.

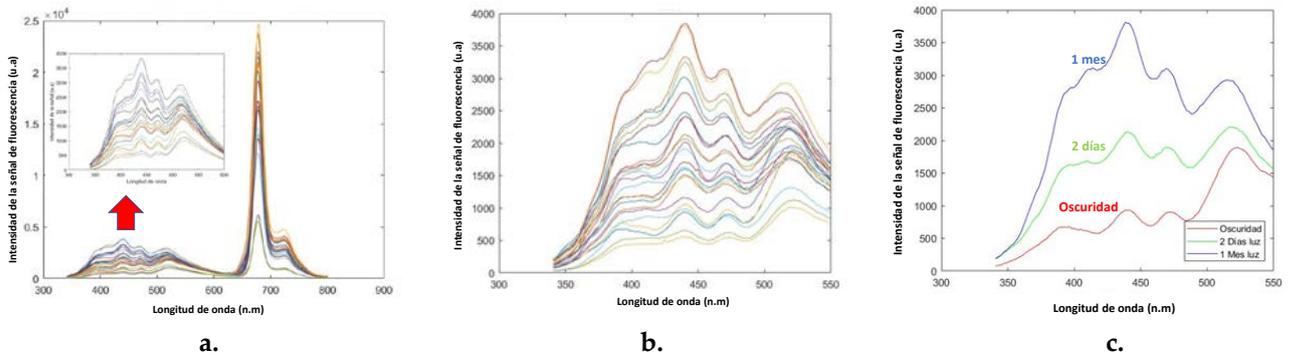


Figura 3. a) Representación de todos los espectros (N=24) obtenidos con una de las configuraciones del equipo; b) Selección del rango espectral de estudios; c) Evolución de la señal de fluorescencia de una muestra de Cornicabra CD5.

3.3. Modelos de estimación de los parámetros físico-químicos

Con anterioridad al desarrollo de los modelos multivariantes de estimación, se estudiaron las características espectrales de aceites con estados de oxidación diferentes. La Figura 4 ilustra las diferencias encontradas entre un espectro de una muestra de mayor acidez con respecto al de una muestra de menor acidez. Claramente, el de mayor acidez presenta una mayor intensidad de señal en todo el rango. Además, los picos aparecen de forma más acusada.

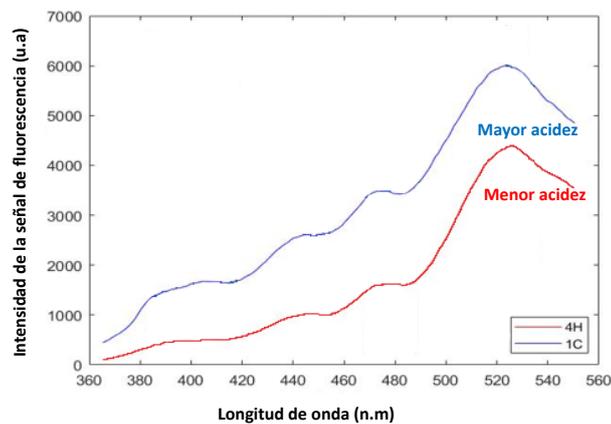


Figura 4. Ejemplo del espectro de una muestra de alta acidez y espectro de una muestra de baja acidez.

Una vez detectado que los espectros de fluorescencia reflejan las diferencias en los valores de las características físico-químicas, se procedió al desarrollo de los modelos de estimación. Los resultados obtenidos de los modelos PLSR para cada parámetro están resumidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultado para los modelos PLSR para cada parámetro físico-químico.

Parámetro químico	R ²
Acidez	0,842
Índice de Peróxidos	0,672
K232	0,875
K270	0,299
Tocoferoles totales	0.880
α-Tocoferol	0,876
β-Tocoferol	0,818
γ-Tocoferol	0,858
Polifenoles totales	0,644

La capacidad predictiva de los modelos se evalúa a través del coeficiente de determinación R², de forma que cuanto más se aproxime a la unidad, menor es la diferencia entre los valores reales obtenidos por el laboratorio acreditado y los valores estimados mediante fluorescencia. La Figura 5 y la Tabla 4 muestran valores de R² muy elevados, alcanzando casi el 0.9 en casi todos los parámetros.

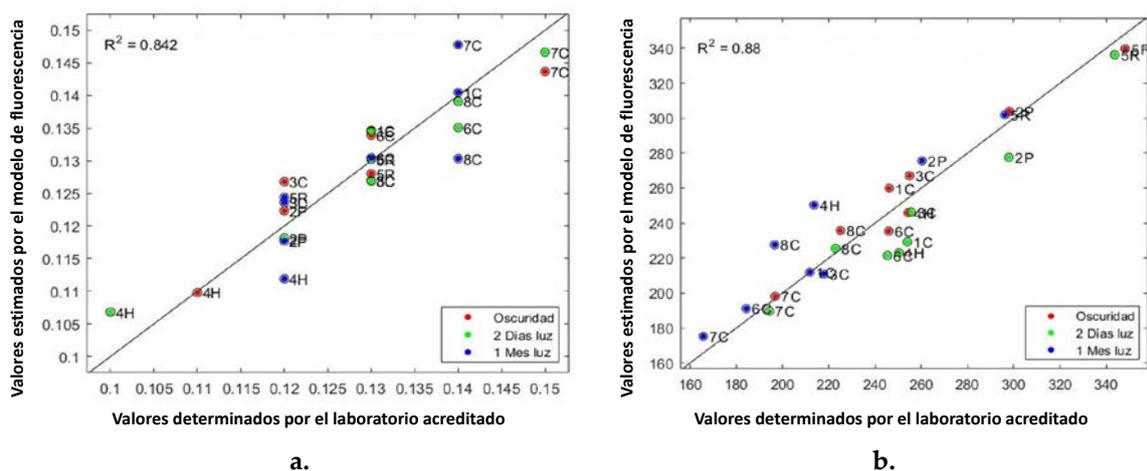


Figura 5. a) Valores determinados por el laboratorio acreditado en el eje x frente a los valores que se estiman con los modelos de fluorescencia en el eje y para acidez; b) Valores determinados por el laboratorio acreditado en el eje x frente a los valores que se estiman con los modelos de fluorescencia en el eje y para tocoferoles totales. Cada círculo representa una muestra.

4. Conclusiones

Este trabajo demuestra la viabilidad del procedimiento desarrollado basado en la espectroscopia de fluorescencia para la evaluación del estado de oxidación del AOVE. Los cambios internos producidos en la composición del aceite de oliva a consecuencia de la exposición a la luz se manifiestan en cambios en la forma de los espectros de emisión de fluorescencia en el rango desde 350 a 550 nm. Esto implica que los espectros de emisión de fluorescencia tienen la capacidad de ser empleados en el seguimiento de la evolución de los aceites de oliva.

La intensidad de la señal en el rango estudiado se incrementa con el tiempo, aportando información valiosa sobre el estado de oxidación de los aceites, pudiendo ser utilizada para la

estimación de características físico-químicas claves en cualquier punto de la cadena de valor del producto.

5. Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a la empresa La Pontezuela S.L.U. y, en especial, a su Director de Operaciones y Estrategia Corporativa David Pérez Pardo-Pimentel; a la empresa española Multiscan Technologies S.L.; al LPF-TAGRALIA de la ETSIABB de la Universidad Politécnica de Madrid, por su apoyo y colaboración en el proyecto.

Referencias

1. CE (2013). Reglamento nº1348/2013 de la Comisión que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. Diario Oficial de la Unión Europea, L 338, 31-67.
2. COI (2016). Consejo Oleícola Internacional. Datos producción, consumo, exportación e importación europea y mundial de aceite de oliva. <http://www.internationaloliveoil.org/>
3. Hernández-Sánchez N, Lleó L, Ammari F, Cuadrado TR, Roger JM. Fast Fluorescence Spectroscopy Methodology to Monitor the Evolution of Extra Virgin Olive Oils under Illumination. *Food and Bioprocess Technology*, 2017, 10(5), 949-961.
4. Hernández-Sánchez N., L. Lleó, B. Diezma, F. Ammari, T.R. Cuadrado, P. Barreiro, J.M. Roger and M. Ruiz-Altisent. Front-face and right-angle fluorescence spectroscopy for monitoring EVOO evolution. VIII International Olive Symposium, Croatia, 2016, 10-14.
5. Hernández-Sánchez Natalia, Lourdes Lleó García, Teresa Cuadrado, María Dolores Molero Vílchez, Margarita Ruiz-Altisent. HR Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for authentication of olive oil quality. *Proceedings International Conference of Agricultural Engineering – AgEng*, 2014.
6. Lleó L, Natalia Hernández-Sánchez, Faten Ammari, Jean-Michel Roger. 3D front-face fluorescence spectroscopy for characterization of extra virgin olive oil and olive oil according to the spectral pattern. 2016, Vol 18, No 4.
7. Mishra, P., Lleó, L., Cuadrado, T., Ruiz-Altisent, M., Hernández-Sánchez, N. Monitoring oxidation changes in commercial extra virgin olive oils with fluorescence spectroscopy-based prototype. *Eur Food Res Technol*, 2018, 244-565.
8. Sikorska, E.; Khmelinskii, I.; Sikorski, M. Analysis of olive oils by fluorescence spectroscopy: Methods and applications. In Boskou Dimitrios (Ed.), *Olive oil – constituents, quality, health properties and bioconversions*, 2012.