

R

Determinación de grasa y humedad en aceitunas mediante medidas de reflectancia en infrarrojo cercano

Por A. Jiménez, E. Izquierdo, F. Rodríguez, J. I. Dueñas y C. Tortosa

Laboratorio Quimicontrol S.L. Ctra Bailén s/n. Linares. 23700 (JAÉN)

RESUMEN

Determinación de grasa y humedad en aceitunas mediante medidas de reflectancia en infrarrojo cercano.

Utilizando un equipo de medida de la reflectancia en el infrarrojo cercano, dotado de una óptica basada en filtros de interferencia, se han obtenido combinaciones lineales de estos filtros que han permitido medir, de forma simultánea, al instante y sin empleo de reactivos químicos, diferentes parámetros en la aceituna sin más preparación que la molienda de ésta en un molino de martillos. En el parámetro «Contenido graso total» y para el intervalo 15.70%-33.00%, se obtiene una buena correlación entre los valores que predice el equipo de infrarrojo, al aplicar la correspondiente ecuación y los obtenidos mediante el método de referencia Soxhlet, con un coeficiente de correlación $r=0.9908$ y un error estándar de la predicción $SEP=0.811$. En el parámetro «Humedad y materias volátiles» la correlación entre la predicción con infrarrojo y el método de referencia de desecación en estufa, presenta un coeficiente de correlación $r=0.9939$, con un $SEP=0.928$, para el intervalo de 36.5% a 65.0%.

PALABRAS-CLAVE: Aceituna - Humedad - Infrarrojo cercano - Riqueza grasa.

SUMMARY

Determination of fat and moisture in olives by near-infrared reflectance spectroscopy.

A near-infrared reflectance (NIR) equipment with optical based on interference filters was used. Lineal combination of these filters were obtained for measuring oil content and moisture in olives. A good correlation in the interval 15.70% to 33.00%, between olive oil content predicted by near-infrared and data obtained with the Soxhlet method has been obtained (correlation coefficient $r=0.9908$ and standard error of prediction $SEP=0.811$). For moisture, a good correlation, in the interval 36.5%-65.0% between measures obtained by near-infrared prediction and the reference dry-oven method was also observed ($r=0.9939$ and $SEP=0.928$). With a near-infrared technique measurement of both parameter can be takes concurrently and in a few seconds. Chemical reagents and complex sample preparation are not required, only milling of drupes by a hammer crusher.

KEY-WORDS: Fat - Moisture - NearInfrared - Olive.

1. INTRODUCCIÓN

La aceituna, drupa oval y único fruto del olivo, constituye la materia prima en el proceso de obtención del aceite de oliva virgen. Una vez el fruto alcanza su estado de madurez óptimo, es recolectado y enviado inmediatamente a la almazara donde, por procedimientos

exclusivamente mecánicos de presión o centrifugación y empleando bajas temperaturas se obtiene el zumo del fruto, el aceite de oliva virgen.

Bajo el punto de vista industrial, los dos principales componentes de la aceituna son el aceite y el agua de vegetación, cuyas determinaciones adquieren una notable importancia. El contenido total en aceite es la base para pagar a los agricultores por la riqueza en este elemento de la aceituna que aportan a la fábrica; en el proceso de fabricación el conocimiento de este parámetro es necesario para evaluar el rendimiento real del proceso. La humedad tiene su mayor interés en lo que se refiere al proceso de elaboración y en particular en los modernos sistemas denominados de dos fases. El agua de vegetación de la propia aceituna afecta directamente a importantes variables de regulación del sistema de elaboración, relacionadas con el rendimiento industrial, como son: la posición, respecto del eje de rotación, del punto de salida del aceite y la adición de agua al decantador centrífugo (Hermoso M. *et al.*, 1994).

La determinación de estos dos parámetros vienen realizándose mediante métodos de laboratorio, caracterizados unos por su lentitud, bien porque precisan de una preparación previa, como es la desecación en estufa o la extracción en Soxhlet; otros porque necesariamente han de emplear disolventes químicos, como son el caso del Soxhlet y el Autelec; en general, todos se caracterizan por ser métodos destructivos al modificar las características de la muestra respecto al original.

La necesidad de una metódica que proporcione información rápida, suficientemente precisa y limpia con el medio ambiente, hace de la técnica NIR una opción interesante.

La técnica NIR viene utilizándose, desde principios de la década de los 70, en otros sectores agroalimentarios e industriales, habiéndose desarrollado numerosas aplicaciones cualitativas y cuantitativas en diferentes productos; son clásicas las determinaciones de aceite, humedad y proteínas en cereales y semillas oleaginosas (Hartwig R.A. *et al.*, 1990) (Büchmann N.B., 1995) (Kaffka K.J. *et al.*, 1995) (Parker E.F., 1995) (Daun J. *et al.*, 1996) (Pérez B. *et al.*, 1998). Su rápida aceptación ha sido motivada por el hecho de ser una técnica que no altera la muestra, permite realizar la determinación simultánea

nea de varios parámetros, su medida es instantánea y no precisa de disolventes químicos.

La utilización de esta técnica en el sector olivareño se ha llevado a cabo hace relativamente poco tiempo y aplicado al subproducto orujo (García J.A. *et al.*, 1996)(Hermoso M. *et al.*, 1997), sin embargo no se ha encontrado referencia alguna respecto de la aceituna.

En este trabajo, se pretende desarrollar y verificar la calibración mediante infrarrojo cercano para los parámetros: grasa en húmedo y humedad de la aceituna, empleando los valores de la reflectancia de los 10 filtros que vienen montados en el equipo disponible en nuestro laboratorio.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de aceituna

Se emplearon un total de 70 muestras de aceituna, de la variedad PICUAL, procedentes de almazaras situadas en diferentes zonas de producción y tomadas a lo largo de toda la campaña de recolección, (entre el 1 de Diciembre de 1998 y 28 de Febrero de 1999). El rango de muestras cubre el intervalo que presenta la aceituna en los parámetros: Contenido graso total, referido a materia húmeda; humedad y materias volátiles. Las muestras se han analizado inmediatamente a su recepción, sin que haya transcurrido más de 24 horas desde que se recolectaron del árbol. Factores agronómicos como zona de producción y estado de madurez del fruto, han sido tenidos en cuenta en este estudio.

Preparación de la muestra

La muestra de aceituna, del orden de un kilogramo, es molida en un molino de martillos con criba dentada, obteniéndose un granulado del hueso fino y homogéneo. La muestra triturada se homogeneiza y una porción de ésta se deposita en la cápsula de medida del equipo NIR, realizándose la adquisición del espectro. El resto de la muestra se emplea para realizar los análisis con los métodos de referencia.

Métodos de análisis de referencia

Para determinar la humedad de la muestra se utiliza el método de desecación en estufa a 105°C. Una porción de 45gr, de muestra homogeneizada, se depositan en una cápsula de porcelana y se deseca en una estufa a 105°C durante 12 horas. La pérdida de peso da el porcentaje de humedad y materias volátiles en la muestra (Frías L. *et al.*, 1991).

El parámetro de: contenido graso total, referido a materia húmeda, se realiza empleando el método de extracción de la grasa en Soxhlet con éter de petróleo. La muestra desecada, empleada en la determi-

nación de la humedad, es introducida en un extractor Soxhlet y extraída la grasa durante 8 horas con éter de petróleo. La cantidad de aceite recuperado, referido al peso de la muestra húmeda, da el contenido graso total (Frías L. *et al.*, 1991).

Análisis de las muestras mediante infrarrojo cercano

Se utiliza el equipo NIR-Infr Alyzer 2000 (Bran+Luebbe GMBH, Norderstedt, Alemania 1997). En este equipo, la muestra triturada es irradiada con longitudes de onda específicas del espectro del infrarrojo cercano, comprendidas entre 1445nm y 2310nm. Su sistema óptico está basado en una rueda con 10 filtros de interferencia, de unas longitudes de onda definidas y con un paso de banda de 2 nm. Cada muestra, molida y homogeneizada, es sometida a dos barridos de la rueda de filtros. Los datos son almacenados en el ordenador como medida de absorbancia ($\log 1/R$) de cada uno de los filtros. Para realizar la calibración y la verificación de la calibración, se utiliza el valor medio de los dos barridos, sin ningún tratamiento matemático.

Selección de las muestras de calibración y verificación

Reunidos los valores de los análisis de referencia y del infrarrojo cercano, las 70 muestras, se ordenan en un orden creciente para cada parámetro y se subdividen en dos grupos para realizar los tratamientos de datos. Para la humedad se seleccionan 55 muestras para calibración y 17 para predicción (verificación de la calibración); para la grasa 50 muestras son para la calibración y 20 para la predicción. Esta selección se ha realizado de forma manual, procurando que en cada subgrupo se cubriese el rango previsto de análisis.

Análisis estadístico de los datos

El desarrollo de las ecuaciones de calibración se ha efectuado mediante regresión lineal múltiple (MLR). Los datos de absorbancia de los filtros ($\log 1/R$), del conjunto de calibración, junto con los datos de los métodos de referencia, para cada uno de los parámetros estudiados, son analizados mediante el paquete estadístico SAS (Charles Lin C. *et al.*, 1985). Se utiliza el procedimiento de regresión REG. La mejor combinación lineal de filtros (variables independientes) se selecciona mediante la opción RSQUARE del procedimiento, esta opción realiza todas las combinaciones posibles de las variables independientes y da, en la salida impresa, los estadísticos: Coeficiente de determinación múltiple (R^2), Coeficiente de Mallow (C_p) y raíz cuadrada del cuadrado medio del error estándar (RMSE). Se toma como criterio para seleccionar la mejor combinación:

R^2 más elevado, valor de $C_{(p)}$ más próximo al número de términos que emplea la ecuación y el valor de RMSE más bajo. Con los filtros seleccionados se realiza una regresión lineal múltiple para obtener los correspondientes coeficientes y los estadísticos de evaluación de la ecuación: R^2 , F-ratio y SEC. (Jerome J.W. Jr, 1992)

La ecuación lineal múltiple resultante se utiliza para predecir los datos del conjunto de validación. Se calculan los estadísticos: coeficiente de correlación entre valores de laboratorio-predicción infrarrojo (r), SEP y sesgo (Jerome J.W. Jr, 1992).

Se determina el error de laboratorio de los métodos de referencia (SEL), analizando, por duplicado, 12 muestras de contenidos diferentes en ambos parámetros. (Grant T.W., 1985).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Contenido graso total en húmedo. En la tabla nº 1, se indica los resultados de la calibración del equipo de infrarrojo cercano para el parámetro de contenido total en aceite, referido a la materia húmeda. El rango empleado es suficientemente representativo de los valores que se pueden encontrar para este fruto y, como se aprecia en la figura nº 1A, las muestras cubren todo el intervalo de forma satisfactoria. La ecuación lineal múltiple de calibración obtenida posee un elevado coeficiente de correlación con un nivel de significancia alto ($\alpha < 0,001$). El valor de la F-ratio indica, además, que la ecuación es bastante robusta. Los filtros de interferencia seleccionados corresponden a las longitudes de onda: 1445nm, 1759nm, 1778nm, 2270nm y 2310 nm; estas longitudes de onda se encuentran dentro de algunas de las bandas de absorción características que pueden observarse en los aceites (Velasco L *et al.*, 1998) (Bhatty R. S, *et al.*, 1991) (Baeten V, *et al.*, 1997), concretamente en las regiones de 1350 a 1450 nm, 1650 a 1800 nm y 2250 a 2380nm. Las vibraciones y estructuras moleculares que suelen asignarse con más frecuencia a estas bandas corresponden a grupos O-H/C-H en combinación, C-H en vibración/cis=C-H y C-O en vibración C-H rotación del segundo sobretono respectivamente (Baeten V, *et al.*, 1997), (Shenk J.S, 1992) (Ralph T.H. *et al.*, 1956) (Bhatty R.S., 1991) (Pandford J.A., 1988) (Sato T. *et al.*, 1991). En la figura nº 1A se representa los resultados de la calibración, indicándose los límites de confianza al 99%, respecto al valor medio. (Charles L. C., *et al.*, 1996).

En la tabla nº 1 se indican los coeficientes de la ecuación de correlación múltiple obtenida, así como los diferentes estadísticos obtenidos para evaluar la calibración. La aplicación de la ecuación: $y = 25.6961 - 42.52 \cdot A_{1445} + 366.08 \cdot A_{1759} - 300.39 \cdot A_{1778} - 53.51 \cdot A_{2270} + 34.94 \cdot A_{2310}$ ($y =$ % Grasa en húmedo, $A_i =$ absorbancia del filtro a «i» nm), a los datos de absorbancia del conjunto de verificación, da lugar a los resultados

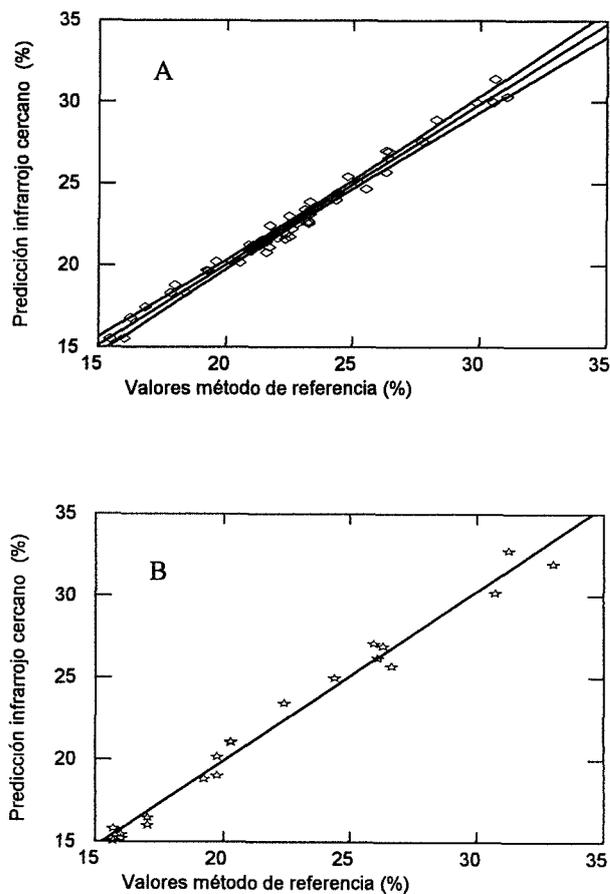


Figura 1

Datos de predicción, mediante infrarrojo cercano, del contenido graso total de la aceituna, referido a materia húmeda.
A) Datos de calibración y límites de confianza al 99%
B) Datos de la verificación

reflejados, también, en la tabla nº 1. La figura nº 1B muestra, gráficamente, los resultados de la verificación. El error estándar de la predicción (SEP) es mayor que el error de laboratorio (SEL=0.20), aunque dentro del intervalo 0.1- 0.92 encontrado para rangos similares en otras semillas oleaginosas (Harwing R.A., *et al.*, 1990) (Pandford J.A., *et al.*, 1988) (Pandford J.A., *et al.*, 1990) (Bhatty R.S., 1991) (Daun J., *et al.*, 1996). El 55% de las muestras caen dentro del intervalo de confianza definido en la calibración.

b) Humedad y materias volátiles. En la tabla nº 2 se indica los resultados del proceso de calibración. Para este parámetro y a partir de las 55 muestras seleccionadas para el conjunto de calibración, la mejor ecuación de correlación múltiple obtenida mediante el algoritmo RSQUARE (Charles L.C., *et al.*, 1985) ha seleccionado seis filtros de interferencia que corresponden a las longitudes de onda: 1759nm, 1778nm, 1940nm, 2100nm, 2180nm y 2208nm. Las longitudes de onda 1778 y 1940 nm se asocian frecuentemente a la humedad y bandas O-H

Tabla 1
Resultados de calibración y verificación para el parámetro «Contenido graso» en aceituna, referido a materia húmeda

Calibración											
N ^a	Rango (%)	[λ_1 (K ₁)	λ_2 (K ₂)	λ_3 (K ₃)	λ_4 (K ₄)	λ_5 (K ₅)	K ₀] ^b	R ²	R ² -ajust ^c	F-ratio ^d	SEC ^e
50	15.45-31.05	1445(-42.52)	1759(366.08)	1778(-300.39)	2270(-53.51)	2310(34.94)	25.6961	0.9824	0.9804	491.3	0.5213
Verificación											
N ^a	Rango (%)	r ^f	SEP ^g	Sesgo ^h							
20	15.7-33.0	0.9908	0.811	-0.0048							

a) N° de muestras; b) Longitudes de onda seleccionadas (λ), en nm y coeficientes de la ecuación obtenida (K), K₀=intercepto; c) Cuadrado del coeficiente de determinación de la ecuación lineal múltiple, ajustado; d) Estadístico F del análisis de la varianza de la regresión múltiple; e) Error estándar de la calibración; f) Coeficiente de correlación entre valores referencia-predicción infrarrojo, en la verificación; g) Error estándar de la predicción (verificación); h) Valor medio de los residuos.

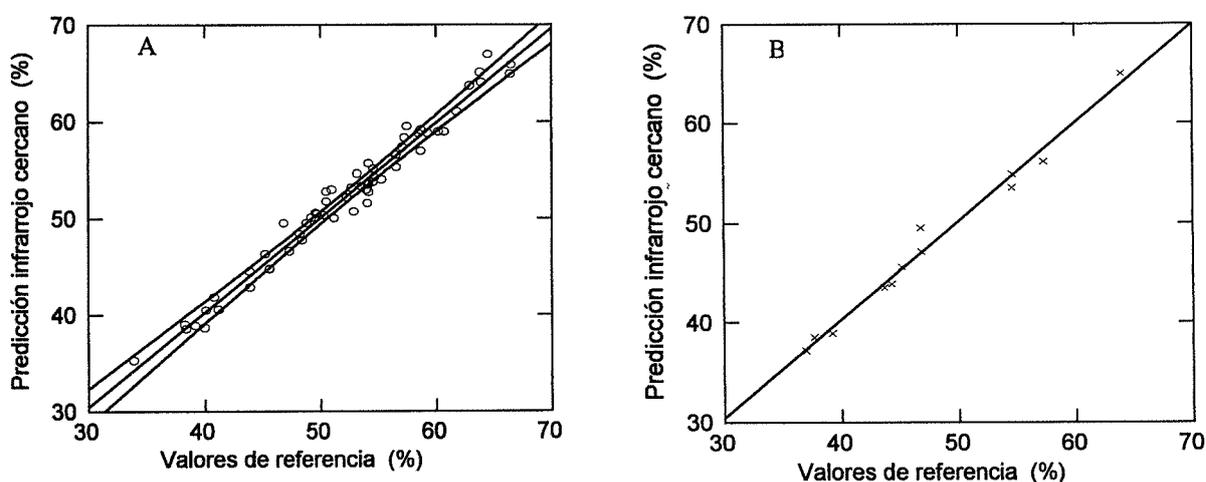


Figura 2

Datos de predicción mediante infrarrojo cercano de la humedad y materias volátiles de la aceituna. A) Datos de calibración e intervalo de confianza al 99%; B) Datos de verificación

Tabla 2
Resultados de calibración y verificación para el parámetro «Humedad y materias volátiles» en aceituna

Calibración												
N ^a	Rango (%)	[λ_1 (K ₁)	λ_2 (K ₂)	λ_3 (K ₃)	λ_4 (K ₄)	λ_5 (K ₅)	λ_6 (K ₆)	K ₀] ^b	R ²	R ² -ajust ^c	F-ratio ^d	SEC ^e
55	33.9-66.5	1759(-718.55)	1778(842.34)	1940(-4.6457)	2100(332.81)	2180(-1309.66)	2208(906.69)	10.05	0.9755	0.9725	319.1	1.2746
Verificación												
N ^a	Rango (%)	r ^f	SEP ^g	Sesgo ^h								
17	36.5-65.0	0.9939	0.928	-0.18								

Ver la tabla n° 1 para la identificación de las referencias.

(Shenk J.S., 1992) (Barton F.E., *et al.*, 1988) (Pandford J.A., *et al.*, 1988) (Hartwig R.A., *et al.*, 1990) (Benson I.B., 1995), el resto de las longitudes de onda se asocian a vibraciones C-H/C-O/C=O (Shenk J.S., 1992), la inclusión de estas longitudes en el parámetro analizado puede justificarse por el hecho de que durante la desecación en estufa a 105°C se eli-

mina, junto al agua, materias volátiles de naturaleza orgánica. Hartwing *et al.* (1990), incluye la $\lambda=1759$ nm dentro del parámetro humedad; Pandford *et al.* (1988), incluye longitudes próximas a los 2100nm y 2200nm en la determinación de la humedad de algunos productos oleaginosos. La ecuación de calibración obtenida es altamente significativa ($\alpha < 0,001$) y

con un buen coeficiente de correlación ($R^2=0,9755$). En la tabla nº2 se indica los coeficientes de la ecuación y en la figura nº2A los resultados de la calibración y límites de confianza al 99%.

A los datos de absorbancia de las 17 muestras del conjunto de verificación, con valores comprendidos entre el 36.5% y el 65.0%, se les aplica la ecuación de calibración: $y=10.05 - 718.55*A_{1759} + 842.34*A_{1778} - 4.6457*A_{1940} + 332.81*A_{2100} - 1309.66*A_{2180} + 906.69*A_{2208}$ (y =% Humedad y materias volátiles), obteniéndose los resultados reflejados en la tabla nº2. El error estándar de predicción (SEP) es mayor que el error de laboratorio (SEL=0,40) encontrándose dentro los intervalos observados en otros productos oleaginosos (Pandford J.A., *et al.*, 1988) (Hartwig R.A., *et al.*, 1990) (García J.A., *et al.*, 1996). El porcentaje de muestras que caen dentro del intervalo de confianza definido en la calibración es mayor del 80%.

BIBLIOGRAFÍA

- Baeten V. y Aparicio, R. (1997).—«Posibilidades de las técnicas espectroscópicas infrarroja y Raman para la autenticación del aceite de oliva virgen».—*Olivae* nº 69.
- Barton F.E. and Cavanagh G.C. (1988).—«The calibration of NIR reflectance spectrometer for the determination of diverse compositional parameters».—*J.A.O.C.S.* Vol. 65. nº 5.
- Benson I.B. (1995).—«The characteristics and scope of continuous on-line near infrared measurement».—*Spectroscopy Europe* (67), 18-24.
- Bhatty R.S. (1991).—«Measurement of oil in whole flaxseed by Near-Infrared».—*J.A.O.C.S.* vol. 68. nº 1.
- Büchmann N.B. (1995).—«The use of a new NIT analyzer from Tecator for determining protein and fat in animal feeds en *Leaping ahead with Near Infrared spectroscopy*.—Ed G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Wlesh and A.B. Blakeney.—Royal Australian Chemical Institute, Lorne. 248.
- Charles Lin C. *et al.* (1985).—«SAS/STAT™ Guide for personal computer, version 6 edition».—SAS Institute Inc. Edit Stephenie P. Joyner. P. 269. N.Y.
- Daun J. and Williams P. (1996).—«Near-Infrared analysis of oilseeds: Current status and future directions *New Techniques and Applications in Lipids Analysis*.—Edit. Richard E. McDonall and Magdi M. Mossoba.—AOCSS PRESS, Champaign, Illinois. P. 266.
- Frías L. y *col.* (1991).—«Analistas de laboratorio de almazaras».—Serie apuntes nº 6/1991. Ed. D.G.E.I.E.A. Junta de Andalucía.
- García J.A, Hermoso M. y Cáceres P. (1996).—«Determinación del contenido graso y la humedad en orujo de dos fases mediante infrarrojo cercano».—*Grasas y Aceites*. 47, 317-322.
- Grant, T. Wernimont (1985).—«Use of statistics to developed and evaluate analytical methods. Ed. Association of official analytical chemists».—Arlington. USA.
- Hartwing R. A. and Hurburgh C. M. Jr. (1990).—«Near-Infrared Reflectance Measurement of Moisture, Protein and Oil content of Ground Crambe See».—*J.A.O.C.S.* Vol 67. nº 7.
- Hermoso M. y *col.* (1994).—«Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases».—Serie apuntes nº 11/1994.—Ed. C.A.P. Junta de Andalucía.
- Hermoso M., Uceda M., García A., Jiménez A., Beltrán G. (1997).—«Preliminar results of NIR on-line for oil content and humidity in olive cake from the two-phases decanter en *Proceeding of the Third International Symposium on Olive Growing*.—Acta Horticulturae nº 474, Ed I.T. Metzidakis and D.G. Voyiatzis. Leuven, Belgica. Vol. 2, p. 717.
- Holman R.T. and Edmonson P.R.(1956).—«Near-Infrared spectra of fatty acids and some related substances».—*Analytical Chemistry*. Vol 28. nº 10.
- Jerome J. Workman Jr. (1992).—«Nir spectroscopy calibration basics en *Handbook of Near-Infrared analysis p-247*.—Ed. Burns D.A. and E.W. Ciurczak. Marcel Dekker. N.Y.
- Kafka, K.J. y Gyarmati L.S.(1995).—«Quality determination in the food industry en *Leaping ahead with Near Infrared spectroscopy*.—Ed G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Wlesh and A.B. Blakeney.—Royal Australian Chemical Institute, Lorne. P. 1261.
- Mark H. (1992).—«Data analysis: Multilinear regression and Principal Component Analysis en *Handbook of Near-Infrared analysis p-107*.—Ed. Burns D.A. and E.W. Ciurczak. Marcel Dekker. N.Y.
- Pandford J.A., Williams P.C. and deMan J.M. (1998).—«Analysis of oilseeds for Protein, Oil, Fiber and Moisture by Near-Infrared reflectante spectroscopy».—*J.A.O.C.S.* Vol. 65, nº 10.
- Pandford J.A. and deMan J.M. (1990).—«Determination of oil content of seed by NIR: influence of fatty acid composition on waveltengh selection».—*J.A.O.C.S.* Vol. 67, nº 8.
- Parker E.F. (1995).—«NIR analysis of dairy products in the New Zealand dairy en *Leaping ahead with Near Infrared spectroscopy*.—Ed. G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Wlesh and A.B. Blakeney.—Royal Australian Chemical Institute, Lorne. 282.
- Pérez B., Velasco L., and Fernández J.M. (1998).—«Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by Near-Infrared reflectance spectroscopy».—*J.A.O.C.S.* Vol. 75, nº 5.
- Pandford J.A., Williams P.C. and deMan J.M. (1998).—«Analysis of oilseeds for protein, oil, fiber and moisture by Near-Infrared reflectante spectroscopy».—*J.A.O.C.S.* Vol. 65 nº10.
- Robertson J.A. and Windham W.R. (1981).—«Comparative study of methods of determining oil content of sunflower seed».—*J.A.O.C.S* nº 994.
- Sato T., Kawano S. and Iwamoto M. (1991).—«Near-Infrared spectral patterns of fatty acid analysis from fats and oils».—*J.A.O.C.S.* Vol. 68. nº11.
- Shenk J.S. (1992).—«Application of Nir spectroscopy to agricultural products en *Handbook of Near-Infrared analysis p. 338*.—Ed. Burns D.A. and E.W. Ciurczak. Marcel Dekker. N.Y.
- Velasco L., Pérez Vich B. and Fernández J.M. (1998).—«A rapid and simple approach to identify different sunflower oil types by means of Near-Infrared reflectance spectroscopy».—*J.A.O.C.S.* Vol. 75. Nº 12.
- Williams P. and Sobering D. (1995).—«How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations en *Near Infrared Spectroscopy. The future Waves*.—Ed. Davies A.M.C. and Williams P.C. NIR Publication.—Chichester. UK. P. 185.