

DetECCIÓN DE FRAUDES EN ACEITES VEGETALES MEDIANTE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Apellidos, nombre	García Martínez, Eva (evgarmar@tal.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de Alimentos
Centro	ETSIAMN. Universitat Politècnica de València

1 Resumen de las ideas clave

El aceite de oliva es producto muy valorado por sus propiedades saludables y organolépticas, las cuales incrementan su valor comercial. Se trata de un alimento susceptible de sufrir fraudes de autenticidad o adulteraciones por adición de otros aceites vegetales de menor calidad para incrementar los beneficios económicos. Esta adulteración, además de un fraude económico, supone un riesgo para la seguridad alimentaria pudiendo afectar a la salud del consumidor. Desde el punto de vista cualitativo, la presencia de ciertos ácidos grasos indica la posibilidad de que estén presentes en el alimento determinadas grasas. Cuantitativamente la proporción en la que aparecen estos ácidos grasos puede dar una orientación de la presencia de algunos aceites determinados.

En este objeto de aprendizaje vamos a describir cómo identificar y cuantificar los ácidos grasos mayoritarios en distintas muestras de aceites vegetales empleando la técnica de la cromatografía gaseosa (CG). Mediante dos ejemplos prácticos, se determinará el perfil cualitativo y cuantitativo de ácidos grasos a partir de los cromatogramas obtenidos de dos muestras de aceite y se identificará la existencia de un posible fraude.

2 Introducción

¿Cómo definirías “calidad”? La calidad es un concepto multifacético, difuso y jerárquico. Este concepto puede ser definido desde diferentes perspectivas. La Norma UNE-EN ISO 9000:2015 define la calidad como: “el grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con la necesidad o expectativa establecida, generalmente implícita u obligatoria”. En base a la definición anterior, la calidad se podría dividir en diferentes niveles (Figura 1). Un primer nivel centrado en la seguridad de los alimentos (en términos microbiológicos, contaminantes y toxinas), que deben ser autenticados y controlados por las autoridades y los organismos reguladores; por otro lado, un segundo nivel formado por la calidad en sus diferentes facetas: calidad sensorial, calidad de estabilidad y de valor nutricional, calidad relacionada con aspectos prácticos de utilización del producto (tipo de envase, precio, etc.) y calidad emocional. Y un tercer nivel relacionado con la autenticidad.

Un producto auténtico, ya sea materia prima o un producto terminado expuesto en los anaqueles de un supermercado, es un producto estrictamente conforme con las especificaciones dadas por el productor en términos de ingredientes, origen geográfico y botánico, ausencia de sustancias añadidas, tecnología de fabricación, año de producción, etc. La autenticidad es importante para la industria alimentaria por numerosas razones: reglamentación, razones económicas, garantía de una calidad constante bien definida, uso de ingredientes naturales y razones religiosas (halal, kasher).



Figura 1. Interacción entre las distintas facetas de calidad y seguridad de los alimentos.

El aceite de oliva es producto muy valorado por sus propiedades saludables y organolépticas, las cuales incrementan su valor comercial. Según el Consejo Oleícola Internacional (COI) el aceite de oliva “es el aceite procedente del fruto de olivo (*Olea europea L.*), con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza”. Este aceite se puede comercializar bajo distintas denominaciones en función de su calidad, siendo el aceite de oliva virgen el aceite de mayor calidad, obtenido a partir del fruto exclusivamente por procedimientos mecánicos u otros medios físicos, en condiciones térmicas que no produzcan la alteración del aceite, sin más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado.

¿Cómo se regula la calidad del aceite de oliva? Existen diferentes fuentes normativas y jurídicas que han regulado tradicionalmente la producción del aceite de oliva virgen y el comercio internacional. Además de las normas comerciales del COI para sus miembros, formado por la mayoría de los países productores, existen regulaciones específicas dentro de la Unión Europea (UE) que controlan la mayor parte del mercado mundial de aceite de oliva. También existen otros reglamentos vigentes en algunos nuevos países productores como Australia, Alemania, Sudáfrica o USA.

La existencia de un mercado mundial del aceite de oliva se ve protegida por la normativa del *Codex Alimentarius*. Las diferentes normativas se desarrollaron para controlar tanto la calidad como la adulteración. Así, el Reglamento (CEE) 2568/91 pretende garantizar la calidad y transparencia en la comercialización de los diferentes tipos de aceite de oliva en función del proceso de extracción, la acidez y otros parámetros obtenidos por análisis físico-químicos en un laboratorio autorizado. Además, en el caso de los aceites de mayor calidad, también son evaluados sus parámetros organolépticos, mediante un panel de cata compuesto por técnicos expertos.

Los aceites refinados (de oliva o de orujo) se obtienen mediante un proceso químico (extracción con disolventes) y el aceite de oliva, que resulta de mezclar el oliva virgen con el refinado. El más apreciado por su sabor y sus conocidos efectos beneficiosos sobre la salud, y en consecuencia el que alcanza precios más altos en el mercado, es el aceite de oliva virgen extra. Precisamente por ser el más caro es el más susceptible de sufrir adulteraciones para incrementar los beneficios económicos. El método más común de adulteración consiste en mezclar el aceite de oliva con otros aceites vegetales de distinta procedencia (girasol o soja), mucho más baratos. Esta adulteración, además de un fraude económico, supone un riesgo para la seguridad alimentaria porque existen aceites de materias primas, como la soja, que tienen un conocido potencial alergénico y pueden afectar a la salud del consumidor si se añade fraudulentamente. De hecho, la normativa vigente prohíbe expresamente la mezcla de aceite de oliva con los de semillas o con cualquier otro aceite o grasa.

En prensa encontramos demasiado frecuentemente noticias relacionadas con este tipo de fraudes. Lo más común es el fraude de comercialización de diversas mezclas de aceites vegetales bajo la denominación de aceite de oliva y de oliva virgen extra. En esta línea para intentar evitar este tipo de fraudes, el Real Decreto 895/2013 prohíbe el uso de aceiteras rellenables en hostelería, restauración y catering (HORECA), obligando a que todo el aceite presentado sea en botella con tapón irrellenable y con un etiquetado específico, para que los consumidores puedan identificar la calidad del contenido.

Con este escenario, resulta interesante el empleo de métodos analíticos potentes para detectar de forma segura si el producto comercializado cumple o no con la legislación. Los análisis descritos en este objeto de aprendizaje utilizan técnicas cromatográficas y pertenecen a los métodos oficiales recomendados por la legislación.

2.1 El perfil de ácidos grasos como la “huella dactilar” de un aceite.

El análisis de ácidos grasos de un aceite permite identificar los ácidos grasos presentes en una muestra y conocer en qué proporción están. Esta fracción constituye la “huella digital” del aceite debido a su gran importancia desde el punto de vista biológico y sus componentes pueden ser utilizados para la autenticación y caracterización de un aceite (Tabla 1).

Esta última fracción está formada por componentes menores, que pueden variar tanto cualitativa como cuantitativamente en función de la variedad, condiciones climáticas los procedimientos de extracción, las condiciones de almacenamiento, etc.

El aceite de oliva, como todos los aceites vegetales, está constituido por dos grupos de compuestos: mayoritarios y minoritarios. La fracción mayoritaria, que se compone principalmente de triglicéridos, diglicéridos, ceras y ácidos grasos libres, representa más del 98%, mientras del 2% del aceite corresponde a la fracción minoritaria.

Tabla 1. Porcentaje de ácidos grasos de algunos aceites

Ácido graso	Tipo de aceite			
	Oliva	Soja	Girasol	Maíz
C12:0	< 0,05	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C14:0	< 0,05	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C16:0	7-8	7-12	5-18	9-17
C16:1	0,3-3	< 0,5	<0,2	< 0,2
C18:0	0,5-5	2-5	3-7	1-3
C18:1	61-83	20-35	15-38	22-40
C18:2	2-18	45-60	50-72	45-65
C18:3	< 1,5	5-10	< 0,2	< 1,5
C20:0	< 0,5	< 1	< 0,6	< 1
C20:1	-	-	< 0,3	-
C22:0	-	< 0,5	< 1	< 0,1

3 Objetivos

Con este objeto de aprendizaje se persigue que los alumnos sean capaces de:

- Aplicar la cromatografía gaseosa (CG) para detectar fraudes y adulteraciones mediante la identificación de una grasa o aceite.
- Identificar y cuantificar los ácidos grasos mayoritarios de una muestra de grasa o aceite analizando los cromatogramas obtenidos a partir de la técnica de CG y utilizarlos como herramienta para la autenticación de la grasa o aceite ("huella dactilar").

4 Desarrollo

4.1 Fundamento del análisis

La identificación de los ácidos grasos presentes en una muestra de grasa se basa en la liberación y transformación de los ácidos grasos en los correspondientes ésteres metílicos y en el posterior procesamiento de estos mediante CG. La cromatografía de gases es la técnica que se utiliza usualmente para el análisis cuantitativo de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos se preparan según se describe en el apartado 4.3.1. A continuación, se inyectan y evaporan dentro del inyector del cromatógrafo. La separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos se lleva a cabo en columnas analíticas de polaridad y longitud específicas. Para detectar los ésteres metílicos de ácidos grasos se utiliza un detector de ionización de llama (DIL). Las condiciones del análisis figuran en el apartado 4.3.2.

Como gas portador (fase móvil) puede utilizarse hidrógeno o helio. El hidrógeno acelera la separación y produce picos más fuertes. La fase estacionaria es una capa microscópica de una fina película líquida en una superficie sólida inerte de sílice fundida. A medida que pasan a través de la columna capilar, los

compuestos volatilizados que se analizan interactúan con la fase estacionaria recubriendo la superficie interior de la columna. Debido a la distinta interacción de los compuestos, estos se eluyen en momentos diferentes, lo que se conoce como tiempo de retención del compuesto para un conjunto determinado de parámetros de análisis. La comparación de los tiempos de retención con patrones se utiliza para identificar los diferentes compuestos.

4.2 Material y reactivos

Para llevar a cabo el análisis de autenticidad que se describe en este artículo se necesitará el siguiente material:

Material e instrumentación:

- Balanza analítica
- Varilla de vidrio
- Vórtex
- Tubo de 5mL con tapa de rosca provista de junta de PTFE
- Cuentagotas
- Vaso de precipitados de 100 mL
- Placa calefactora con agitación
- Micropipetas
- Equipo: cromatógrafo de gases

Reactivos químicos:

- Metanol
- Heptano para cromatografía.
- Hidróxido de potasio, solución metanólica de aproximadamente 2 M: disolver 11,2 g de hidróxido potásico en 100 mL de metanol.

4.3 Procedimiento experimental

4.3.1. Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos

La preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva se lleva a cabo por transesterificación con solución metanólica de hidróxido de potasio a temperatura ambiente.

Pesar 0,1g de aceite (3 gotas) en un tubo de rosca de 5 mL de volumen. Añadir 2 mL de heptano y agitar en vortex durante 30 segundos. Añadir 0,2 mL de la solución metanólica de hidróxido potásico, poner el tapón, cerrar muy bien y agitar de nuevo durante 30 segundos. Dejar reposar hasta que la parte superior de la solución quede clara. Decantar la parte superior que es la que contiene los esteres metílicos.

Pinchar en el cromatógrafo 1 μ L de la solución de heptano.

4.3.2. Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gases

A continuación se detallan condiciones de trabajo generales para utilizar la cromatografía de gases en columna capilar para determinar la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos según se describe en el apartado anterior. Para más detalle se puede consultar la legislación (REGLAMENTO UE 2015/1833).

Condiciones del ensayo cromatográfico

- Temperatura del inyector: 250°C
- Temperatura del detector: 250°C
- Temperatura del horno: de 165 °C (8 min) a 210 °C a 2 °C/min.
- Gas portador hidrógeno: presión en la cabeza de la columna, 179 kPa
- Flujo total: 154,0 ml/min
- Relación de fraccionamiento: 1:100
- Volumen de inyección: 1 µL

Patrón de referencia

Utilizar una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos puros, o los ésteres metílicos de una grasa de composición conocida y, preferentemente, similar a la de la materia grasa objeto de análisis.

4.4 Resolución de un supuesto práctico

Vamos a imaginar que tenemos que comprobar la autenticidad de dos muestras de aceite (Muestras 1 y 2) comercializadas como aceite de oliva. El primer paso es preparar las muestras y pincharlas en el cromatógrafo de gases según hemos explicado en el apartado 4.3.1 y 4.3.2, respectivamente. Los cromatogramas obtenidos que funcionarán como “huella dactilar” de las muestras aparecen en las Figuras 2 y 3. Por otra parte, en figura 4 se muestran los cromatogramas de los patrones de ácidos grasos puros utilizados de referencia.

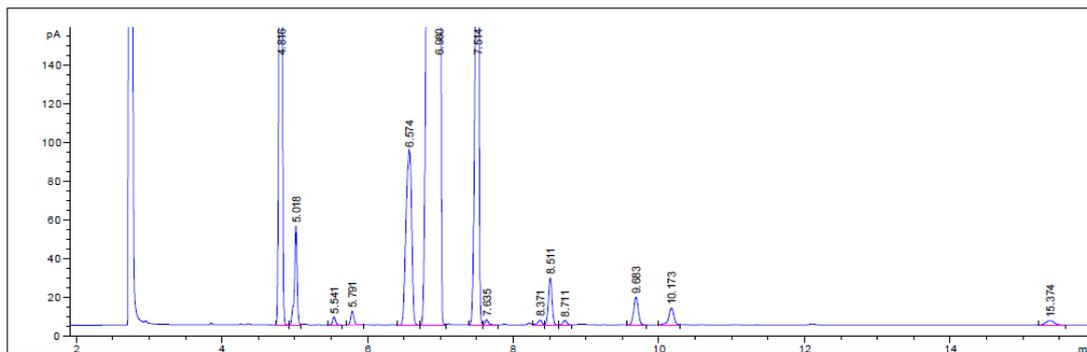


Figura 2. Cromatograma con el perfil de ácidos grasos de la muestra 1

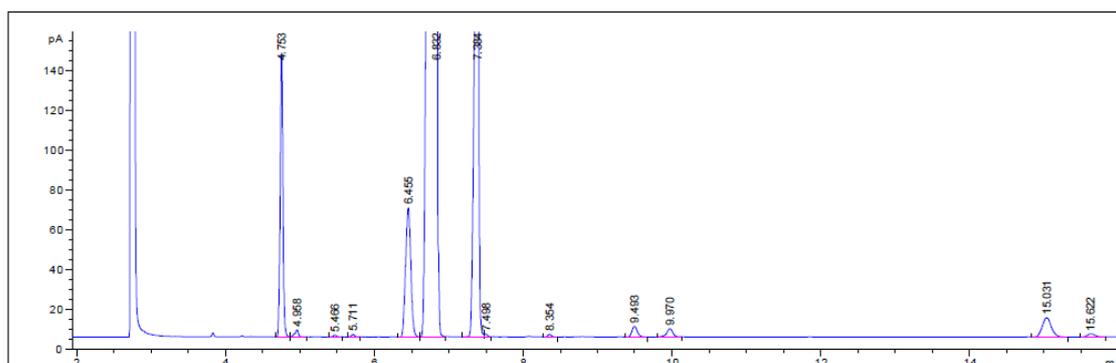


Figura 3. Cromatograma con el perfil de ácidos grasos de la muestra 2

a) Perfil cualitativo de ácidos grasos

Los picos de los cromatogramas de las muestras obtenidos se identifican con los correspondientes ácidos grasos de a cuerda con sus tiempos de retención (t_R). La identificación se realiza por comparación con los cromatogramas obtenidos con sustancias de referencia en las mismas condiciones (figura 4).

Observando la tabla 3, identificamos para cada muestra los cuatro ácidos grasos mayoritarios, es decir los que tengan mayor área de pico. Comparando el t_R de los ácidos grasos de las muestras con el t_R de los patrones podemos identificar de qué ácidos grasos se trata. Así para ambas muestras observamos que los ácidos grasos mayoritarios son: C16:0 (ácido palmítico); C18:0 (ácido esteárico); C18:1 (ácido oleico) y C18:2 (ácido linoleico).

¿Quiere esto decir que ambas muestras proceden del mismo aceite vegetal? Para contestar a esta pregunta vamos a estudiar el perfil cuantitativo de estos ácidos grasos.

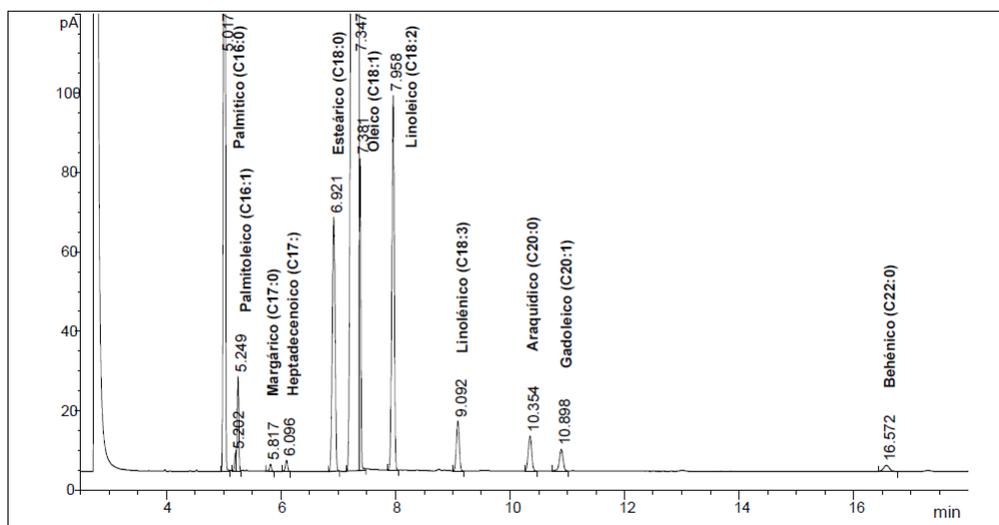


Figura 4. Cromatograma con el perfil de ácidos grasos de los patrones

b) Perfil cuantitativo de ácidos grasos

Una vez tenemos identificados los t_R de los cromatogramas, se examinan y se miden las áreas de los picos. Estos parámetros nos los proporciona el equipo cromatográfico. Para las muestras de este ejemplo los datos aparecen en la tabla 2.

Tabla 2. Datos obtenidos en el análisis cromatográfico

	Muestra 1		Muestra 2	
	Tiempo retención (min)	Área pico	Tiempo retención (min)	Área pico
C14:0	-	-	3,854	7,34
C16:0	4,816	1171,34	4,753	653,64
C16:1	5,018	91,51	4,958	12,71
C17:0	5,541	6,56	5,466	5,59
C17:1	5,791	11,18	5,711	3,67
C18:0	6,574	356,84	6,455	420,94
C18:1	6,98	8490,64	6,832	3166,32
C18:2	7,514	711,2	7,384	6253,75
C18:3	8,511	72,87	8,354	9,12
C20:0	9,683	53,09	9,493	30,7
C20:1	10,173	36,05	9,97	24,44
C22:0	15,374	14,54	15,031	78,13
C24:0	24,94	5,39	15,62	27,69

Ahora vamos a calcular la composición porcentual de la mezcla de ácidos grasos. Esta composición porcentual (AG) se obtiene refiriendo la superficie de cada pico (P_i) a la superficie total, suma de la de todos ellos ($\sum_i P_i$):

$$(\%) AG_i = \frac{P_i}{\sum_i P_i} \times 100 \quad (\text{Ec.1})$$

Siendo:

AG_i = fracción del componente i en la mezcla de ácidos grasos

P_i = superficie del pico correspondiente

Para cada uno de estos ácidos grasos mayoritarios identificados en ambas muestras de aceite, calculamos la composición porcentual AG (tabla 3) de los cuatro ácidos grasos mayoritarios según la ecuación 1 y compararemos los valores obtenidos con la tabla 3. ¿Qué aceites crees que son?

Tabla 3. Perfil cuantitativo de los ácidos grasos mayoritarios de las muestras

Ácido graso	Muestra 1 % AG_i	Muestra 2 % AG_i
C16:0	10,6	6,1
C18:0	3,2	3,9
C18:1	77	29,6
C18:2	6,5	58,5

De esta manera podremos identificar de qué aceite se trata. En nuestro caso, dilucidamos que la muestra 1 sí es aceite de oliva, mientras que la muestra 2 es aceite de girasol. Habríamos detectado que estaban intentado de manera fraudulenta hacernos pasar una muestra de aceite de girasol por aceite de oliva!

5 Cierre

En este objeto de aprendizaje se ha descrito el procedimiento para obtener los ésteres metílicos de ácidos grasos de aceites de oliva y el posterior análisis mediante la técnica de cromatografía gaseosa, tal y como se indica en la correspondiente legislación. Además, mediante un ejemplo práctico se ha explicado cómo obtener el perfil cualitativo y cuantitativo de ácidos grasos para poder identificar un posible fraude de autenticidad a partir de los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico de dos muestras de aceite supuestamente de oliva.

6 Bibliografía

- [1] Aparicio, R., Harwood, J. (eds). (2013). Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. Springer: New York, USA.
- [2] Norma UNE-EN ISO 9000:2015. Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario.
- [3] Reglamento (CEE) 2568/91, de la Comisión, de 11 de julio (DOCE L 248, de 05.09.1991), relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- [4] Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1833, de 12 de octubre de 2015 (DOUE L 266, de 13.10.2015) por el que se modifica el Reglamento (CEE) 2568/91.
- [5] Real Decreto 895/2013, de 15 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 1431/2003, de 21 de noviembre, por el que se establecen determinadas medidas de comercialización en el sector de los aceites de oliva y del aceite de orujo de oliva.
- [6] Reglamento de Ejecución (UE) 2019/1604 de la Comisión, de 27 de septiembre de 2019, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n.º 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.