

Memoria de prácticas
en empresa /institución

QORTEBA
INTERNACIONAL S.L.

DESARROLLO DE PROTOCOLO ALTERNATIVO PARA
LA DETERMINACIÓN DE CERAS EN ACEITES DE OLIVA
MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y
CROMATOGRAFÍA DE GASES
2020/2021

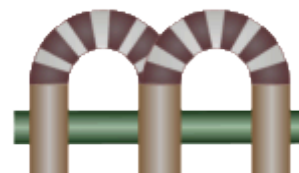
Alumno:

Juan Francisco Alba Valle

Del 01/04/2021 al 30/09/2021

Tutor Docente: Prof. Dr. Rafael Gómez Díaz

Tutor Laboral: Dña. M^a Victoria Girón Fernández



Contenido

QORTEBA INTERNACIONAL S.L. / Juan Francisco Alba Valle	3
Antecedentes	3
Objetivos generales.....	5
Descripción de la actividad realizada	5
Valoración personal de la utilidad de la estancia.....	7
Desarrollo de actividad científica	7
1. INTRODUCCIÓN	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4. CONCLUSIONES	24
5. PROPUESTAS	25
Agradecimientos	25
Bibliografía	25
ANEXO I	28

QORTEBA INTERNACIONAL S.L. / Juan Francisco Alba Valle

Antecedentes

La empresa Qorteba Internacional S.L. nace en el año 2013 como producto de la asociación de la filial de Aceites Toledo “Refinería Andaluza” y la empresa DCOOP, cada una con la mitad de los activos. Esta se encuentra situada en el punto kilométrico 389 de la carretera Madrid-Cádiz en lo que eran las antiguas instalaciones de “Refinería Andaluza”. Las principales actividades que desempeñan son la refinación de aceites de categoría lampante y el almacenamiento y distribución de aceites vegetales a granel para ambas empresas socias. También actúan como laboratorio analítico de los aceites generados y almacenados en la empresa, así como, de los aceites de la empresa envasadora Mercaoleo. Además, comercializan como subproductos del proceso de refinado ácidos grasos libres destilados (escualeno) principalmente dirigidos a la industria cosmética.

Con el fin de contextualizar el marco operacional de las refinerías de aceite de oliva se destaca que las previsiones para la temporada 2020/21 estiman una producción total de aceite de oliva de 3.197.000 toneladas según datos del Consejo Oleícola Internacional [1], de los cuales el 31,69% es categorizado como lampante [2], aceite no apto para el consumo destinado a refinería o a usos técnicos. Dadas estas dimensiones de producción las actividades desempeñadas por las refinerías como Qorteba Internacional S.L. constituyen un eje esencial de la cadena de producción de aceite y un pilar fundamental para el sector oleícola, el cual contribuye con un 0,6% al PIB nacional y genera más de 220 mil empleos (directos e indirectos) según estudios realizados por el analista Juan Vilar [2].

“El aceite de oliva virgen lampante es el aceite obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, y que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado, y cuyas características fisicoquímicas u organolépticas son tales que no es apto para el consumo en la forma en que se obtiene” [3]. El proceso de refinado por el cual se transforman estos aceites para que sean aptos para el consumo eliminan la acidez, el color, sabor y olor sin alterar la fracción glicérica de los mismos generando un producto con poco interés para el consumidor. Por ello, se mezcla con otros aceites de oliva de categoría virgen o virgen extra que les aportan las propiedades organolépticas adecuadas para que puedan ser comercializados como aceites de oliva.

Existen dos tipos de procesos de refinado el químico y el físico, siendo este último el desarrollado por la empresa. Dicho proceso consta de la siguientes etapas: depuración, decoloración, destilación neutralizante, desodorización, filtrado final y almacenamiento. Este proceso viene detallado en el diagrama de flujo de la *Figura 1*.

Por último, resaltar que la refinería de Qorteba Internacioal S.L. procesa unos 300.000 kg de aceite de forma diaria, llegando a gestionar sobre 90.000 toneladas en el ejercicio anual anterior y presentando una capacidad de almacenaje de 52.000 toneladas.

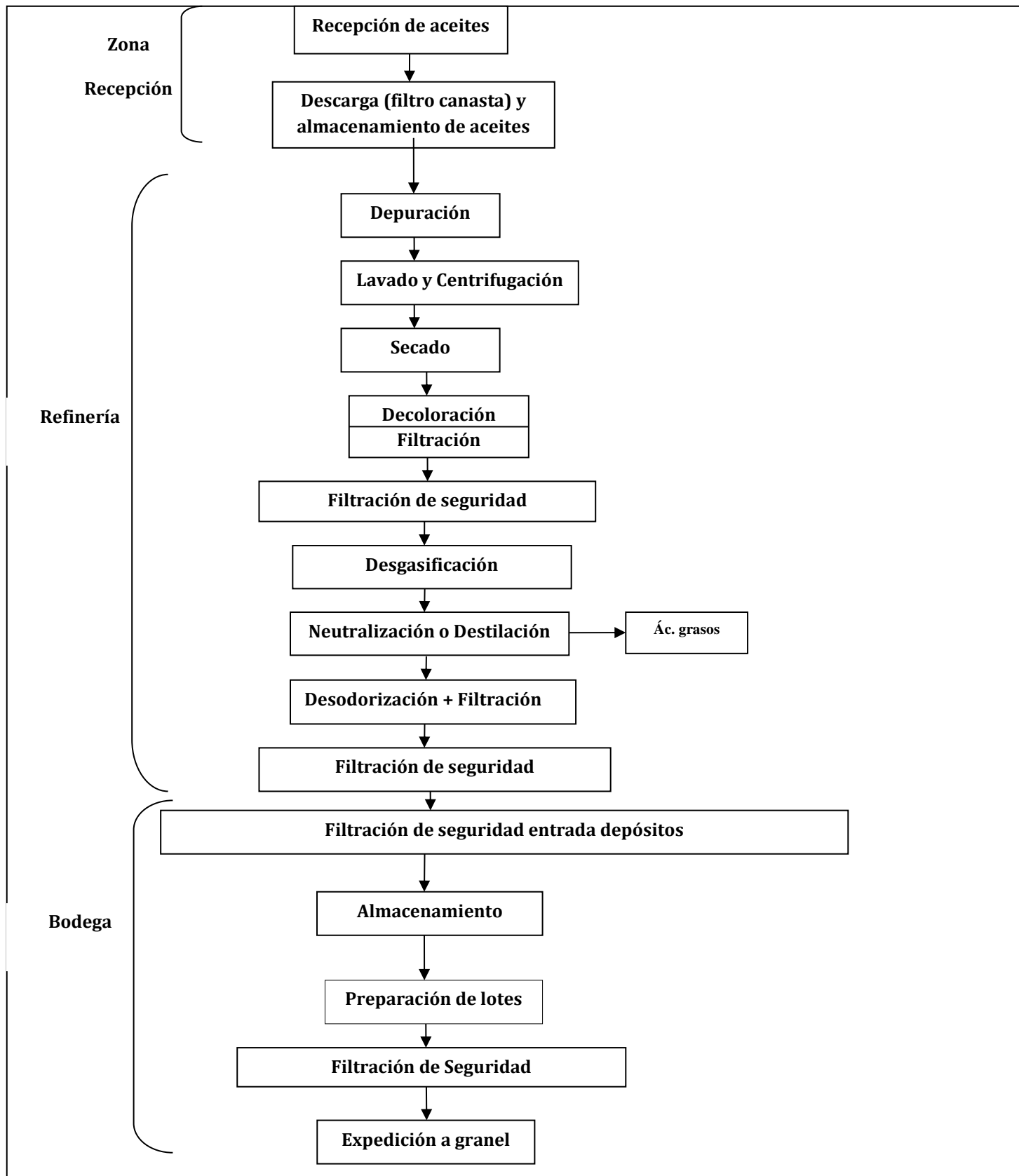


Figura 1: diagrama de flujo del proceso de refinado de aceite de oliva de la empresa Qorteba Internacional S.L.

Objetivos generales

El principal objetivo de la estancia de prácticas realizadas fue servir de apoyo al laboratorio de Qorteba Internacional S.L.

Descripción de la actividad realizada

Durante mi estancia de prácticas en Qorteba Internacional S.L. he desempeñado la labor de analista de laboratorio. Mi función ha sido colaborar en todo lo posible para el correcto funcionamiento del laboratorio. Las tareas desempeñadas fueron control de stock de reactivos y materiales y realización de análisis fisicoquímicos de aceites. Los análisis desempeñados estaban destinados a la determinación de parámetros de calidad y pureza regidos por el Reglamento N° 2568/91 de la Comisión Europea con última modificación el 27 de septiembre de 2019 [4]. Además, he colaborado en la determinación de otros parámetros establecidos por políticas internas y otros reglamentos en base a sus respectivas normas ISO. A continuación, se especifican los diferentes análisis realizados a modo de tarea:

- Tarea 1: Determinación de humedad.
- Tarea 2: Determinación de impurezas no volátiles.
- Tarea 3: Determinación del índice de peróxidos.
- Tarea 4: Determinación del color.
- Tarea 5: Determinación del coeficiente de extinción molar en el ultravioleta.
- Tarea 6: Determinación del contenido de hidrocarburos alifáticos.
- Tarea 7: Determinación del contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- Tarea 8: Validación de un método alternativo para la determinación de ceras.
- Tarea 9: Determinación del contenido de ceras y ésteres etílicos.
- Tarea 10: Determinación del porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo.
- Tarea 11: Determinación de escualeno en ácidos grasos destilados.
- Tarea 12: Determinación de acidez.
- Tarea 13: Determinación de ácidos grasos en frío.
- Tarea 14: Determinación de la presencia de jabones.

El control de materiales y reactivos fue una tarea implementada durante toda la estancia sobre los análisis desempeñados en el momento. El resumen de los protocolos reglados adaptados a las condiciones de trabajo del laboratorio, así como su razón de aplicación quedan recogidos en el *Anexo I*. El cronograma detallado sobre la actividad realizada durante el periodo de prácticas queda recogido en la *Tabla 1*.

Tabla 1: cronograma de la actividad realizada durante las prácticas.

	01-04/ 15-04	16-04/ 30-04	01-05/ 15-05	16-05/ 31-05	01-06/ 15-06	16-06/ 30-06	01-07/ 15-07	16-07/ 31-07	01-08/ 15-08	16-08/ 31-08	01-09/ 15-09	16-09/ 30-09
Tarea 1												
Tarea 2												
Tarea 3												
Tarea 4												
Tarea 5												
Tarea 6												
Tarea 7												
Tarea 8												
Tarea 9												
Tarea 10												
Tarea 11												
Tarea 12												
Tarea 13												
Tarea 14												

Valoración personal de la utilidad de la estancia

Mi estancia de prácticas en Qorteba Internacional S.L. ha supuesto un ejercicio esencial para mi formación académica y desarrollo profesional. En ella he reforzado y ampliado mis conocimientos en el ámbito de la química analítica y la industria del aceite adquiridos durante mi formación universitaria de máster. En este periodo he aprendido a utilizar normativas europeas y estándares internacionales de aplicación sobre productos alimentarios, a interpretar e implementar protocolos de análisis de forma autónoma, así como, a realizar de forma adecuada numerosas técnicas analíticas, pero sobre todo he adquirido competencias profesionales como organización, gestión del tiempo, responsabilidad laboral, trabajo en equipo o gestión del estrés. Adicionalmente, las actividades analíticas cromatográficas desarrolladas han supuesto un descubrimiento sobre el que me gustaría seguir creciendo y formándome.

Por último, resaltar que gracias a la confianza depositada en mí por parte de M^a Victoria Girón aparte de ejercer la función de analista de apoyo he podido desarrollar la tarea de validar un protocolo alternativo con posible uso en el laboratorio. Los resultados de dicha actividad quedan recogidos en el siguiente apartado.

Desarrollo de actividad científica

Abstract: The evaluation of the content of waxes and Fatty Acid Ethyl Esters is request both by IOC Trade Standard and by Regulation (EEC) 2568/91 and its further amendments. The official method uses 15 g of silicic acid and elutes several fractions by using huge volumes of dangerous solvent (n-hexane). The study by *Milani et. Al* (2020) have reported an alternative method that reduces the amount of reagents and uses less toxic solvent such as isooctane by SPE. From Qorteba Internacional S.L. we have decided make a “home validation” (precision, accuracy and uncertainly) to evaluate the capacity of application of this method in our company.

Keywords: waxes, fatty acid ethyl esters, SPE, gas chromatography & olive oil.

1. INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva en sus categorías destinadas al consumo es uno de los aceites vegetales más valorados en el mundo debido a sus propiedades organolépticas y saludables. Esto es reflejado en sus altos precios en el mercado y lo convierte en objetivo de fraude. Ante tal situación los diferentes organismos reguladores han desarrollados numerosos métodos para la caracterización de estos aceites y poder combatir las distintas posibilidades de fraude.

El 29 de enero de 1993 La Comisión Europea (CEE) mediante el Reglamento N^o 183/93 [5] modificaba el Reglamento N^o 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva e introducía un nuevo parámetro, el contenido en ceras. Estos compuestos sintetizados en la células epidérmicas de las olivas consisten en ácidos grasos esterificados con alcoholes de cadenada larga de similar longitud, los más abundantes en el aceite de oliva presentan entre 36 y 46 carbonos. Su análisis es de relevancia debido a que su concentración varía en función de la categoría de aceite que se trate y constituye un nuevo parámetro de calidad y pureza. Desde su implementación en 1993 las concentraciones permitidas para estos compuestos han sido modificadas, siendo la última la realizada en el Reglamento (CEE) N^o 1348/2013 [6] por la que se establecen un máximo de 150 mg/kg (C₄₂ + C₄₄

+ C₄₆) en aceites de categoría virgen extra (AOVE) y virgen (AOV), de 300-350 mg/kg (C₄₀ + C₄₂ + C₄₄ + C₄₆) para lampantes (AOL) y de 350 mg/kg (C₄₀ + C₄₂ + C₄₄ + C₄₆) para refinados (AOR) y de oliva (AO).

En el caso de los aceites de los aceites vírgenes lampante que presentan un contenido alto de ceras (300-350) es necesario la determinación del contenido de alcoholes y eritrodioles para constatar dicha categorización. En aquellos lampantes que presenten un contenido de alcoholes y eritrodioles igual o inferior al 3,5% se considerará como aceptable un nivel de ceras de hasta 350 mg/kg. En caso de que sea superior se categorizará como orujo crudo de oliva. Adicionalmente se ha demostrado que el contenido de ceras puede aumentar durante el tiempo de almacenaje, por lo que la determinación de estos parámetros se ha de realizar previamente a su almacenamiento [7] y se debe controlar regularmente.

El 24 de enero de 2011 el Reglamento (CEE) Nº 2568/91 fue modificado nuevamente por el Reglamento (UE) 61/2011 [8] para la introducción de un parámetro de calidad adicional relativo a los aceites de oliva vírgenes extra, los ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos. Estos compuestos se producen por la esterificación de los alcoholes de cadena corta formados en los procesos de degradación y fermentación en aceitunas de baja calidad (metanol y etanol) con ácidos grasos libres, y por tanto son un indicador directo de defectos sensoriales. Sin embargo, dado que los procesos de fermentación no están vinculados a la formación de ésteres metílicos estos fueron descartados como indicador asociado a estos defectos. En la actualidad la concentración máxima permitida para el total de los ésteres etílicos (etil-palmitato, etil-oleato, etil-linoleato y etil-estearato) es de 35 mg/kg, establecida por el Reglamento (UE) Nº 1348/2013 [6]. Este parámetro de calidad permite detectar además acciones fraudulentas como la deodorización suave, proceso tecnológico que reduce los defectos organolépticos del aceite de oliva virgen con la finalidad de mezclarlo y comercializarlo como virgen extra.

El método oficial establecido por el Consejo Oleícola Internacional (COI) [9] permite la determinación simultánea de los parámetros anteriormente descritos y consiste en una separación previa por cromatografía líquida y su posterior análisis en cromatografía de gases. Los inconvenientes que presenta este método son el uso de grandes cantidades de reactivos, 15 g de sílice y unos 360 ml de n-hexano, disolvente neurotóxico con sospechosos efectos sobre la fertilidad (H361f, H373). Además de requerir grandes cantidades de tiempo que dificultan su desempeño de forma sistemática. Ante tal situación el COI validó una alternativa que reducía la cantidad de reactivos requeridos en la cromatografía líquida a 3 g de sílice y unos 60 ml de n-hexano [10].

Atendiendo a la literatura científica existen estudios que han reportado como alternativa a la cromatografía líquida para la determinación de ceras la extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de 1 g de sílice que consiguen simplificar el proceso y disminuir el tiempo y los volúmenes de disolvente empleados. El primero que se propuso empleaba tetracloruro de carbono [11], disolvente altamente contaminante. El segundo, se plantea como una buena alternativa al emplear tan solo 20 ml de isooctano [12], disolvente de menor toxicidad. Si bien los niveles de recuperación para ceras reportados por este método parecen satisfactorios, aún no existe información acerca de su precisión y exactitud. Además, en dicho estudio se reporta la extracción simultánea de los ésteres etílicos, aunque no se aportan datos sobre su

cuantificación. Todo ello lo convierte en una alternativa prometedora a los métodos estipulados por el Consejo Oleícola Internacional.

2. OBJETIVOS

Desde Qorteba Internacional S.L. como empresa referente del sector oleícola que apuesta por el desarrollo se ha decidido validar de forma interna el método propuesto por *Milani et al.* (2020) [12] para evaluar su posible aplicación en la determinación de ceras y ésteres etílicos, con algunas modificaciones adecuadas a las condiciones de trabajo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS

Isooctano, dietiléter, n-heptano (pureza > 99%). Mix de patrón de ceras (lauril-araquidato) y ésteres etílicos (metil-heptadecanoato) a 100 µg/ml en isooctano.

3.2 MATERIALES DE LABORATORIO Y EQUIPOS

Materiales. Vaso de precipitado de 10 ml, pipetas graduadas de 1 y 10 ml, microjeringa de 100 µl, jeringa de plástico de 10 ml desechable, matraz Erlenmeyer esmerilado de 250 ml (14/23), matraz esmerilado de corazón de 25 ml (14/23), cartucho SPE Bond Elut Jr-SI, 1000 mg (Agilent Technologies, item no.: AG12166008B).

Equipos de laboratorio. Balanza analítica de precisión ± 0,1 mg. Rotavapor. Cromatógrafo de gases equipado con inyector automático “On-column” y detector de ionización de llama (FID) (Perkin Elmer Autosystem Gas Chromatography). Pre-columna de sílice fundida desactivada, 25 cm x 0,3 mm x 0,67mm (Agilent, Partnumber: 160-2865-5). Columna cromatográfica 95%-Dimetil-5%-difenílpolisiloxano, 15 m x 0,32 mm x 0,10 µm (Teknokroma TR5HT).

3.3 MÉTODOS

Los matraces Erlenmeyer y de corazón esmerilados actúan como soporte del cartucho durante el proceso de elución. Los diferentes volúmenes de elución y de muestra serán transferidos al cartucho mediante una jeringa de plástico y se ajustará la presión ejercida a un flujo de 2 gotas por segundo.

Separación por SPE. (1) Se coloca el cartucho sobre el matraz Erlenmeyer esmerilado y se acondiciona con 5 ml de isooctano; (2) se pesa 50 mg ± 0,1 de aceite en un vaso de precipitado, se añaden 100 µl de patrón interno con una microjeringa y se disuelven en 500 µl de isooctano. Se transfieren al cartucho; (3) adicionalmente se lava el vaso de precipitado con 1 ml de disolución isooctano-éter (99:1) y se transfiere al cartucho, esta acción se realiza por duplicado para asegurar que no queda muestra adherida al vaso; (4) se introducen directamente al cartucho 4 ml de la mezcla isooctano-éter que son descartados; (5) se repite la acción anterior con 8 ml que son recogidos en un matraz esmerilado de corazón (tras la elución no se debe ejercer presión para extraer el volumen retenido en la columna); (6) la fracción resultante contiene las ceras y los ésteres etílicos, esta es evaporada en un rotavapor, soplada con una fuente de nitrógeno para eliminar posibles restos de disolvente y reconstituida con 200 µl de n-heptano.

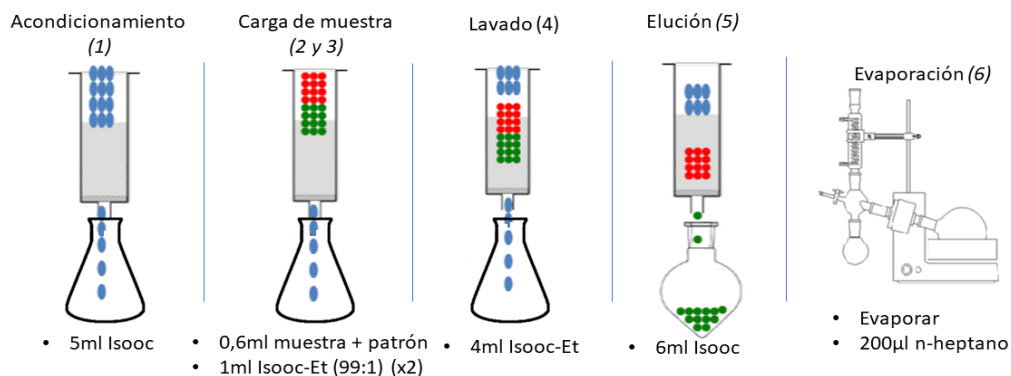


Figura 2: esquema del procedimiento de extracción en fase sólida (SPE)

Análisis cromatográfico (On-column). El método es el establecido en el método oficial [9].

Tabla 2: Rampa de temperaturas del método cromatográfico.

Rampa del horno	Velocidad °C/min	Temperatura °C	Mantenimiento °T/min
Inicial	0,00	80,0	1,00
1	20,0	140	0,00
2	5,00	325	6,00
3	20,0	340	20,0

Tª Máxima del horno: 350 °C; *Tª* detector: 350 °C; Carrier: H₂ a 9 Psi; Tiempo de análisis: 67 min; Volumen de inyección: 1 µl.

Cuantificación de parámetros. Las concentraciones de ésteres etílicos y ceras se calculan con la siguiente fórmula.

$$C_x \text{ (ceras/ésteres) mg/kg} = \frac{A_x * M_s * 1000}{A_s * M} \text{ (Ec. 1)} = \frac{A_x * 2000}{A_s} \text{ (Ec. 1.1)}$$

A_x = Área del pico a determinar.

A_s = Área del pico del patrón interno.

M_s = masa del patrón (mg).

M = Masa de la muestra (g).

Nota 1: La forma de reintegración para el cálculo de las áreas de los picos de las ceras se debe reajustar diariamente en base a un análisis cromatográfico previo de una muestra control de la que se conoce su concentración exacta para compensar las variaciones aportadas por el equipo, patrón, preparación de muestra, analista etc.

3.4 VALIDACIÓN INTERNA

Los parámetros considerados para la validación interna del método fueron precisión intradiaria (% RSD_I) e interdiaria (% RSD_R), incertidumbre (U_{expandida}/ U_{relativa}) y exactitud (% de recuperación). Para la evaluación de estos parámetros las diferentes muestras se analizaron según los procedimientos anteriormente descritos mediante los ensayos que se detallan a continuación.

En la determinación de ceras ésteres se llevaron a cabo dos análisis de repetibilidad/reproducibilidad sobre materiales de referencia certificados. El primero fue

realizado sobre un aceite de oliva virgen extra (FC300, Food Chemistry QFCS) para la estimación de los parámetros de validación sin las ceras C₄₀. El segundo fue realizado sobre un aceite de oliva refinado (FC302, Food Chemistry QFCS) para el cálculo de estos incluyendo las ceras C₄₀.

En la determinación de ésteres etílicos de ácidos grasos se obtuvieron los datos del análisis de repetibilidad/reproducibilidad de la muestra de aceite de oliva virgen extra certificada (FC300, Food Chemistry QFCS), ya que su determinación es simultánea a las ceras.

Los análisis de repetibilidad/reproducibilidad consistieron en 5 repeticiones realizadas en 5 días distintos. Para la estimación de los parámetros anteriormente descritos se emplearon las ecuaciones que se detallan a continuación:

- Precisión intradiaria:

$$S_r = \sqrt{\frac{(n-1)S_1^2 + (n-1)S_2^2 + (n-1)S_n^2}{nt-1}} \quad (Ec. 2.1) \quad \%RSD_r = \frac{S_r}{\bar{x}} * 100 \quad (Ec. 2.2)$$

- Precisión interdiaria o intermedia:

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_1^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (Ec. 3.1) \quad \%RSD_R = \frac{S_R}{\bar{x}} * 100 \quad (Ec. 3.2)$$

Nota 2: se considerarán como precisiones general del método las RSD_R obtenidas, esto se debe a que tiene en cuenta una mayor fuente de variabilidad.

- Exactitud:

$$\text{Exactitud (\%)} = \frac{\mu - \bar{x}}{\mu} * 100 \quad (Ec. 4.1) \quad \% \text{ de recuperación} = \frac{\bar{x}}{\mu} * 100 \quad (Ec. 4.2)$$

- Incertidumbre (error del método):

$$U_{\text{precisión}} = \frac{S_R}{\sqrt{n_{\text{réplicas}}}} \quad U_{\text{homogeneidad}} = \frac{S_r}{\sqrt{n_{\text{ensayos}}}} \quad U_{\text{inexactitud}} = \frac{\bar{x} - \mu}{\sqrt{3}} \quad U_{\text{Material Referencia}} = \frac{U_{MR}}{k}$$

$$U_{\text{típica combinada}} = \sqrt{U_{\text{precisión}}^2 + U_{\text{homog}}^2 + U_{\text{inexact}}^2 + U_{MR}^2} \quad (Ec. 5.1)$$

$$U_{\text{expandida}} = K * U_{\text{típica combinada}} \quad (k=2, p < 0,05) \quad (Ec. 5.2)$$

$$U_{\text{relativa}} = \frac{U_{\text{expandida}}}{\mu} * 100 \quad (Ec. 5.3)$$

Estimados los parámetros de validación, se evaluó la veracidad o sesgo del método mediante un análisis estadístico.

Contraste t de Student-Fisher prueba de una muestra. Dicho test evalúa si existen diferencias significativas entre el valor real del material de referencia y la medida realizada, es decir, si el método está sesgado.

(Hipótesis nula) H₀: μ - \bar{x} = 0.

Para corroborar H_0 : $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabulada}}$, siendo t_{tabulada} la establecida para una distribución t de student de dos colas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) y n-1 grados de libertad. Mientras que $t_{\text{experimental}}$ se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$t_{\text{experimental}} = \frac{|\mu - \bar{x}|}{S_R} * \sqrt{n} \text{ (Ec. 6)}$$

3.5 COMPARACIÓN DE MÉTODOS

Con la finalidad de aportar más información sobre la aplicabilidad del método se decidió realizar un estudio comparativo con el método oficial (COI) [9] validado de forma interna por el laboratorio. Este estudio comparativo se basó en analizar muestras de trabajo rutinarias con los dos métodos para averiguar si existían diferencias significativas entre ambos tipos de mediciones.

Al tratarse de una refinería, las categorías de aceites con las que se trabajan son aceite de oliva, refinado y lampante. Por lo tanto, se realiza un estudio comparativo para cada una de estas categorías, dichos estudios se componen de 15 muestras de trabajo rutinarias analizadas por ambos métodos. Por otro lado, pese a que ninguna de estas categorías incluye los ésteres etílicos como parámetro de calidad, se analizaron los del estudio comparativo de aceite lampante. Esto se debe a que por políticas internas de Qorteba Internacional S.L., en ocasiones, se necesita determinar este parámetro. Las muestras rutinarias eran analizadas por ambos métodos en el mismo día con la finalidad de evitar variaciones en la medición ajenas a los propios métodos.

Para constatar si existen diferencias entre los métodos se aplican dos análisis estadísticos sobre los resultados del estudio comparativo.

Contraste t para datos emparejados. Se trata de un contraste de hipótesis donde se supone que las diferencias entre las medidas siguen una distribución normal en el rango de concentraciones analizado y por tanto en caso de que la única fuente de variación fuesen errores aleatorios la media de las diferencias (\bar{d}) entre las mediciones realizadas por ambos métodos sería 0.

$$\text{(Hipótesis nula) } H_0: \bar{d} = 0.$$

Para corroborar H_0 , $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabulada}}$, siendo t_{tabulada} la establecida para un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) y n-1 grados de libertad en una distribución t de student de dos colas ($t_{0,975,14} = 2,145$) y $t_{\text{experimental}}$ la obtenida mediante la siguiente ecuación [13]:

$$t_{\text{experimental}} = \bar{d} * \frac{\sqrt{n}}{S_d} \text{ (Ec. 7)}$$

Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados. Se realiza una recta de regresión lineal donde se toman como valores x_i los obtenidos por el método oficial y como valores y_i los obtenidos por el nuevo método. La situación ideal al representar los resultados obtenidos por dos métodos sin diferencias en las medidas daría como resultado una gráfica lineal de pendiente $m = 1$ y de ordenada en el origen $n = 0$.

Esta situación no sucede en la realidad debido a los errores aleatorios. Por lo que estimada la recta de calibrado es necesario calcular los errores de la pendiente (S_a) y la ordenada en el origen

(S_b) para establecer los límites de confianza y averiguar si m y n son significativamente diferentes de 1 y 0 respectivamente.

$$\text{Límites de confianza: } m \pm t(n-2) * S_a \text{ (Ec. 8.1)} \quad n \pm t(n-2) * S_b \text{ (Ec. 8.2)}$$

t = establecida en una distribución t de student de dos colas para un intervalo de confianza del 95% (p < 0,05) y n-2 grados de libertad [13].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CERAS

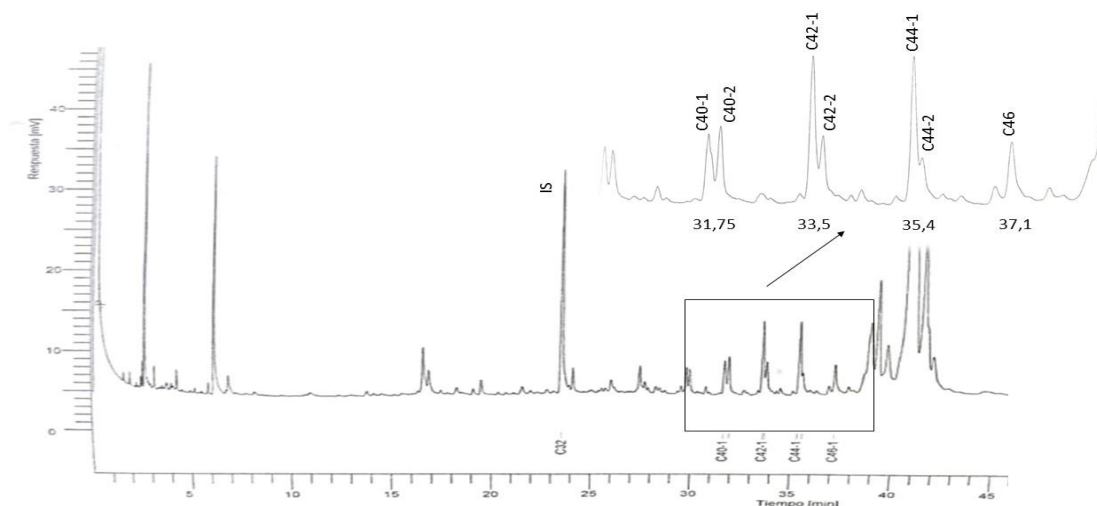


Figura 3: cromatograma de aceite de oliva refinado obtenido por el nuevo método. Identificación de los picos de las ceras en base a su número de carbono. IS (patrón interno) lauril-araquidato.

Ensayos repetibilidad/reproducibilidad.

Los resultados obtenidos para el ensayo de repetibilidad/reproducibilidad de la muestra FC300 con un valor de ceras (μ) de 112 mg/kg (sin C₄₀) quedan recogidos en la *Tabla 3*. Como paso previo a la determinación de los parámetros de validación internos se aplica el test simple de Grubbs para la detección de datos atípicos o aberrantes [14]. Este test se aplica sobre los resultados obtenidos.

Tabla 3: Resultados ensayo de repetibilidad/reproducibilidad FC300. Los datos de color verde son aceptados por el test de Grubbs.

AOVE (FC300)					
[C ₄₂ +C ₄₄ +C ₄₆] mg/kg	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Repetición 1	115,7	111,5	111,5	110,5	116,9
Repetición 2	117,3	103,7	126,6	120,2	114,8
Repetición 3	115,6	117,1	124,9	110,3	113,8
Repetición 4	114	118,3	117,1	116,1	115,1
Repetición 5	112,2	118,6	119,8	116	111,1
Media \bar{x}	114,96	113,84	119,98	114,62	114,34
SD	1,93	6,35	6,09	4,21	2,13
\bar{x} total	115,55				

Los resultados de la estimación de los parámetros de validación interna para ceras vírgenes quedan recogidos en la *Tabla 4*.

Tabla 4: parámetros de validación del método para la determinación de ceras sin C_{40} .

Precisión		Exactitud		Error del método	
RSD _r (%)	3,59	Exactitud (%)	3,17	U _{exp} (ppm)	116 ± 10,783
RSD _R (%)	4,10	% Recuperación	103,17	U _{relativa} (%)	9,628
Horwitz (%)	7,865				

Precisión (sin C_{40}). La RSD_r obtenida fue de 3,59% y se consideró como satisfactoria al ser muy cercana a la obtenida por el método oficial 3,4% para una muestra de AOVE con contenido similar de ceras (120 mg/kg) [9]. La RSD_R obtenida fue de 4,10% y se consideró como satisfactoria al ser considerablemente menor que el 11,7% obtenido por el método oficial para la muestra anteriormente descrita. No obstante, esta mejora sustancial de la precisión (RSD_R) es razonable teniendo en cuenta la mayor fuente de variabilidad de los estudios interlaboratorios empleados en la validación del método oficial.

Como criterio adicional de evaluación de la precisión se tuvo en cuenta el coeficiente de variación de Horwitz, dicho coeficiente estima las precisiones máximas permitidas para un método según el rango de concentración analizado [15]. La RSD_R máxima permitida para los 112 ppm de la muestra FC300 es 7,865%, por lo que se refuerza la conclusión anterior de que la precisión obtenida es satisfactoria.

Exactitud (sin C_{40}). La exactitud (%) obtenida por el método fue de + 3,17% y se consideró como satisfactoria usando como criterio el ± 15% de exactitud establecido para la validación de nuevos métodos [16].

Por otro lado, se obtuvo un % de recuperación de 103,17% donde se refleja que la exactitud del método es satisfactoria al presentar un valor cercano al 100% y, además también se refleja que el método tiende a sobre cuantificar el valor real de la muestra. Esta tendencia se ha de tener en cuenta junto con la incertidumbre a la hora de decidir sobre medidas muy ajustadas a los límites legislados (se retomará posteriormente).

Error del método (sin C_{40}). Se obtuvieron unas incertidumbres U_{expandida} y U_{relativa} de ± 10,783 ppm y 9,628% respectivamente. Estos parámetros representan un intervalo alrededor de una medición en el que se espera que se encuentre el valor que se podrían atribuir razonablemente al mensurando. El primero establece el intervalo bruto en cantidad de analito para la concentración analizada. El segundo representa el error real del método de forma porcentual, por lo que se puede estimar el intervalo de confianza para otras concentraciones.

Los resultados obtenidos para el ensayo de repetibilidad/reproducibilidad de la muestra FC302 con un valor de ceras (μ) de 306 mg/kg (con C_{40}) quedan recogidos en la *Tabla 5*, al igual que en el anterior ensayo los resultados obtenidos fueron sometidos al Test simple de Grubbs.

Tabla 5: Resultados ensayo de repetibilidad/reproducibilidad FC302. Los datos de color verde son aceptados por el test de Grubbs, los datos rojos son rechazados.

AOR (FC302)					
[C ₄₂ +C ₄₄ +C ₄₆ +C ₄₀]mg/kg	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Repetición 1	315	295,4	306,5	307,6	310,1
Repetición 2	317,5	310,1	307,6	312,6	302,9
Repetición 3	304,8	308,2	316	306,3	311,8
Repetición 4	261,9	312,7	318,8	308,3	316,2
Repetición 5	310,7	310,8	317,1	304,8	312,5
Media \bar{x}	312	307,44	313,2	307,92	310,7
SD	5,56	6,92	5,72	2,94	4,90
\bar{x} total	310,18				

Los resultados de la estimación de los parámetros de validación interna para ceras totales quedan recogidos en la *Tabla 6*.

Tabla 6: parámetros de validación del método para la determinación de ceras con C₄₀.

Precisión		Exactitud		Error del método	
RSD _r (%)	1,57	Exactitud (%)	+ 1,37	U _{exp} (ppm)	310 ± 15,997
RSD _R (%)	1,74	% Recuperación	101,37	U _{relativa} (%)	5,228
Horwitz (%)	6,761				

Precisión (con C₄₀). La RSD_r y RSD_R obtenidas fueron 1,57 y 1,74% respectivamente y se consideraron como satisfactorias al ser iguales o menores que las obtenidas por el método oficial de 1,5 y 4,6% para una muestra de aceite de oliva refinado con concentración de ceras similar (346 mg/kg) [9]. Adicionalmente la RSD_R del método oficial del laboratorio de Qorteba Internacional S.L. fue 1,7% para una muestra de aceite de oliva refinado de 363 mg/kg, lo que refuerza que la precisión obtenida es aceptable.

Las conclusiones anteriores son reforzadas por la RSD_R máxima establecida por Horwitz de 6,761% para los 306 ppm de la muestra FC302.

Exactitud (con C₄₀). La exactitud obtenida por el método para la determinación de ceras totales fue de + 1,37%, de nuevo un resultado satisfactorio acorde a lo estipulado anteriormente [16]. Atendiendo al % de recuperación de 101,37% se vuelve reflejar que la exactitud es satisfactoria y a observa la tendencia de sobre cuantificación por parte del método.

Error del método (con C₄₀). se obtuvieron unas incertidumbres U_{expandida} y U_{relativa} de ± 15,997 ppm y 5,228 (%) respectivamente.

Evaluación del sesgo (con y sin C₄₀). Obtenidos los parámetros de validación donde ya se observan tendencias de sobre cuantificación por parte del método para las determinación de ceras, se evalúa la veracidad o sesgo mediante un contraste t prueba de una muestra para

averiguar si el método presentaba algún tipo de error. Los resultados de dicho contraste quedan recogidos en la *Tabla 7*.

Tabla 7: resultados contraste t prueba de una muestra ensayos de reproducibilidad AOVE y AOR.

		Contraste t de student prueba de una muestra	
		AOVE	AOR
$t_{\text{experimental}}$		3,665	3,717
$t_{0,975,24}$	$t_{0,975,23}$	2,064	2,069
H_0		Rechaza	Rechaza

Los resultados del contraste de hipótesis revelan que existen diferencias entre las mediciones realizadas por el método y los valores reales de las muestras, tal como se puede observar en la *Figura 4*. Se confirma que el método presenta un error sistemático o sesgo para ambas determinación de ceras. Aunque se desconoce la naturaleza del error para los análisis del estudio comparativo asumiremos que este es constante.

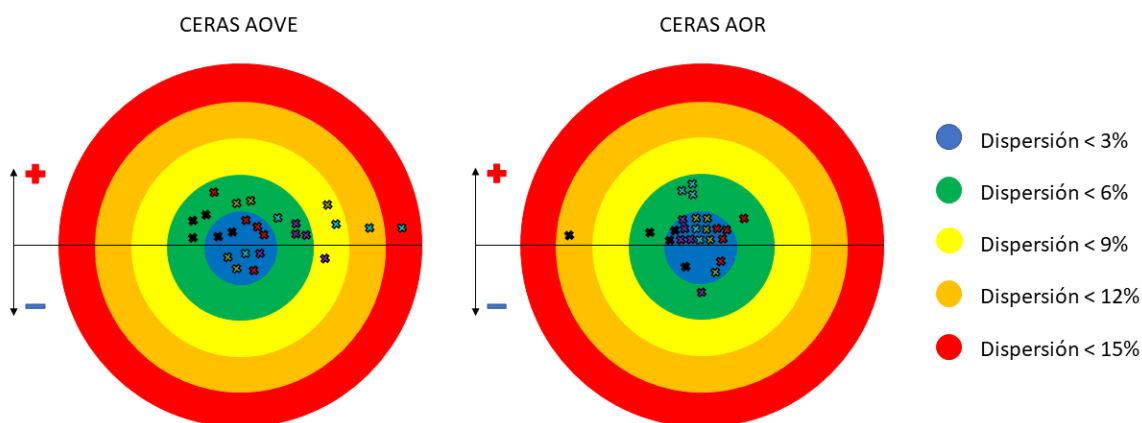


Figura 4: gráficos de puntería de los ensayos de repetibilidad/reproducibilidad de ceras de FC300 y FC302. El punto central coincide con el valor del material de referencia. Las cruces representan cada una de las medidas realizadas, están agrupadas por colores según el grupo de repetibilidad al que pertenecen.

Ensayos comparativos.

Los resultados de los estudios comparativos de muestras rutinarias de aceite de oliva, refinado y lampante quedan recogidos en las *Tablas 8, 9 y 10* respectivamente. En cada una de las tablas quedan recogidas el número de muestras, las mediciones obtenidas por ambos métodos para esas muestras, así como las diferencias entre ambas mediciones.

Las representaciones del análisis de regresión lineal de dichos estudios junto con sus ecuaciones asociadas quedan recogidas en las *Gráficas 1, 2 y 3*. En ellas cada punto está compuesto por las mediciones de ambos métodos junto con sus barras de error típico.

En primera instancia los resultados obtenidos para los diferentes tipos de aceites no parecen discernir entre ellos.

Tabla 8: Resultados del estudio comparativo de aceite de oliva.

Estudio comparativo de aceite de oliva [C ₄₂ +C ₄₄ +C ₄₆ +C ₄₀] mg/kg				
Número de muestras	Método oficial	Nuevo método	Diferencias	
1	177,7	186,3	+8,6	
2	166,2	179,1	+12,9	
3	269,3	284,4	+15,1	
4	191,7	194,3	+2,6	
5	242,7	255,8	+13,1	
6	235,1	228,2	-6,9	
7	184,7	185,4	+0,7	
8	265,7	268,6	+2,9	
9	190,3	180,1	-10,2	
10	278,8	272,1	-6,7	
11	263	255,8	-7,2	
12	269,4	279,4	+10	
13	270,7	278,1	+7,4	
14	216,6	230,3	+13,7	
15	250,3	249	-1,2	
			\bar{d} diferencias	3,647
			S _d diferencias	8,655

Tabla 9: Resultados del estudio comparativo de aceite refinado.

Estudio comparativo de aceite refinado [C ₄₂ +C ₄₄ +C ₄₆ +C ₄₀] mg/kg				
Número de muestras	Método oficial	Nuevo método	Diferencias	
1	295	291	-4	
2	220,5	233,9	+13,4	
3	323,7	326,4	+2,7	
4	228,4	207,2	-21,2	
5	237,1	219,3	-17,8	
6	210,8	196,4	-14,4	
7	250,9	249,6	-1,3	
8	315,8	325,7	+9,9	
9	337,3	337,1	-0,2	
10	272,7	269,7	-3	
11	321	324,8	+3,8	
12	329,9	322,6	-7,3	
13	301,7	305,2	+3,5	
14	246,6	254,2	+7,6	
15	329,8	324,8	-5	
			\bar{d} diferencias	-2,220
			S _d diferencias	9,907

Tabla 10: Resultados del estudio comparativo de aceite de lampante.

Estudio comparativo de aceite lampante [C ₄₂ +C ₄₄ +C ₄₆ +C ₄₀] mg/kg				
Número de muestras	Método oficial	Nuevo método	Diferencias	
1	148,9	150,9	2	
2	64,9	56,5	-8,4	
3	259,9	251,9	-8	
4	266,3	264,7	-1,5	
5	213	217,8	4,8	
6	303,8	298,5	-5,3	
7	273,1	274,1	1	
8	365	354,2	-10,8	
9	276,2	271,2	-5	
10	224,3	220,8	-3,4	
11	272,9	286,5	13,6	
12	340,2	301,4	-38,8	
13	297,7	304,4	6,7	
14	249,6	254,5	4,9	
15	247,8	240,7	-7,1	
			\bar{d} diferencias	-3,687
			S _d diferencias	11,808

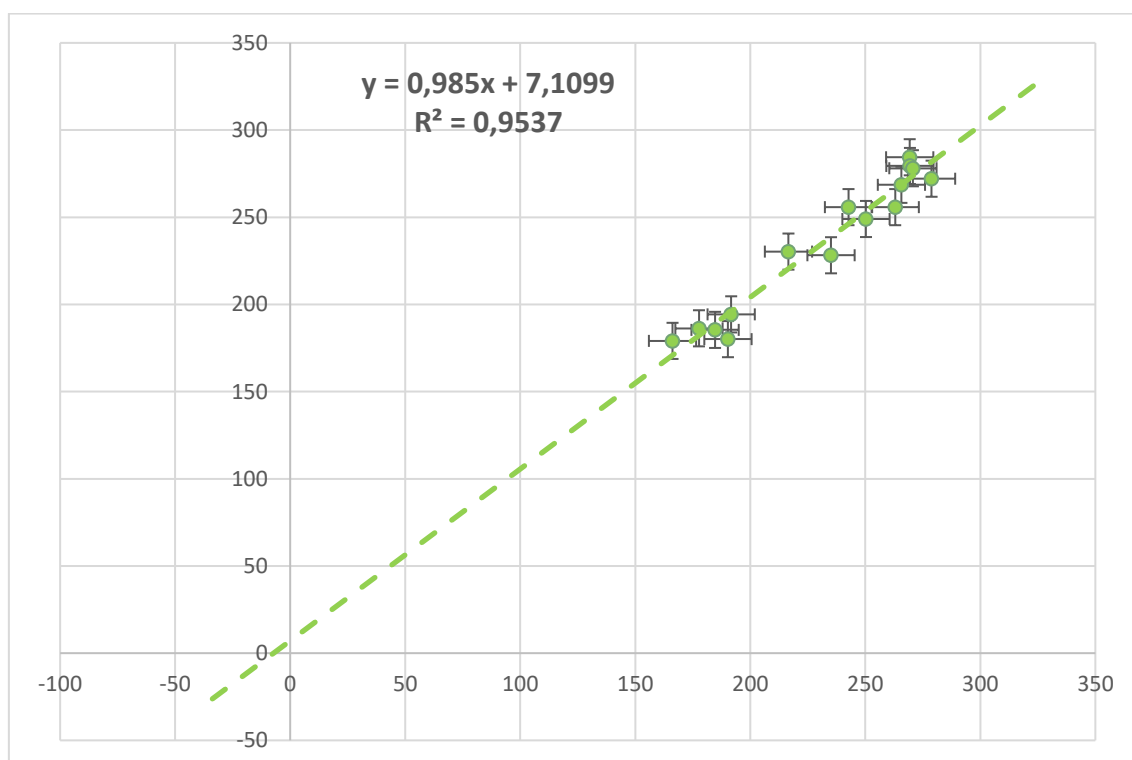


Gráfico 1: Recta de regresión lineal del estudio comparativo de aceite de oliva

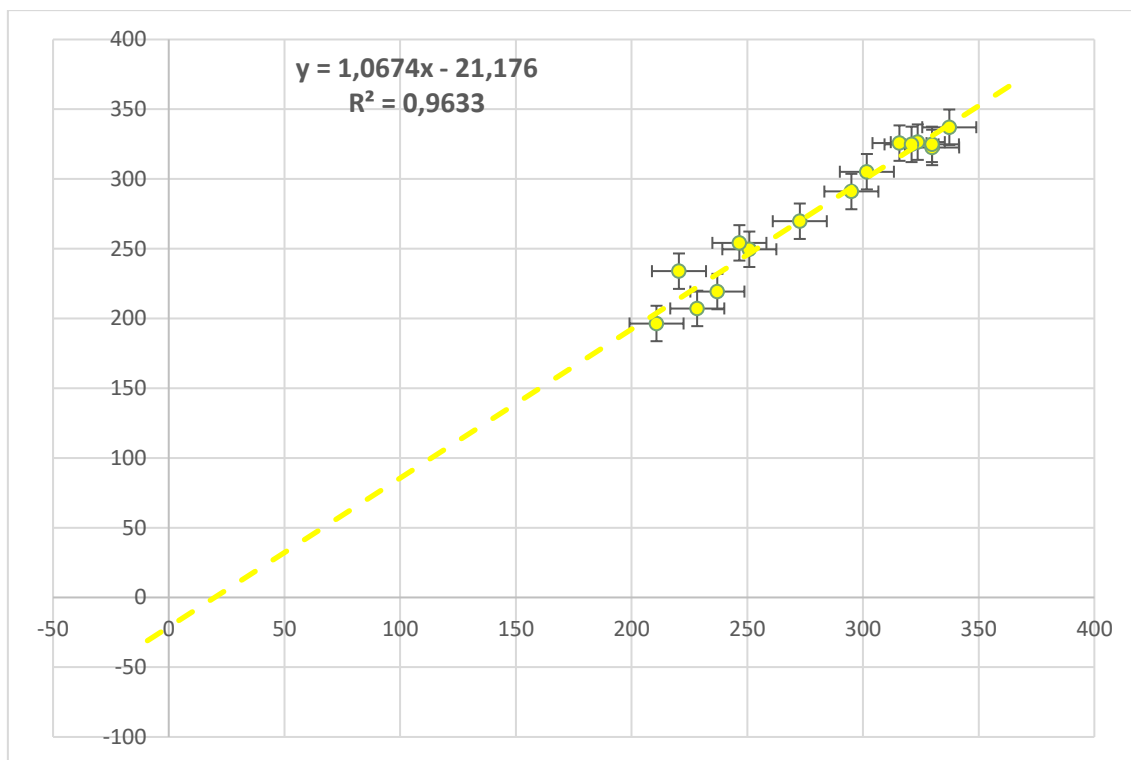


Gráfico 2: Recta de regresión lineal del estudio comparativo de aceite de oliva refinado.

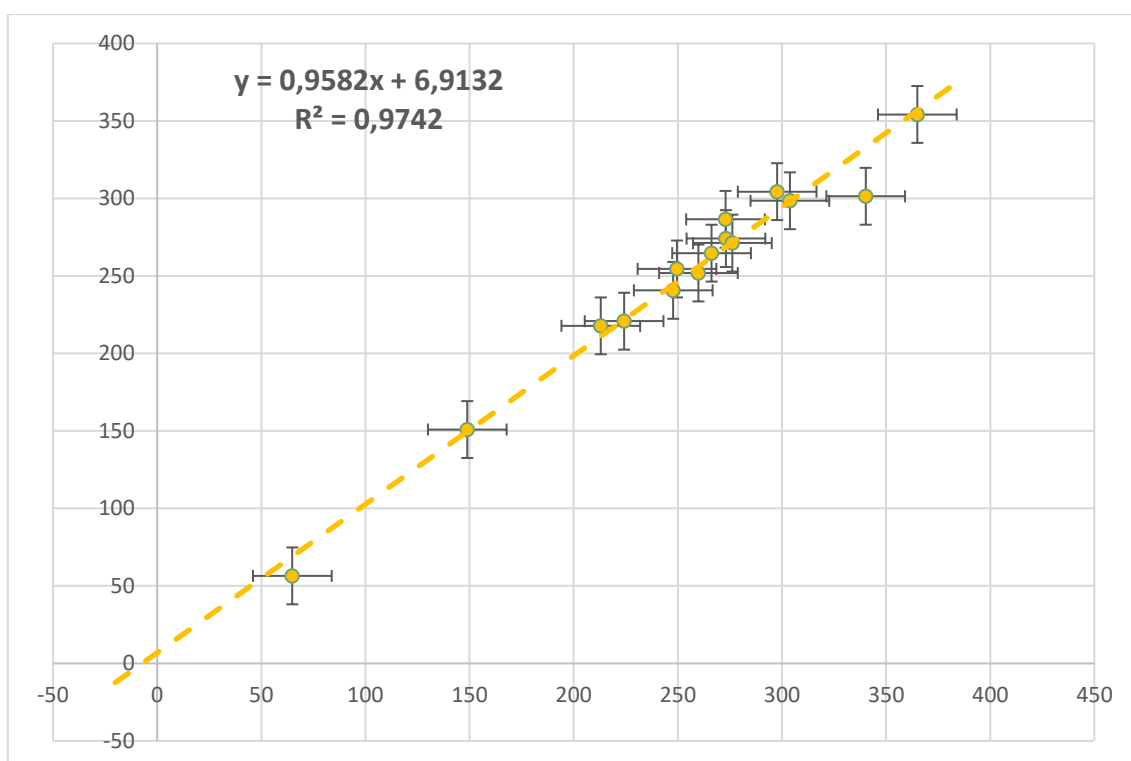


Gráfico 3: Recta de regresión lineal del estudio comparativo de aceite de oliva lampante.

Los resultados del contraste de hipótesis del estudio comparativo y del análisis de regresión lineal quedan recogidos en la *Tablas 11* y *12* respectivamente.

Tabla 11: resultados contraste *t* para datos emparejados de los estudios comparativos.

Contraste <i>t</i> para datos emparejados			
	AO	AOR	AOL
$t_{\text{experimental}}$	1,577	0,838	1,126
$t_{0,975,14}$	2,145		
H_0	Aceptada	Aceptada	Aceptada

Como se observa en la *Tabla 11*, los resultados obtenidos por el contraste *t* demuestran que no existen diferencias significativas entre las mediciones realizadas por el método oficial y el nuevo método en los 3 estudios comparativos. Esto confirma la validez del nuevo método para la determinación de ceras obtenida previamente en los ensayos de repetibilidad/reproducibilidad y además descarta interferencias matriciales en los tres tipos de aceites analizados.

Tabla 12: resultados del análisis de regresión lineal.

Análisis de regresión lineal			
	AO	AOR	AOL
S_a	0,060	0,036	0,043
S_b	14,129	-16,355	11,378
Intervalo de confianza de <i>m</i>	[1,115 / 0,855]	[1,124 / 0,970]	[1,051 / 0,865]
Intervalo de confianza de <i>n</i>	[37,627 / -23,408]	[7,479 / -40,201]	[31,490 / -17,663]

En los resultados del análisis de regresión lineal (*Tabla 12*) se observan que los niveles de confianza de las 3 pendientes incluyen el valor 1 y que los de las ordenadas en el origen incluyen el valor 0, por lo que este análisis confirma nuevamente que no existen diferencias significativas entre métodos.

3.2 ÉSTERES ETÍLICOS

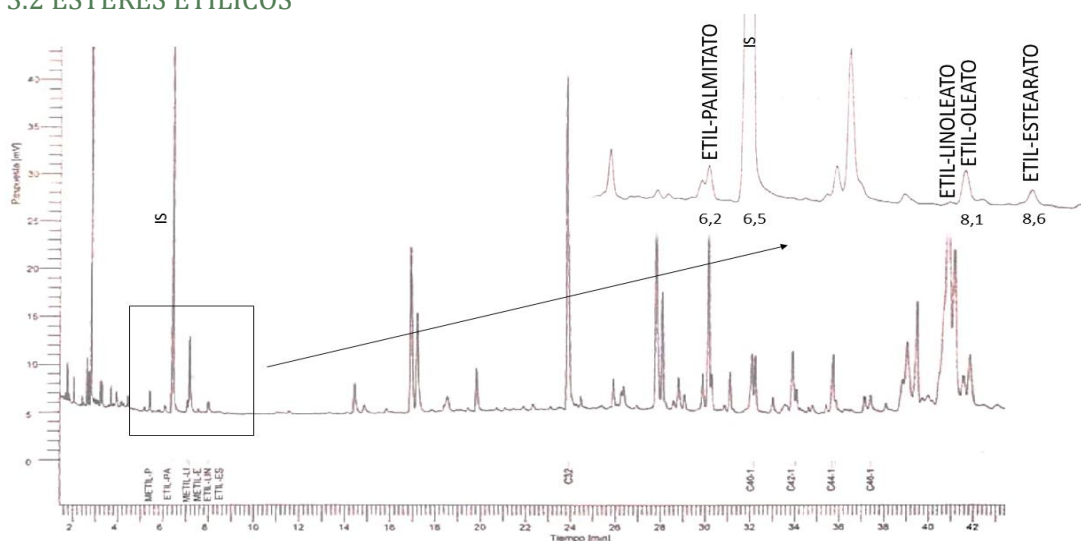


Figura 5: cromatograma de aceite virgen extra obtenido por el nuevo método. Identificación de los picos de los ésteres etílicos. IS (patrón interno) Metil-Heptadecanoato.

Ensayos repetibilidad/reproducibilidad.

Los resultados obtenidos para el ensayo de repetibilidad/reproducibilidad de la muestra FC300 con un valor de ésteres etílicos (μ) de 14 mg/kg quedan recogidos en la *Tabla 13*. Al igual que en los ensayos anteriores los resultados fueron sometidos el test de Grubbs.

Tabla 13: Resultados ensayo de repetibilidad/reproducibilidad FC300. Los datos de color verde son aceptados por el test de Grubbs.

AOVE (FC300)					
[Pal+Est+Lin+Ole]mg/kg	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Repetición 1	25,3	15,7	36,4	23,3	32,5
Repetición 2	34,2	23,8	37,9	14,7	32,6
Repetición 3	34,8	20,6	11,9	15,3	12,5
Repetición 4	34,0	26,1	13	15,5	17,6
Repetición 5	32,3	24,6	14,6	18,3	32,3
Media \bar{x}	31,72	22,16	22,76	17,42	25,50
SD	3,68	4,13	13,18	3,57	9,71
\bar{x} total	23,91				

Los resultados de la estimación de los parámetros de validación interna para ésteres etílicos quedan recogidos en la *Tabla 14*.

Tabla 14: parámetros de validación para a determinación de ésteres etílicos.

Precisión		Exactitud		Error del método	
RSD _r (%)	30,13	Exactitud (%)	+ 70,8	U _{exp} (ppm)	24 ± 21,028
RSD _R (%)	36,17	% Recuperación	170,8	U _{relativa} (%)	150,20
Horwitz (%)	10,76				

La precisión (RSD_R) obtenida fue de 36,17% valor muy alejado del 10,76% establecido por Horwitz [15] para los 14 ppm de FC300. La exactitud obtenida fue de +70,8 valor muy alejado del ± 15% de exactitud establecido anteriormente [16], por lo que el método aparentemente no es válido para la determinación de ésteres etílicos en aceite de oliva virgen extra.

Adicionalmente la U_{relativa} obtenida fue de 150,20% lo que indica que el método tiene un error asociado tan grande que el intervalo de confianza establecido sería superior al valor real de la muestra.

No obstante, en el gráfico de puntería (*Figura 6*) se puede observar que en ocasiones el método cuantifica de forma adecuada los ésteres etílicos (\pm 15%) por lo que se decidió analizar los diferentes cromatogramas para averiguar qué era lo que provocaba que el método no cuantificase de forma adecuada este parámetro. Para ello se superpusieron dos cromatogramas uno en el que se cuantificaba adecuadamente y otro en el que no, ambos realizados en el mismo día.

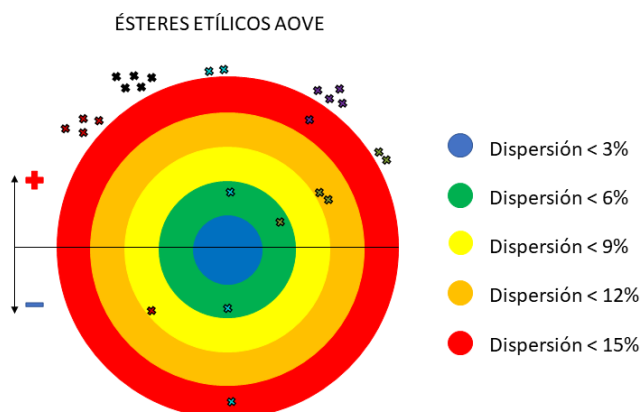


Figura 6: gráfico de puntería del ensayo repetibilidad/reproducibilidad de ésteres etílicos de FC300.

En la *Figura 7* se observa como en los tiempos de retención del etil-palmitato y el etil estearato eluyen otros compuestos, lo que explica la sobre cuantificación de este parámetro y evidencia la falta de selectividad del método. La razón por la que en ocasiones el método consigue cuantificar estos compuestos de forma adecuada y en otras presenta interferencias se desconoce, lo que deja una puerta abierta a su optimización.

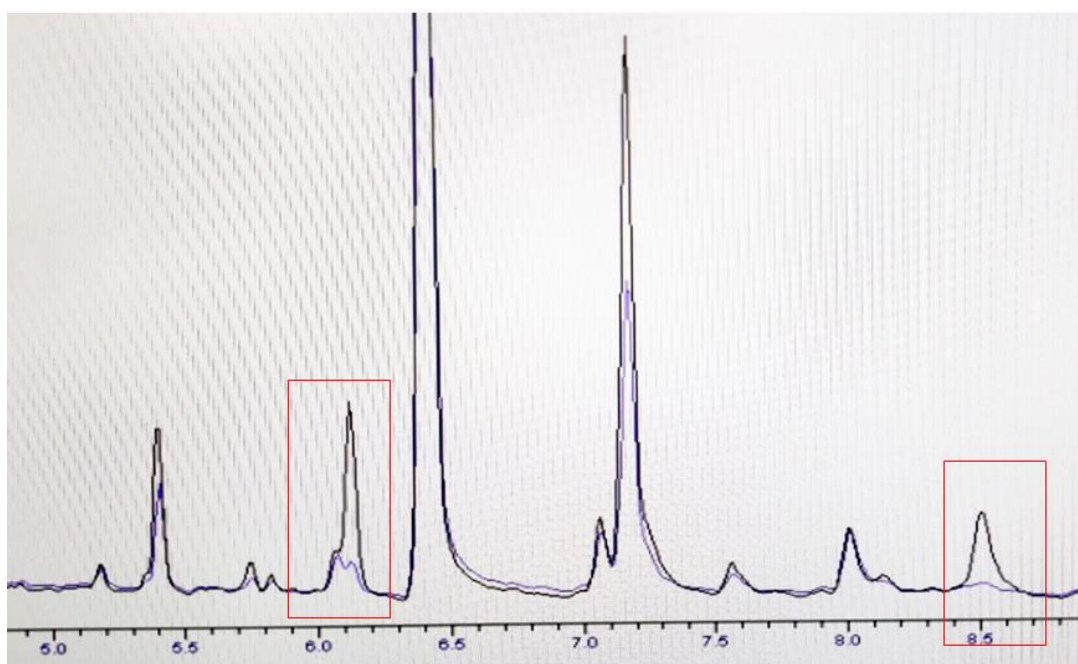


Figura 7: superposición de los cromatogramas de las repeticiones 1 (35,4 mg/kg) y 4 (13 mg/kg) del ensayo de reproducibilidad del día 3.

Ensayos comparativos.

Los resultados de los estudios comparativos quedan recogidos en la *Tabla 15*, la representación queda recogida en la *Gráfica 4*, y los resultados del contraste de hipótesis y del análisis de regresión lineal quedan recogidos en las *Tablas 16* y *17* respectivamente.

Tabla 15: Resultados del estudio comparativo de aceite lampante.

Estudio comparativo de aceite lampante [ET-Pal+ET-Lin+Et-Ole+Et-Est] mg/kg			
Número de muestras	Método oficial	Nuevo método	Diferencias
1	333,1	329,8	-3,3
2	131,3	106,6	-24,7
3	2217,8	2201,6	-16,2
4	726,2	756,1	29,9
5	424,1	423,6	-0,5
6	190,3	191,8	1,5
7	535,2	504,8	-30,4
8	2715,2	2772,3	57,1
9	1648,7	1667,1	18,4
10	472	490,7	18,7
11	491,5	539,6	48,1
12	391,1	417,7	26,6
13	384	404,6	20,6
14	377,8	412,4	34,6
15	381,3	413	31,7
		\bar{d} diferencias	14,140
		S_d diferencias	25,755

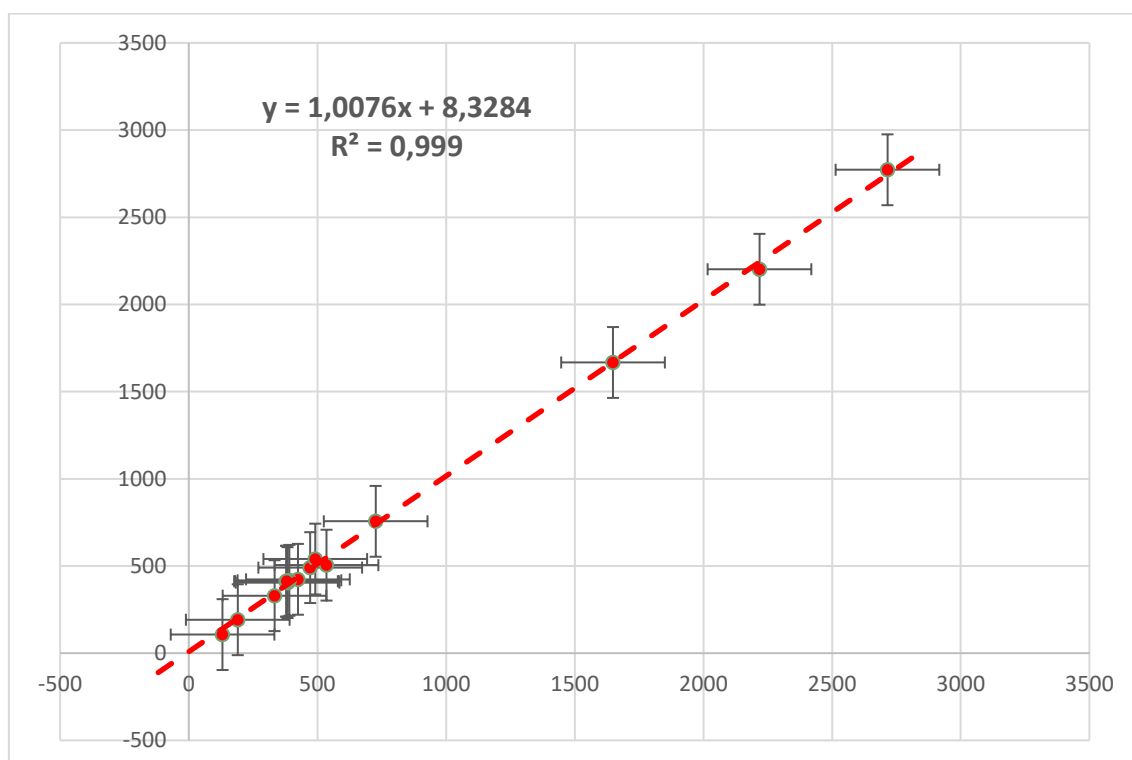


Gráfico 4: Recta de regresión lineal del estudio comparativo de aceite de oliva lampante de ésteres etílicos.

Tablas 16 y 17: resultados del análisis de contraste *t* para datos emparejados y de regresión lineal del estudio comparativo de ésteres etílicos en aceite lampante.

Contraste <i>t</i> para datos emparejados		Análisis de regresión lineal	
$t_{\text{experimental}}$	1,978	S_a	0,010
$t_{0,975,14}$	2,145	S_b	9,549
H_o	Aceptada	Intervalo de confianza de <i>m</i>	1,027/0,988
		Intervalo de confianza de <i>n</i>	28,955/-12,298

Como se puede observar en las *Tablas 16 y 17*, los resultados del análisis comparativo en la determinación de ésteres etílicos para aceite lampante revelan que no existen diferencias significativas respecto al método oficial en este rango de concentraciones. Por lo que el sesgo y la falta de selectividad anteriormente expuestas parecen subsanarse para concentraciones superiores y se podría concluir que el método es satisfactorio para la determinación de estos compuestos en aceites lampante pese a que no es un parámetro en dicha categoría.

4. CONCLUSIONES

1. Los parámetros de validación obtenidos para la determinación de ceras han sido satisfactorios en base a la precisión obtenida por el método oficial [9] y el $\pm 15\%$ de exactitud establecido [16] por lo que se puede concluir que el método es válido para la determinación de ceras. Adicionalmente, el estudio comparativo ha demostrado que la capacidad del método ensayado es similar a la del método oficial y ha servido para verificar que el método no está sujeto a interferencias matriciales de los aceites analizados.
2. Los parámetros de validación para la determinación de ésteres etílicos descartan la validez de este método para su determinación a las concentraciones de los aceites de oliva virgen $< 35\text{mg/kg}$. No obstante, el estudio comparativo ha demostrado que la falta de selectividad del método reportada a bajas concentraciones parece no ser significativa a concentraciones superiores y que éste es útil para la determinación de los ésteres etílicos en aceites de categoría lampante, si bien no es un parámetro a considerar en dicha categoría.
3. La incapacidad del método para la determinación de ésteres etílicos limita su uso en aceites de categoría virgen extra, pese a ello su aplicabilidad en otros muchos contextos pudiera ser de gran utilidad como es el caso de Qorteba Internacional S.L, que salvo en ocasiones no necesitan analizar aceites de dicha categoría.
4. Por último, el método propuesto permite reducir el tiempo empleado en la fase de extracción de 300 minutos a tan solo unos 20. Pese a ello el protocolo descrito no permite el análisis simultáneo de muestras ya que requiere de la acción de presión constante por parte del analista a diferencia del método oficial, que una vez preparada la columna permite al analista el desempeño de otras funciones durante el tiempo de

elución. Todo ello convierte a este método en un protocolo auxiliar de muestras urgentes y no en un sustituto del oficial para análisis rutinarios.

5. PROPUESTAS

Debido a los buenos resultados obtenidos para la determinación de ceras se propone la elaboración de un protocolo de validación oficial más exhaustivo que determinen la precisión mediante estudios interlaboratorios, e incluya parámetros adicionales como linealidad, límite de cuantificación, sensibilidad, robustez, selectividad y especificidad, que aporten mayor solidez científica a los resultados obtenidos y permitan su publicación.

Por otro lado, también se propone un estudio de mejora de protocolo para solventar el problema de selectividad de los ésteres etílicos y un estudio de aplicación del método mediante máquinas de vacío que permita el análisis simultáneo de muestras y facilite su aplicación.

Agradecimientos

Debo agradecer a todos y cada uno de los compañeros de Qorteba por el trato personal que he recibido, han conseguido que mi estancia de prácticas sea un lugar confortable donde ir a trabajar, aprender y crecer profesionalmente y en especial a M^a Victoria Girón ya que sin ella el desarrollo de este proyecto no hubiera sido posible.

Por otro lado, también debo agradecer a la Universidad de Córdoba por los programas de “Prácticas Extracurriculares en Empresas para Estudiantes de Máster” y “Plan Propio Galileo: Modalidad V - Semillero de emprendedores UCO y Semillero de emprendedores UCO-DIPUTACIÓN” que han permitido que realice mi estancia de prácticas, así como a mi tutor docente Prof. Dr. Rafael Gómez por su atención, supervisión y corrección del trabajo realizado.

Bibliografía

- [1] Consejo Oleícola Internacional, COI. WORLD'S OLIVE OIL PRODUCTION HAS TRIPLED. Disponible en: <https://www.internationaloliveoil.org/>
- [2] Juan Vilar. “Informe Salvemos el Buen Aceite”, resumen ejecutivo. Disponible en: <https://deoleo.com/>
- [3] Consejo Oleícola Internacional, COI. GUÍA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LA INDUSTRIA DEL ACEITE DE OLIVA: LAS REFINERÍAS. 2006; T.33-1/Doc. nº 2-2
- [4] CEE. (1991). Reglamento (CEE) Nº 2568/91 de la Comisión, de 11 de julio de 1991, 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 Nº L 248, 0001–0083. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:01991R2568-20161204&from=ES>
- [5] CEE. (1993). Reglamento (CEE) Nº 183/93 de la Comisión de 29 de enero de 1993, por el que se modifica el Reglamento (CEE) Nº 2568/91. Diario Oficial Nº L 22 58, 30. I. 93. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/1993/022/L00058-00068.pdf>
- [6] UE. (2013). Reglamento de ejecución (UE) Nº 1348/2013 de la Comisión, de 16 de diciembre de 2013, por el que se modifica el Reglamento (CEE) Nº 2568/91. Diario Oficial L 338/91. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2013/338/L00031-00067.pdf>

- [7] Mariani C, Venturini M. (2006). Sull'incremento delle cere negli oli d'oliva durante la conservazione. *Riv Ital Sostanze*. 82: 105–114.
- [8] UE. (2011). Reglamento (UE) Nº 61/2011 de la Comisión de 24 de enero de 2011, por el que se modifica el Reglamento (CEE) Nº 2568/91. Diario Oficial L 23/1. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:023:0001:0014:ES:PDF>
- [9] International Olive Council. IOC. (2017). Method of analysis determination of the content of waxes, fattyacid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography. /T.20/Doc. No. 28/Rev. 2/2017.
- [10] International Olive Council.IOC. (2012). Method of analysis determination of the content of waxes, fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography using 3 g of silica /T.20/Doc. No. 31/2012
- [11] Nota G, Naviglio D, Romano R, Sabia V, Musso S.S, Improta C. (1999). Determination of the wax ester content in olive oils. Improvement in the method proposed by EEC regulation 183/93. *J Agric Food Chem.*, 47:202–207.
- [12] Andrea M, Paolo L, Martina S, Erica M, Sabrina M, Lanfranco C. (2020). Improved method for determination of waxes in olive oils: reduction of silica and use of a less hazardous solvent. *OCL*, 27 (2020) 20.
- [13] Miller, J. N., Mille, J. C. (2002). estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª Ed. Pretince Hall. , [14] Grubbs, F. (1969). Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics*. 11, 1-21.
- [15] Horwitz, W. (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal Chem.*, 54:67–76.
- [16] Peters, F. T., Drummer,O.H., Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165, 216–224.

ANEXO I

ANEXO I

Tarea 1: Determinación de humedad.

La humedad del aceite o cantidad de agua que este contiene se expresa en porcentaje de peso. El método que se emplea para su determinación es conocido como “secado en estufa” y está regulado por la norma ISO 662:2016. Este análisis es realizado a muestras representativas de los camiones cisterna de aceite lampante y a los depósitos de almacenamiento de aceites de esta categoría que van a ser refinados. Esto se debe a que al adquirir grandes cantidades de aceites con altos valores de humedad la empresa está adquiriendo en gran parte agua que después es liquidada según políticas internas. El motivo por el cual se le realiza a los depósitos es que este parámetro se ha de tener en cuenta para calcular de forma adecuada el rendimiento del proceso de refinado.

Método

- Introducir cápsulas de porcelana previamente en una estufa a 105°C (mínimo 12 h).
- Sacar las cápsulas y dejar enfriar 30 min en un desecador.
- Pesar las cápsulas vacías en una balanza de precisión ± 1 mg, anotar el peso.
- Añadir entre 7 y 10 g de aceite ocupando el fondo, anotar peso.
- Introducir de nuevo en la estufa 30 min; sacar al desecador 30 min y pesar.
- Repetir el proceso hasta que la diferencia de peso entre pesadas sea menor a 0,008 g.

Para obtener el porcentaje de humedad se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(PCi - PCf)}{(PCi - PCv)} * 100 = \frac{\text{masa de agua}}{\text{masa de aceite}} * 100$$

PCi = Peso de la cápsula con la muestra al inicio del procedimiento.

PCf = Peso de la cápsula con la muestra al final de procedimiento.

PCv = Peso de la cápsula vacía, sin muestra.

Además, la empresa lleva a cabo un segundo método que es realizado por un equipo HC 103 Moistue Analyser de la compañía Mettler Toledo. Dicho equipo se compone de un sistema de calefacción y una balanza de precisión que calculan este parámetro de forma automática. Este método “no oficial” se lleva a cabo porque permite una estimación previa y más rápida del porcentaje de humedad.

Tarea 2: Determinación de impurezas no volátiles.

Durante la producción de aceite de oliva se generan impurezas no volátiles como parte de procesos incompletos o producción deficiente y se expresan en porcentaje de peso. Estas impurezas son insolubles en éter de petróleo y están compuestas generalmente por arena y suelo, ácidos grasos oxidados, sustancias nitrogenadas, sustancias minerales, carbohidratos, resinas y jabones alcalinos. El método por cual se determina este parámetro es el regulado por la norma ISO 663:2017. Este análisis es realizado en los aceites de categoría lampante, tanto a las descargas de camiones cisterna como a los depósitos que van a ser refinados. Esto se debe al igual que en la determinación de humedades altos valores de impurezas son liquidados por políticas internas y a que se ha de tener en cuenta durante el proceso de refinado (fase de depuración).

Método

- Colocar un pesa sustancias de vidrio con tapa en la estufa, con un papel de filtro en su interior a 100 °C (mínimo 6 h).
- Pesar entre 9 y 12 g de aceite en un vaso de precipitado, anotar peso.
- Agregar al vaso 100 ml de éter de petróleo y dejar reposar tapado durante 1 h.
- Filtrar la mezcla con embudo de vidrio, a través del papel de filtro; enjuagando el vaso con éter de petróleo para recoger las impurezas adheridas al vaso.
- Lavar el filtro con pequeñas porciones de éter, hasta que el filtro quede exento de materia grasa, dejando evaporar al aire libre.
- Terminar la evaporación del filtro en el interior del pesa sustancias junto con la tapa en la estufa a 100 °C.
- Calentar el conjunto 30 min cada vez (100 °C) y dejando enfriar en el desecador 30 min, anotar el peso.
- Repetir el proceso hasta que las diferencias entre una pesada y la anterior sea menor que 0,008.

Para calcular el porcentaje de impurezas se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Impurezas} = \frac{(PSf - PSi)}{PAC} * 100 = \frac{\text{masa de impurezas}}{\text{masa de aceite}} * 100$$

PSf = Peso del pesa sustancias + el papel de filtro con las impurezas (peso final).

PSi = Peso del pesa sustancias + el papel de filtro sin las impurezas (peso inicial).

PAC = Peso de aceite.

Tarea 3: Determinación del índice de peróxidos.

El índice de peróxidos representa el grado de oxidación del aceite y se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de muestra. Este es un parámetro de calidad con límites establecidos por el Reglamento Nº 2568/91 de la Comisión Europea. El índice de peróxidos es determinado mediante una valoración de yoduro de potásico ($K^+ I^-$), el cual es oxidado a yodo molecular (I_2) por los peróxidos presentes en la muestra, en presencia de almidón (indicador), y posteriormente es valorado con tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$). Este parámetro está reglado en todas las categorías de aceite excepto en lampante y orujo de oliva crudo, por lo que se determina en los refinados y los oliva.

Método

- Tomar un matraz Erlenmeyer de 250 ml esmerilado, soplar con nitrógeno y cerrar con tapón para eliminar el aire del interior y generar un ambiente anóxico.
- Tarar el matraz y pesar entre 1 y 2 g de aceite, anotar peso.
- Añadir en orden 10 ml de cloroformo, 15 ml de ácido acético y 1 ml de disolución saturada de yoduro potásico.
- Agitar suavemente durante 1 min y mantener 5 min en oscuridad.
- Pasado el tiempo agregar 75 ml de agua destilada y 2 ml de disolución de almidón (10 mg/ml), agitar enérgicamente.
- Si la disolución queda incolora no hay presencia de peróxidos, si toma un color morado, valorar con tiosulfato de sodio 0,01N (para IP previsto menor de 12, si no usar de 0,02N) hasta que quede incoloro. Anotar los ml de tiosulfato gastados.

Para el cálculo de índice de peróxidos se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Índice Peróxidos} = V * T * 1000 / G$$

V= volumen gastado de la disolución de tiosulfato sódico (ml). G= masa del aceite pesada (g).

T = molaridad real de la disolución de tiosulfato de sodio (N).

Tarea 4: Determinación del color.

El color es un parámetro fundamental en los alimentos, es la primera impresión que recibimos de ellos y constituye una parte esencial de la apariencia que determina en gran medida la preferencia de consumo y la aceptabilidad. Debido a la gran variedad de tonalidades que pueden presentar los aceites de oliva este parámetro no está regulado. No obstante, dada su importancia la determinación del color es realizada en todos los aceites obtenidos de refinación y en los olivos mediante el método regulado por la ISO 15305:1998. Este puede emplear un colorímetro como el Wesson o el Lovibond siendo este último el empleado en el laboratorio.

Método

El colorímetro Lovibond determina el color por comparación entre la luz transmitida a través de la muestra de aceite en una cubeta de cuarzo con un determinado espesor, normalmente 5 ¼ pulgadas y el color de la luz originada por la misma fuente transmitida a través de estándares de vidrios coloreados. Las mediciones de color se efectúan en el rojo, el amarillo, el azul y el neutro y los resultados son expresados como valores individuales de estas lecturas. Este análisis colorimétrico de los aceites de oliva se caracteriza por presentar un valor 0 en la tonalidad azul.

Lovibond® PFXi				
Instrument Type: PFXi 880/L			Serial Number: 102087	
Date/Time of Measurement: 01- -02 20:02				
Measurement Parameters				
User ID:	qorteba			
Sample ID:	aceite de oliva refinado			
Path Length:	133.50 mm			
Illuminant:	A			
Observer:	2° (1931)			
Temperature:	24.7°C			
Firmware:	V36M			
CIE Lab	L*	a*	b*	
	83.96	5.11	60.96	
Lovibond	Red	Yellow	Blue	Neutral
	1.3	13.0	0.0	0.1
Gardner	8.2	Off Hue	0	
Chlorophyll	0.0903			
beta Carotene	2.56			

Informe 1: Informe de determinación del color. Resultado obtenido de muestras de aceite de oliva refinado.

Tarea 5: Determinación del coeficiente de extinción molar en el ultravioleta.

El análisis espectrofotométrico en el ultravioleta proporciona información sobre la calidad del aceite, su estado de conservación y modificaciones inducidas por procesos tecnológicos. Este parámetro está regido por el Reglamento Nº 2568/91 de la Comisión Europea y sus valores de absorción son expresados en extinciones específicas $E_{1\% 1cm}$ (extinción de una solución de la materia grasa al 1% en un disolvente determinado en un espesor de 10 mm) que convencionalmente es expresado como K, “coeficiente de extinción”. En estas longitudes de onda se observan la presencia de sistemas de electrones diénicos y triénicos conjugados típicos de procesos de oxidación o prácticas de refinería (altas temperaturas). Por ello, este parámetro sirve principalmente para discriminar si los aceites han sido sometidos a estos procesos. Este parámetro está reglado en todas las categorías de aceite excepto en lampante y orujo de oliva crudo, por lo que se determina en los refinados y los oliva.

Método

- En un matraz de 10 ml previamente tarado pesamos la muestra de aceite: < 0,1 g en caso de oliva virgen, < 0,03 g en caso de oliva refinado y se anota el peso.
- Enrasamos con ciclohexano o iso-octano y agitamos (según el disolvente utilizado cambia la longitud de onda de medida), en nuestro caso usamos ciclohexano y medimos a λ 232 nm y 270 nm (también se miden a 268 y 274 nm, para cálculos posteriores).
- Encender el equipo (Perkin Elmer lambda 25) unos 20 min antes del análisis, para que la lámpara se caliente.
- Acceder al software e introducir los datos de las muestras y peso exacto para el cálculo de concentración (para cálculos posteriores).
- Realizar un blanco con el disolvente, posteriormente medir la absorbancia de la muestra. Se emplea una cubeta de cuarzo con un espesor de 1 cm.

Para realizar los cálculos del coeficiente de extinción se emplea la siguiente fórmula:

$$K\lambda = E\lambda / c * s$$

$K\lambda$ = extinción específica a la longitud de onda λ . s = longitud del paso de la cubeta en cm.

$E\lambda$ = extinción medida a la longitud de onda λ . c = concentración de la solución en g/100 ml.

Por último, se determina la variación de la extinción específica (ΔK) mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta K = K_{m270} - \frac{K_{\lambda 274} + K_{\lambda 266}}{2}$$

MÁSTER EN AGROALIMENTACIÓN – MEMORIA DE PRÁCTICAS EN EMPRESA / INSTITUCIÓN

Fecha: 25/06/2021 Hora: 13:50:44 Método: FACTORK1
Rendija: UV/VIS: 1.00 nm
Analista:

Muestra ID	Ciclo	Factor	K274	K270	K266	K232	DeltaK	
REFINADO	1	3,5971	0,4036	0,4759	0,4636	2,0243	0,0423	ACEITE DE OLIVA REFINADO
LAMPANTE	1	1,3793	0,2026	0,2118	0,2202	1,7052	0,0004	ACEITE DE OLIVA LAMPANTE
OLIVA	1	3,9683	0,4362	0,5176	0,4955	1,9054	0,0518	ACEITE DE OLIVA

Informe 2: Informe de determinación del coeficiente de extinción en ultravioleta. Resultados obtenidos de muestras de aceite de categoría lampante, refinado y oliva.

Tarea 6: Determinación del contenido de hidrocarburos alifáticos.

Los hidrocarburos alifáticos saturados son una familia compleja de compuestos muy numerosos que junto con los aldehídos alifáticos y las ceras forman la cutícula de la epidermis vegetal. Estos compuestos se encuentran de manera natural en los aceites vegetales y son especialmente abundantes en los aceites de oliva con unas concentraciones que oscilan entre los 15 y 180 mg/kg. Los componentes de esta fracción presentan un número impar de carbonos C25, C27, C29 y C31 y son principalmente alcanos, alquenos y sesquiterpenos.

Por otro lado, existen los hidrocarburos alifáticos saturados minerales (MOSH, *Mineral oil saturated hydrocarbons*) que son alcanos (parafinas) lineales y ramificados, y alquil-cicloalcanos sustituidos (naftalenos), que llegan hasta los aceites por diversas fuentes de contaminación y que presentan una toxicidad reducida. En la actualidad no existe una regulación para estos compuestos, no obstante, la Unión Europea ha emitido la Recomendación (UE) 2017/84 de la CE de 16 de enero de 2017 sobre la vigilancia de hidrocarburos de aceites minerales en alimentos y en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos.

La determinación de los hidrocarburos alifáticos naturales y minerales lineales (parafinas) se realiza de forma simultánea según el método descrito en la norma ISO17780:2015. Pese a la falta de regulación, este método comenzó a implementarse en Qorteba Internacional S.L. como medida preventiva ante el Reglamento Nº1151/2009 de la Comisión del 27 de septiembre de 2009 por el cual se establecía un límite de 50 mg/kg para parafinas en el aceite de girasol importado desde Ucrania (reglamento posteriormente derogado).

Método

Separación mediante cromatografía líquida.

- Pesar 18,5 g de sílice Mesh Merck activada con nitrato de plata e introducir en la columna (diámetro 1,5 mm) que previamente contiene 40 ml de n-hexano.
- Añadir 1 cm de arena de mar lavada.
- Abrir la llave y descartar el eluyente hasta alcanzar 1 mm por encima de la arena.
- Añadir 60 ml de n-hexano y descartar para eliminar impurezas (evitar el secado de la columna).
- Pesar 1 g de aceite en un vaso de precipitado y añadir 1 ml de patrón interno n-eicosano (1 mg/ml). Pasar por la columna.
- Lavar el vaso con dos porciones de 1 ml y pasar por la columna.
- Eluir con 60 ml de disolvente y recoger en un matraz de corazón de 100 ml.
- Evaporar en rotavapor y reconstituir con 180 µl de n-hexano.

Análisis por cromatografía de gases (On-column).

Rampa del horno	Velocidad °C/min	Temperatura °C	Mantenimiento °T/min
Inicial	0,00	50,0	1,00
1	12,0	350	5,00
2	5,0	325	6,00

-Tipo de columna: 95%-Dimetil-5%-difenílpolisiloxano, 15 m, 0.32 mm, 0.10 µm.

-Tª Máxima del horno: 350 °C.

-Tª detector: 350 °C (FID).

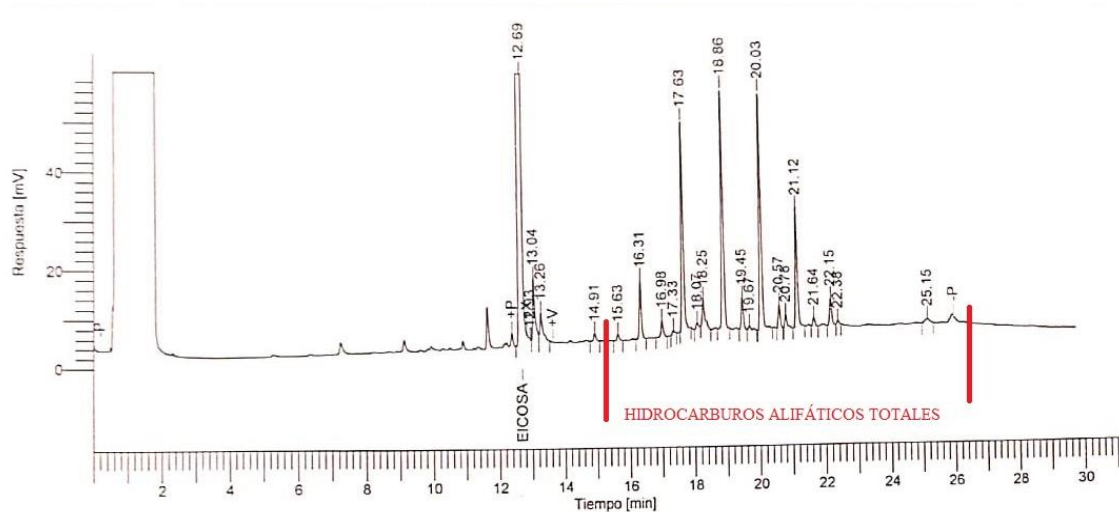
-Carrier: H₂ a 10 Psi.

-Tiempo de análisis: 31 min.

-Volumen de inyección: 1 µl.

En el cromatograma resultante se observan unos picos bien definidos que se corresponden a los hidrocarburos naturales, estos son cuantificados de forma individual. Los hidrocarburos minerales lineales al ser una familia de compuestos más variada y de menor concentración se ven reflejados en una joroba que presenta el mismo tiempo de retención que los naturales. Para su cuantificación se calcula la concentración de hidrocarburos naturales y de hidrocarburos totales (picos naturales y joroba), y se obtiene por diferencia.

$$[\text{HA minerales, parafinas}] = [\text{HA totales}] - [\sum \text{HA naturales}]$$



Cromatograma 1: Cromatograma de hidrocarburos alifáticos. Se observan el patrón en el minuto 12,69 y los picos de los hidrocarburos alifáticos naturales asignados a partir del minuto 14. La sección señalada en rojo corresponde a la zona integrada para el cálculos de los hidrocarburos alifáticos totales.

Tarea 7: Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son un conjunto de más de 100 compuestos formados principalmente durante la combustión incompleta de materia orgánica que representan un riesgo para la salud debido a su potencial cancerígeno. Los niveles máximos permitidos en alimentos vienen establecidos en el Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006. Al tratarse de una cuestión seguridad alimentaria que puede afectar a la salud de los consumidores, este parámetro se determina en todos los depósitos de aceite vegetales, los aceites obtenidos del proceso de refinado y los olivos. Los niveles máximos permitidos para el benzo(α)pireno es 2 mg/kg y para la suma de benzo(α)pireno, benzo(α)antraceno, benzo(β)fluoranteno y criseno es 10 mg/kg. El método por el cual se determinan estos compuestos es el establecido en la norma ISO/CD 15302.2:2005.

Método

Separación mediante cromatografía líquida.

- Pesar 22 g de óxido de alúmina activada e introducir en la columna (diámetro 1,5 cm) que previamente contiene unos 50 ml de n-hexano.
- Añadir 3 cm de sulfato sódico anhidro.
- Abrir la llave y descartar el eluyente hasta alcanzar 1 mm por encima de la arena.
- Pesar 0,4 g de aceite en un vaso de precipitado y añadir 14 µl de patrón interno benzoβcriseno (1 mg/ml). Pasar por la columna.
- Lavar el vaso con 1 ml y pasar por la columna.
- Eluir con 60 ml de disolvente y recoger en un matraz de corazón de 100 ml.
- Evaporar en rotavapor y reconstituir con 250 µl de fase móvil de HPLC (9:1, acetonitrilo, tetrahidrofurano).

Análisis por cromatografía líquida de alta resolución.

-*Tipo de columna:* ODS-P fase reversa (C18), 5 µm x 4,8 mm x 250 mm.

-*Tª del horno:* 30 °C.

-*Tipo de detector:* fluorescencia.

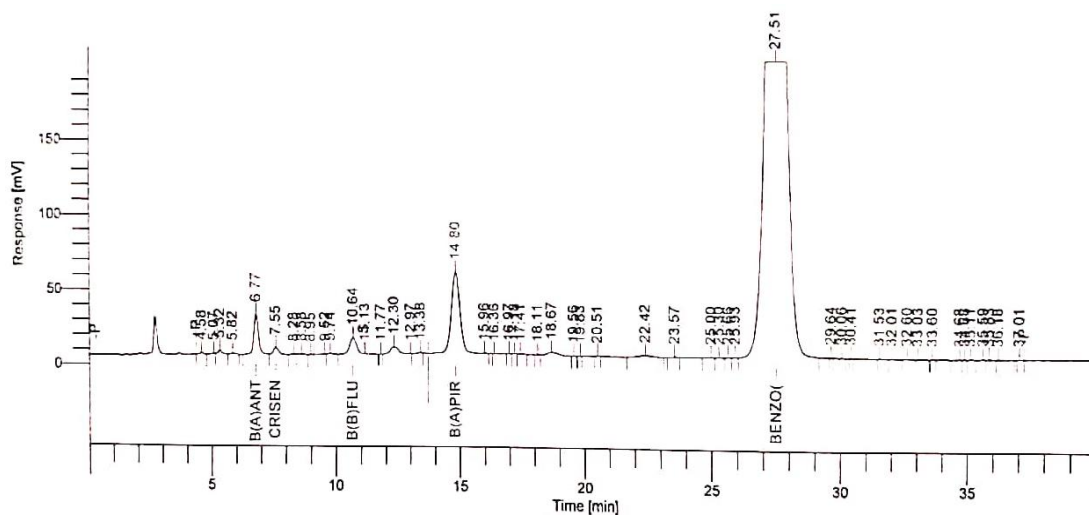
-*Fase móvil:* acetonitrilo/agua (98:2).

-*Tiempo de análisis:* 41 min.

-*Volumen de inyección:* 1 µl.

-*Flujo:* 1,40 ml/min.

Para el cálculo de la concentración de estos 5 compuestos se realiza una recta de calibrado de cada uno de ellos con 5 niveles de concentración, así como, una señal de referencia asociada a la cantidad de patrón añadido.



Cromatograma 2: Cromatograma de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Se observan el patrón en el minuto 27,5 y el de benzo(α)antraceno, crisenno, benzo(β)fluoranteno y benzo(α)pireno en los minutos 7, 8, 10,5 y 15 respectivamente.

Tarea 9: Determinación del contenido de ceras y ésteres etílicos.

Los fundamentos de este parámetro han sido descritos en el apartado *Desarrollo de Actividad Científica*. Este parámetro está reglado para todas las categorías de aceite y se determina en los aceites obtenidos de refinación, en las olivas y en los depósitos de aceite lampante que van a ser refinados. Este parámetro se ha de tener en consideración durante el proceso de refinado ya que en función de las condiciones del proceso su concentración puede variar (aumentar a altas temperaturas).

Método

Separación mediante cromatografía líquida.

- Pesar 15 g de sílice Mesh Merck activada formar una suspensión con aproximadamente 50 ml de n-hexano e introducir en la columna (diámetro 1,5 cm).
- Abrir la llave y descartar el eluyente hasta alcanzar 2 mm por encima de la sílice.
- Pesar 0,5 g de aceite en un vaso de precipitado, disolver en 2 ml de n-hexano, añadir 100 µl de patrón (lauril-araquidato, metil-heptadecanoato 1 mg/ml) y unas gotas de Sudán. Pasar por la columna.
- Lavar el vaso con 2 ml de n-hexano y pasar por la columna.
- Eluir con 180-200 ml de disolvente de desarrollo (98:2, n-hexano, éter dietílico) o hasta que el indicador naranja (Sudán) llegue al final de la columna. Recoger en un matraz redondo.
- Evaporar en el rotavapor y reconstituir con 2 ml de n-heptano.

Análisis por cromatografía de gases (On-column).

Rampa del horno	Velocidad °C/min	Temperatura °C	Mantenimiento T/min
Inicial	0,00	80,0	1,00
1	20,0	140	0,00
2	5,0	325	6,00
3	20,0	340	20,0

- Tipo de columna: 95%-Dimetil 5%-difenilpolisiloxano (15 m, 0.32 mm, 0.10 µm).

- Tª Máxima del horno: 350 °C.

- Tª detector: 350 °C.

- Carrier: H₂ a 9 Psi.

- Tiempo de análisis: 67 min.

- Volumen de inyección: 1 µl.

Los cálculos para la determinación de ambos parámetros han sido descritos en el apartado *Desarrollo de actividad científica*.

Tarea 10: Determinación del porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo.

El porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo es un es un parámetro característico de cada aceite vegetal que permite distinguir adulteraciones y que en el caso de los aceites de oliva está regido por el Reglamento Nº 2568/91 de la Comisión Europea. Para la determinación de este parámetro se aísla la fracción de triglicéridos del aceite la cual es sometida a la acción de la lipasa pancreática. Con ello se consigue hidrolizar los enlaces esteres de las posiciones 1 y 3 de las moléculas de triglicéridos generando así la aparición del monopalmitato de 2-glicerilo.

Si bien este parámetro está regulado en todas las categorías de aceite, en el laboratorio solamente se determina para los aceites obtenidos de refinería y en olivas. Este parámetro no es determinado para las adquisiciones de aceite de categoría lampante por cuestiones de tiempo en los análisis y debido a que ambas empresas socias a la refinería tienen un control sobre la trazabilidad. La fracción de triglicéridos no es alterada durante el proceso de refinado, por lo que en caso de que hubiese algún tipo de adulteración esta sería detectada de forma posterior o mediante el resto de análisis realizados a las adquisiciones de esta categoría. No obstante, en caso de adquisición a “terceros” de los cuales no se tiene control de su trazabilidad se analiza este parámetro.

Método

Separación mediante cromatografía líquida.

- Poner en la columna (diámetro 2,5 cm) 30 ml de n-hexano.
- Pesar 22 g de sílice Mesh Merck activada formar una suspensión con aproximadamente 80 ml de disolvente e introducir en la columna.
- Abrir la llave y descartar el eluyente hasta alcanzar 2 mm por encima de la sílice.
- Pesar 1 g de aceite en un vaso de precipitado y disolver en 10 ml de n-hexano. Pasar por la columna.
- Eluir con 150 ml de disolvente de desarrollo (87:13 n-hexano, éter dietílico) y recoger en un matraz redondo.
- Evaporar en el rotavapor hasta obtener un residuo (fracción de triglicéridos).

Hidrólisis con lipasa pancreática.

- Pesar 0,1 g del residuo obtenido en un tubo de ensayo esmerilado de base plana.
- Añadir por orden 2 ml de TRIS-hidroxi-metilaminometano 1 M, 0,5 ml de solución de colato de sodio al 0,1 % y 0,2 ml de solución de cloruro de calcio al 22 %. Calentar brevemente.
- Añadir 20 mg de lipasa pancreática de actividad 2-10 unidades/mg y calentar durante 2 min exactos a 40 °C para que su activación.
- Agitar en vortex durante 1 min y añadir 1 ml de éter dietílico para detener la reacción.

- Agitar y posteriormente centrifugar durante 5 min a 3000 rpm.
- Tomar 100 µl de la fase superior y pasar a un matraz de corazón de 10 ml.
- Añadir 200 µl de reactivo de sililación, tapar y dejar reposar 20 min. Añadir 2,5 ml de n-hexano.

Análisis por cromatografía de gases (On-column).

Rampa del horno	Velocidad °C/min	Temperatura °C	Mantenimiento °T/min
Initial	0.00	60.0	1.00
1	30.0	180.0	5.00
2	10.0	340.0	25.0

-Tipo de columna: 95%-Dimetil 5%-difenilpolisiloxano (15 m, 0.32 mm, 0.10 µm).

-Tª Máxima del horno: 340 °C.

-Tª detector: 350 °C (FID)

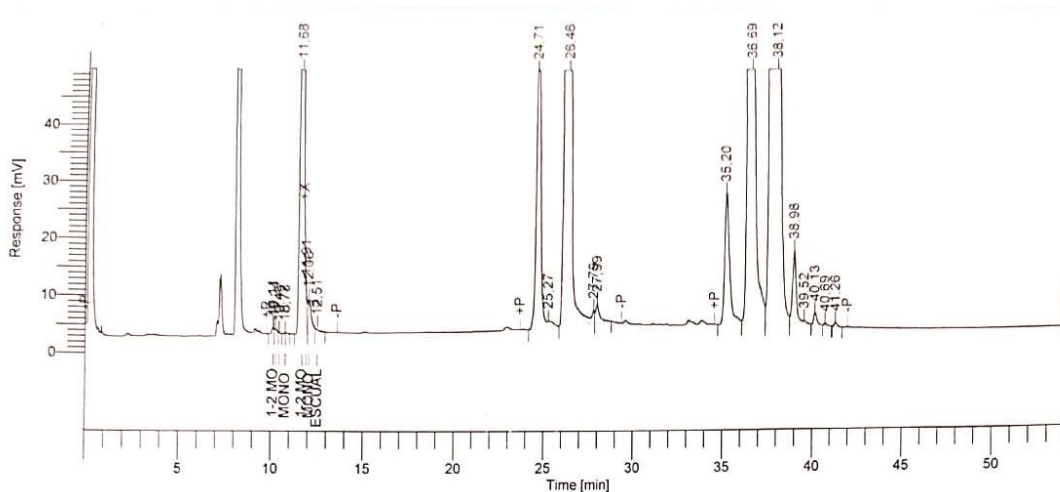
-Carrier: H₂ a 26,8 Psi.

-Tiempo de análisis: 51 min.

-Volumen de inyección: 1 µl.

En el cromatograma resultante se observan los picos correspondientes a todos los monoglicéridos obtenidos por la acción de la lipasa pancreática. Para el cálculo del % de monopalmitato de 2-glicerilo se emplea la siguiente ecuación:

$$\text{Monopalmitato de 2-glicerilo (\%)} = \frac{A_{\text{monopalmitato}}}{\sum A_{\text{monoglicéridos}}} * 100$$



Cromatograma 3: Cromatograma de monopalmitato de 2-glicerilo. Se observa 3 regiones de picos que corresponden a los monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos de izquierda a derecha. Dentro de los monoglicéridos se distinguen 9 tipos diferentes, correspondiendo el segundo pico empezando por la izquierda a el monopalmitato.

Tarea 11: Determinación de escualeno en ácidos grasos destilados.

El escualeno es un ácido graso de gran interés en la industria farmacéutica por sus propiedades como coadyuvante en la elaboración de vacunas (estimulador del sistema inmunitario) y para su aplicación en la encapsulación farmacológica (emulsionante). Si bien esta molécula está muy presente en el metabolismo de la gran mayoría de seres vivos, existen pocas fuentes en las que sea abundante, siendo el aceite de oliva una de ellas.

Los ácidos grasos son un subproducto de la etapa de destilación neutralizante del proceso de refinado. Como forma de revalorización se determina el contenido de escualeno de estos según la Norma UNE 55038:1958 para su posterior comercialización.

Método

- Calentar ácidos grasos (sólidos) hasta su fusión y agitar para homogeneizar.
- Pesar 0,2 g en un matraz Erlenmeyer esmerilado.
- Añadir 1 ml de patrón (escualano, 0,1 mg/ml) y 10 ml de n-heptano, tapar y agitar.

Análisis por cromatografía de gases (Split-splitless).

Rampa del horno	Velocidad °C/min	Temperatura °C	Mantenimiento °T/min
Initial	0.00	250.0	25.0

-Tipo de columna: 95%-Dimetil 5%-difenilpolisiloxano (15 m, 0.32 mm, 0.10 µm).

-Tª Máxima del horno: 250 °C.

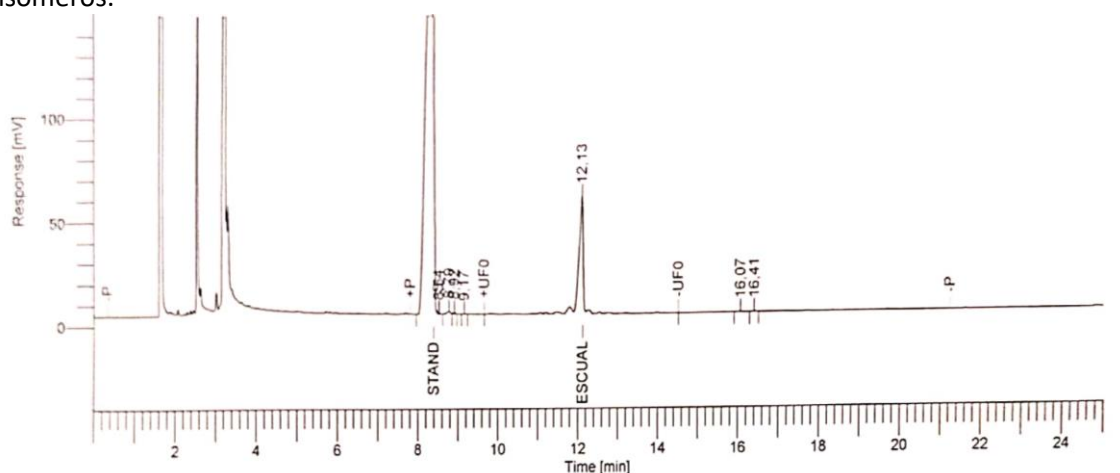
-Tª detector: 300 °C (FID)

-Carrier: H₂ a 10 Psi.

-Tiempo de análisis: 25 min.

-Volumen de inyección: 1 µl.

En el cromatograma resultante se observan los picos correspondientes a todos los isómeros del escualeno. La concentración de escualeno final es equivalente al sumatorio de todos sus isómeros.



Cromatograma 4: Cromatograma de escualeno. Se observa el patrón en el minuto 8,40 y el pico del isómero principal en el minuto 12,13, los picos alrededor de este corresponden a sus 23 isómeros.

Tarea 12: Determinación de ácidos grasos libres en frío.

La acidez es un parámetro de calidad que es necesario para la clasificación de los aceites de oliva en sus diferentes categorías, este parámetro está regido por el Reglamento 2568/91 de la Comisión. Su análisis es llevado a cabo a muestras de camiones cisterna, depósitos de aceite lampante que van a ser refinado ya que es un parámetro a tener en cuenta en el proceso (destilación neutralizante), aceites obtenidos de refinería y en olivas.

La acidez que presentan los aceites vegetales se debe a la presencia de ácidos grasos libres y para su determinación se realiza una valoración volumétrica. En función del tipo de aceite, refinado o lampante, se emplea una disolución básica distinta.

Método

- Añadir 10 ml de aceite a un Erlenmeyer con una pipeta de 10 ml de doble aforo.
- Diluir con aproximadamente 50 ml de la mezcla etanol-dietiléter (1:1) (enjuagando la pipeta para que no queden restos de aceites adheridos a ella.
- Valorar

Aceite lampante $\acute{a}c > 0,35$	Aceite refinado $\acute{a}c < 0,35$
KOH 0,3255 M	KOH 0,1 M
Acidez = ml de KOH gastados	Mirar tabla de equivalencias

Tabla de equivalencias

Volumen (ml)	Acidez	Volumen (ml)	Acidez
0,05	0,01	0,60	0,18
0,10	0,03	0,65	0,20
0,15	0,04	0,70	0,21
0,20	0,06	0,75	0,23
0,25	0,07	0,80	0,24
0,30	0,09	0,85	0,26
0,35	0,10	0,90	0,27
0,50	0,12	0,95	0,29
0,45	0,14	1,00	0,31
0,50	0,15	1,05	0,32
0,55	0,17	1,10	0,34

Tarea 13: Determinación de ácidos grasos en frío.

El porcentaje de ácidos grasos presentes en el aceite de oliva (libres y triglicéridos) constituye un parámetro de pureza que permite la distinción de adulteraciones, este parámetro está regido por el Reglamento 2568/91 de la Comisión Europea. La determinación de este parámetro está regulada para todas las categorías de aceite de oliva y, por tanto, se determina en todos los depósitos de aceites almacenados, en los aceites obtenidos de refinería y en olivas. La determinación de este parámetro varía en función de la acidez de la muestra, por ello para muestras con acidez inferior a 2 se realizará el protocolo que se detalla a continuación, y para muestras con acidez superior se desarrolla otro protocolo que viene detallado en el Reglamento.

Para la determinación del porcentaje de ácidos grasos, se requiere que se produzca una reacción de metilación que divida a los triglicéridos en ácidos grasos independientes para su cuantificación individual y que les aporte la propiedad de ser volátiles necesaria para su determinación en cromatografía de gases.

Método

- Pesar 0,2 g de muestra en un tubo con rosca.
- Añadir 0,2 ml de KOH 2M en metanol.
- Añadir 2 ml de n-heptano y agitar enérgicamente.
- Pasar a un vial de cromatografía la fase superior cuando quede completamente transparente.

Análisis por cromatografía de gases.

Rampa del horno	Velocidad °C/min	Temperatura °C	Mantenimiento °T/min
Initial	0.00	175	14,0
1	1,50	200	15,0

-Tipo de columna: polixilosano 0.2 µm x 0.25 mm x 60 m.

-Tª Máxima del horno: 200 °C.

-Tª detector: 300 °C (FID)

-Tª inyector: 250 °C (FID)

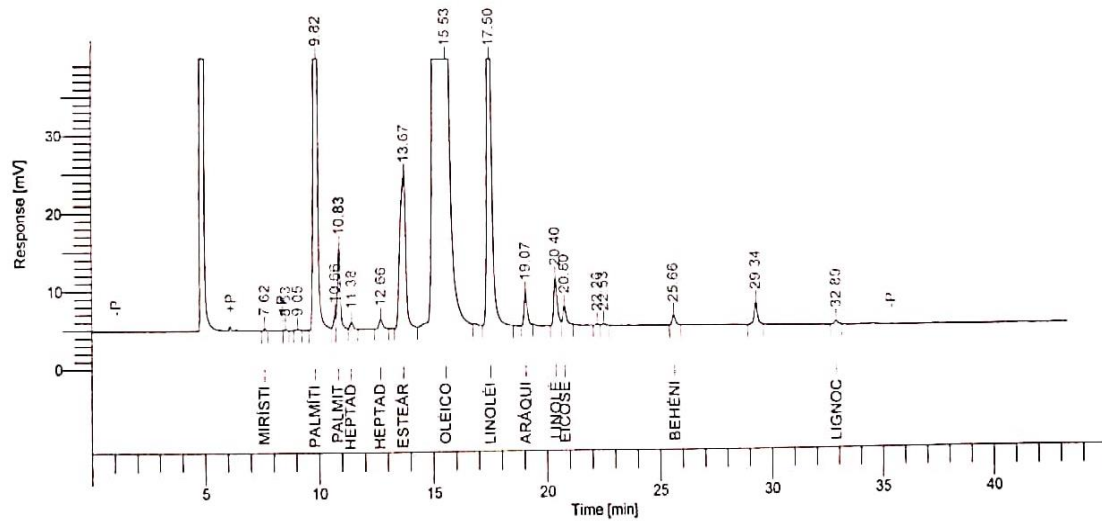
-Carrier: H₂ a 10 Psi.

-Tiempo de análisis: 45,67 min.

-Volumen de inyección: 1 µl.

En el cromatograma resultante se observan los picos correspondientes a todos los ácidos grasos. La determinación del porcentaje de cada uno de ellos se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Ácido graso X metilado (\%)} = \frac{A_x}{\sum A_{\text{ácidos grasos metilados}}} * 100$$



Cromatograma 5: Cromatograma de ácidos grasos. Se observan los diferentes picos de los ácidos grasos metilados.

Tarea 14: Determinación de jabones.

Durante el proceso de refinado se puede dar lugar a la formación de jabones, pese a que el refinado que se lleva a cabo es físico y no químico, es decir los ácidos grasos son eliminados por destilación y no por la adición de NaOH. No obstante, la presencia de estos compuestos es un parámetro de calidad del producto, por lo que su determinación es realizada a todos los aceites obtenidos de refinería. Para ello se emplea el protocolo descrito en la norma UNE 55038:1958.

Método

- Enjuagar cuidadosamente una probeta graduada de boca esmerilada con tapón, con agua destilada comercial, varias veces.
- Enjuagar (incluyendo el tapón) con una disolución de acetona al 2% de agua.
- Colocar en la probeta unos 10 ml de la disolución de Acetona al 2% y añadir 1 gota de disolución 0,1% de Azul de Bromofenol; la disolución debe quedar amarilla, si adquiere un matiz verdoso o azul repetir la operación.
- Añadir unos 10 ml de aceite, agitar y dejar decantar.
- La capa acetónica superior no debe presentar coloración azul, que revelaría la presencia de jabones.