

Determinación de algunos parámetros de pureza en aceites de oliva. Resultados de un estudio colaborativo

Por **W. Moreda**, **M.C. Pérez Camino** y **A. Cert**

Instituto de la Grasa. Avda. Padre García Tejero, 4. 41012 - Sevilla. España.

RESUMEN

Determinación de algunos parámetros de pureza en aceites de oliva. Resultados de un estudio colaborativo.

Se presentan los resultados de un estudio colaborativo realizado con la participación de laboratorios de la Administración Pública y de industrias del Sector Oleícola con el objeto de determinar la precisión de los métodos analíticos que se utilizan para la cuantificación de ciertos componentes de los aceites de oliva. Esteroles totales, composición esterólica, isómeros *trans* de ácidos grasos, ceras y estigmastadienos han sido determinados en muestras de aceites de oliva virgen, de oliva y de orujo de oliva, mediante la aplicación de los métodos analíticos indicados en el reglamento CEE 2568/91 de la Unión Europea y posteriores modificaciones, así como en el Documento TC20/11 del Consejo Oleícola Internacional (1993). Se ha efectuado un análisis estadístico de los resultados de acuerdo con la norma ISO 5725-1986 (E).

PALABRAS-CLAVE: *Aceite de oliva — Análisis estadístico — Estudio colaborativo — Parámetro de pureza.*

SUMMARY

Determination of some purity parameters in olive oils. Results from a collaborative study.

The results of a collaborative study with the participation of Governmental and Olive Oil Industry laboratories is presented. This study was carried out to determine the precision of the analytical methods used for quantifying certain components of olive oils. Samples of virgin olive oil, olive oil and residue olive oil were analysed for total sterols, sterolic composition, trans isomers from fatty acids, waxes and stigmastadienes, using the analytical methods included in the Commission Regulation EEC 2568/91 of the European Union and modifications therein, and in Document TC20/11 of the International Olive Oil Council (1993). The results have been statistically processed according to the standard ISO 5725-1986 (E).

KEY-WORDS: *Collaborative study — Olive oil — Purity parameter — Statistical analysis.*

1. INTRODUCCIÓN

La pureza de un aceite de oliva se evalúa mediante la determinación en el mismo de un conjunto de componentes químicos que permiten establecer su genuinidad. Estos componentes tienen dos orígenes diferentes: aquellos que están presentes de forma natural y los que se forman por transformación de componentes naturales durante los procesos de obtención o refinación.

Entre los primeros se encuentran esteroles y ceras y, entre los segundos, los isómeros *trans* de los ácidos grasos

y los estigmastadienos. Los valores límites de estos parámetros para que un aceite sea considerado de oliva están definidos en los reglamentos de la Unión Europea y de otras organizaciones internacionales, tales como, el Consejo Oleícola Internacional y la FAO/OMS.

La concentración y composición de esteroles permiten determinar la presencia de aceites de semillas en aceites de oliva, el contenido en ceras indica la presencia de aceites de orujo de oliva, el porcentaje de isómeros *trans* de ácidos grasos pone de manifiesto la presencia de aceites desesterolizados en los aceites de oliva y, por último, el contenido en estigmastadienos permite detectar la presencia de aceites vegetales refinados en aceites de oliva virgen.

Los métodos analíticos para la determinación de estos componentes están recogidos en Anexos al Reglamento CEE 2568/91 de la Unión Europea, en modificaciones posteriores y en el Documento T20/11 del COI. Sin embargo, estos reglamentos no especifican la precisión que cabe esperar en su aplicación. Debido a que hay establecidos unos valores límites que no se pueden sobrepasar, el conocimiento de la precisión de cada método es de gran importancia en los casos en que la concentración del componente esté cercana al valor límite. Por este motivo, dentro del convenio firmado en el año 1994 entre el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación y las asociaciones de industrias exportadoras ASOLIVA y envasadoras ANIE-RAC, se proyectó un estudio colaborativo que incluía tanto a laboratorios públicos como a laboratorios de industrias oleícolas para determinar con qué fiabilidad, tanto en términos de reproducibilidad como de repetibilidad, se llevaban a cabo estas determinaciones analíticas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Para el planteamiento del análisis circular se siguieron las indicaciones dadas por W. Horwitz (1988).

A cada laboratorio participante se le remitieron 6 muestras identificadas con claves que correspondían a duplicados de tres aceites que representaban los tres tipos de aceite de oliva que se preparan para consumo: aceite de oliva virgen (contaminado con refinado), aceite de orujo de oliva (mezcla de aceite de oliva virgen y aceite refinado de

orujo) y aceite de oliva (mezcla de aceites de oliva virgen y refinado). Las muestras se prepararon de forma que las concentraciones de los componentes a determinar alcanzasen los niveles que normalmente se encuentran en los tres tipos de aceites. Además se envió una muestra de aceite patrón con la indicación del valor de cada uno de los parámetros objeto del análisis circular, con el fin de que cada participante pudiese evaluar su metodología analítica, corrigiendo aquellos errores sistemáticos, principalmente debidos a diferencias en la concentración de las soluciones patrón, y que dan lugar a valores anómalos que son rechazados en el estudio estadístico.

Junto con las muestras se remitió un escrito donde se indicaban las determinaciones a realizar junto con los métodos analíticos a emplear y una hoja de resultados. Los métodos analíticos utilizados fueron los siguientes:

- Esteroles (CEE 2568/91 anexo V). Saponificación del aceite, fraccionamiento del insaponificable por CCF de sílica gel, formación de derivados sililados y análisis por cromatografía de gases en columna capilar.
- Ceras (CEE 183/93). Fraccionamiento del aceite en columna de sílica gel y análisis por cromatografía de gases en columna capilar de pequeña longitud.
- Isómeros *trans* de ácidos grasos (CEE 1429/92). Formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por el procedimiento de metilación en frío con solución 2N de potasa metanólica y análisis por cromatografía de gases en columna capilar de alta polaridad.
- Estigmastadienos en aceites vírgenes (CE 656/95). Saponificación del aceite, fraccionamiento del insaponificable en columna de sílica gel y análisis por cromatografía de gases en columna capilar.
- Estigmastadienos en aceites de oliva y de orujo de oliva (COI T20/Doc 11, Rev 1, 1993). Fraccionamiento del aceite en columna de sílica gel y análisis por cromatografía de gases en columna capilar.

En la experiencia participaron 26 laboratorios, pero no todos ellos llevaron a cabo todas las determinaciones. Para cada componente y tipo de aceite se recibieron los resultados duplicados que se indican a continuación: esteroides y composición esteróica, 26; isómeros *trans*, 22; ceras, 21 y estigmastadienos, 24. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Internacional ISO 5725-1986(E) donde se indican los criterios de rechazo de resultados y el procedimiento mate-

mático a seguir. El tiempo para la realización de los análisis fue de 30 días.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De cada aceite se enviaron dos muestras con distinto código por lo que para cada parámetro analítico se obtuvieron dos resultados que permitieron efectuar un cálculo muy fiable de la repetibilidad.

Para la verificación de la eventual presencia de valores anómalos se utilizaron los métodos de Cochran y Dixon. El método de Cochran determina la presencia de laboratorios que dan resultados cuya diferencia entre duplicados es excepcionalmente alta y el método de Dixon determina valores de un laboratorio que son significativamente diferentes con respecto a los resultados aportados por los demás laboratorios. Para el estudio estadístico se eliminaron los valores rechazados por alguno de dichos métodos. Para cada determinación el *Nº de laboratorios* representa el número de duplicados utilizados en el análisis estadístico.

Los resultados analíticos de los laboratorios se evaluaron estadísticamente con objeto de determinar el grado de precisión del método en términos de repetibilidad y reproducibilidad, determinándose parámetros cuyos valores dan una medida de los errores que pueden afectar a los resultados de las determinaciones analíticas. Estos parámetros estadísticos son los siguientes:

r : valor de repetibilidad ($2.8\sqrt{S_r^2}$). Significa que los valores obtenidos en dos determinaciones sucesivas realizadas por el mismo operador en la misma muestra no diferirán en más de r .

S_r : desviación estándar de la repetibilidad.

RSD_r : desviación estándar relativa de la repetibilidad.

R : valor de reproducibilidad ($2.8\sqrt{S_R^2}$). Significa que los valores obtenidos en dos laboratorios diferentes sobre una misma muestra no diferirán en más de R .

S_R : desviación estándar de la reproducibilidad.

RSD_R : desviación estándar relativa de la reproducibilidad.

Las Tablas I a XII muestran los resultados del análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio colaborativo para los tres tipos de aceites.

Tabla I
Parámetros estadísticos para el contenido en Esteroles Totales (mg/Kg)

Muestra	Nº Labor	Media	r	S_r	RSD_r (%)	R	S_R	RSD_R (%)
Aceite Oliva Virgen	26	1479.898	218.179	77.921	5.3	358.011	127.861	8.6
Aceite Orujo Oliva	23	2078.261	225.651	80.590	3.9	445.446	159.09	7.7
Aceite Oliva	23	1366.594	163.171	58.275	4.3	321.447	114.802	8.4

Tabla II
Parámetros estadísticos para el contenido en Colesterol (%)

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	21	0.205	0.163	0.058	28.4	0.258	0.092	44.9
Aceite Orujo Oliva	23	0.249	0.170	0.061	24.4	0.298	0.106	42.7
Aceite Oliva	23	0.202	0.126	0.045	22.3	0.307	0.110	54.3

Tabla III
Parámetros estadísticos para el contenido en Brasicasterol (%).

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	22	0	–	–	–	–	–	–
Aceite Orujo Oliva	22	0.069	0.113	0.041	58.7	0.188	0.067	97.4
Aceite Oliva	25	0.020	0.079	0.028	141.5	0.127	0.046	227.5

Tabla IV
Parámetros estadísticos para el contenido en Campesterol (%)

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	24	3.168	0.237	0.085	2.7	0.386	0.138	4.4
Aceite Orujo Oliva	24	3.504	0.260	0.093	2.6	0.342	0.122	3.5
Aceite Oliva	24	3.153	0.265	0.095	3.0	0.423	0.151	4.8

Tabla V
Parámetros estadísticos para el contenido en Estigmasterol (%).

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	25	0.742	0.144	0.051	6.9	0.236	0.084	11.4
Aceite Orujo Oliva	25	1.569	0.206	0.074	4.7	0.282	0.101	6.4
Aceite Oliva	25	0.755	0.271	0.097	12.8	0.280	0.100	13.3

Tabla VI
Parámetros estadísticos para el contenido en β-Sitosterol aparente (%).

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	22	94.571	0.723	0.258	0.3	1.589	0.567	0.6
Aceite Orujo Oliva	20	92.476	0.854	0.305	0.3	1.909	0.682	0.7
Aceite Oliva	24	94.724	0.883	0.315	0.3	1.430	0.511	0.5

Tabla VII
Parámetros estadísticos para el contenido en Δ^7 -Estigmastenol (%)

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	25	0.262	0.179	0.064	24.4	0.218	0.078	26.7
Aceite Orujo Oliva	25	0.615	0.275	0.098	15.9	0.611	0.218	35.4
Aceite Oliva	24	0.286	0.147	0.053	18.4	0.284	0.101	35.5

Tabla VIII
Parámetros estadísticos para el contenido en Isómeros trans C18:1 (%)

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	20	0.018	0.015	0.006	30.1	0.028	0.010	54.6
Aceite Orujo Oliva	19	0.115	0.023	0.008	7.3	0.035	0.012	11.0
Aceite Oliva	21	0.043	0.023	0.008	19.5	0.043	0.015	36.0

Tabla IX
Parámetros estadísticos para el contenido en Isómeros trans C18:2 (%)

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	21	0.010	0.020	0.007	71.0	0.018	0.006	63.1
Aceite Orujo Oliva	20	0.081	0.018	0.006	7.8	0.023	0.008	10.3
Aceite Oliva	21	0.051	0.013	0.005	8.8	0.028	0.010	19.6

Tabla X
Parámetros estadísticos para el contenido en Isómeros trans C18:3 (%)

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	18	0.006	0.009	0.003	55.2	0.027	0.010	163.8
Aceite Orujo Oliva	21	0.056	0.023	0.008	14.9	0.041	0.015	25.8
Aceite Oliva	19	0.057	0.022	0.008	13.6	0.056	0.020	35.2

Tabla XI
Parámetros estadísticos para el contenido en Ceras (mg/Kg)

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	20	115.175	34.101	12.179	10.5	42.917	15.328	13.3
Aceite Orujo Oliva	14	2251.929	259.123	92.544	4.1	454.431	162.297	7.2
Aceite Oliva	19	128.895	23.214	8.291	6.4	43.344	15.480	12.0

Tabla XII
Parámetros estadísticos para el contenido en Estigmastadienos (mg/Kg)

Muestra	Nº Labor	Media	r	S _r	RSD _r (%)	R	S _R	RSD _R (%)
Aceite Oliva Virgen	19	0.98	0.159	0.057	5.8	0.423	0.151	15.4
Aceite Orujo Oliva	20	21.36	2.201	0.786	3.7	6.642	2.372	11.1
Aceite Oliva	21	11.595	1.495	0.534	4.6	2.235	0.798	6.9

Del examen de los datos de las determinaciones de colesterol y brasicasterol en los aceites de oliva virgen y de orujo de oliva, se observa que hay un importante rechazo de resultados (desde 3 hasta 5 sobre un total de 26) y una deficiente precisión (Tablas II y III). La precisión de ambas determinaciones en el aceite de oliva (Tablas II y III) también es muy deficiente. Ello se atribuye a que se trata de medidas de áreas de picos cromatográficos muy pequeños que pueden solaparse con otros picos debidos a impurezas que aparecen a tiempos de retención similares, si la separación de los esteroides en la CCF no se ha llevado a cabo correctamente. En las determinaciones de esteroides totales en el aceite de oliva y en el de orujo de oliva, así como de β -sitosterol aparente en los tres aceites, se observa un rechazo de muestras (de 2 a 6 sobre 26) que es muy marcado en el caso del β -sitosterol en aceite de orujo de oliva (6 sobre 26); sin embargo, la reproducibilidad es buena en los esteroides totales (Tabla I) y muy buena en el β -sitosterol (Tabla VI). Estos hechos pueden ser debidos a que los valores son el resultado de medidas de áreas de picos muy grandes respecto al resto de componentes y respecto al estándar interno, lo que lleva consigo posibles errores en la integración. El campesterol (Tabla IV) y el estigmasterol (Tabla V) se determinan con una precisión aceptable, acorde con el tamaño de los picos cromatográficos a que dan lugar. Sin embargo, el Δ^7 -estigmastenol (Tabla VII) muestra una mala repetibilidad y reproducibilidad que se atribuye a la variabilidad que introduce la ambigua delimitación de la banda de esteroides en la placa de CCF de sílica gel (León y Cert, 1994), que conlleva una imprecisa recuperación de los Δ^7 -esteroides al efectuar el raspado de dicha banda. Debido a que el límite máximo admitido para la concentración de este compuesto en los aceites de oliva (0,5%) está muy próximo a los valores normales (0,3 - 0,4%), se pone de manifiesto la necesidad de mejorar la reproducibilidad del método analítico, sustituyendo la separación por CCF sobre sílica gel por otra técnica de separación. En términos generales, la precisión hallada en el análisis de los diferentes esteroides es similar a la encontrada en un ensayo realizado por laboratorios italianos (Morchio *et al.*, 1989).

Los isómeros *trans* de ácidos grasos (Tablas VIII a X) presentan para las determinaciones de *trans* 18:1 y *trans* 18:2 en el aceite de orujo de oliva (aceites con alto contenido en estos compuestos) una precisión aceptable mien-

tras que para las determinaciones en los restantes tipos de aceites los valores de la repetibilidad y reproducibilidad son muy elevados. En efecto, los aceites de oliva virgen y de oliva dan lugar a picos muy pequeños (menores que el 0,05%) cuya integración se ve afectada por el error de la diferente atribución de línea base. La determinación de *trans* 18:1 está también afectada por la variabilidad debida a las condiciones de inyección del cromatógrafo de gases (León y Cert, 1994). En el caso de los *trans* 18:3 los errores se pueden atribuir a la incorrecta identificación de los picos por diferencias en los tiempos de retención a causa de distinta polaridad de las columnas utilizadas para la cromatografía de gases (León y Cert, 1994). Como consecuencia de los resultados obtenidos en el caso de la determinación de los isómeros *trans* 18:1, 18:2 y 18:3 en el aceite de oliva virgen, sería recomendable ampliar el límite actualmente vigente para este tipo de aceite de 0,03% hasta 0,05%, ya que la reproducibilidad (valores de R 0,028, 0,018 y 0,027 para 18:1, 18:2 y 18:3 respectivamente) es de la misma magnitud que el límite. Estos resultados no son comparables con los aportados por Amelio *et al.* (1993), ya que estos autores examinan aceites con unos niveles de ácidos *trans* muy superiores a los que normalmente exhiben los aceites de oliva.

En las determinaciones de ceras en los aceites de orujo (Tabla XI), se eliminan los resultados de 7 laboratorios de un total de 21 por falta de repetibilidad. Este hecho puede atribuirse al desigual fraccionamiento del patrón interno y las ceras que a veces ocurre en la columna de sílica gel (León y Cert, 1994) y que es más acusada cuando la concentración de ceras es grande. Para evitarlo se recomienda el uso de un indicador coloreado que permite apreciar la posición de las ceras en la columna de fraccionamiento y así recoger la fracción entera (León y Cert, 1994). También se observa escasa repetibilidad en el caso de los aceites vírgenes (Tabla XI) debido a que el parámetro es el resultado de sumar las áreas de cuatro pequeños picos cromatográficos, cada uno de ellos debido a varios compuestos. Por tanto, debe evitarse el desdoblamiento de los picos utilizando para la cromatografía de gases unas condiciones que proporcionen escasa resolución, tales como, columna corta, diámetro grande y fase con poca polaridad. Finalmente la determinación de estigmastadienos resulta con una precisión aceptable (Tabla XII) indicando que el método no presenta problemas de aplicación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo esta incluido en el proyecto ALI94-0782 subvencionado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología y las asociaciones de industriales ASOLIVA, ANIERAC y Confederación de Cooperativas Agrarias de España. Los autores quieren expresar su agradecimiento a los laboratorios que se mencionan a continuación: Laboratorio Municipal de Higiene de Madrid, Laboratorio Agrario de Cabrils (Barcelona), Laboratorio Municipal de Barcelona, Laboratorio Agroalimentario de Córdoba, Laboratorio Agroalimentario de Atarfe (Granada), Laboratorio Central de Aduanas (Madrid), Laboratorio Arbitral del MAPA (Madrid), Laboratorio Agroalimentario de Madrid; Laboratorio Central del SENPA (Madrid), Laboratorio Agroalimentario de la Junta de Andalucía (Granada), Aceites del Sur, Koipe, Ballester, Minerva, Aceites Carbonell, Oleícola el Tejar, Aceites Toledo, Aceites Borges, Angel Camacho, Ybarra, Coosur, Agra, Migasa, Moreno, Pina Bajo-Aragón, Aceites Muela, Torres y Ribelles, Aceites Monterreal y Gaspar Peral.

BIBLIOGRAFIA

- Amelio *et al.* (1993).- "Determinación de ácidos insaturados *trans* en aceites no hidrogenados mediante cromatografía de gases en columna capilar. Resultado de una experimentación interlaboratorio".- Riv. Ital. Sostanze Grasse **70**, 561-565.
- Documento COI T20/Doc. 11/Rev. 1, (1993).- "Determinación de los hidrocarburos esteroideos en aceites vegetales".- Consejo Oleícola Internacional, Madrid, España.
- Horwitz, H. (1988).- "Protocol for the design, conduct and interpretation of collaborative studies".- Pure Appl. Chem. **60**, 855-864.
- León, M. y A. Cert. (1994).- "Recomendaciones para la aplicación de algunos métodos analíticos incluidos en el reglamento CEE 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de orujo de oliva".- Grasas y Aceites **45**, 395-401.
- Morchio, G. *et al.* (1989).- "Análisis cromatográfico de esteroides con columnas capilares. Resultados de un estudio colaborativo".- Riv. Ital. Sostanze Grasse **66**, 531-538.
- Reglamento CEE 2568/91 de la Comisión, (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* **L248**, 1-48.
- Reglamento CEE 1429/92 de la Comisión, (1992).- "Por el que se modifica el reglamento CEE 2568/91".- *Diario Oficial* **L150**, 17-20.
- Reglamento CEE 183/93 de la Comisión, (1993).- "Por el que se modifica el reglamento CEE 2568/91".- *Diario Oficial* **L22**, 58-68.
- Reglamento CE 656/95 de la Comisión (1995).- "Por el que se modifica el reglamento CEE 2568/91".- *Diario Oficial* **L69**, 1-12.

Recibido: Febrero 1995
Aceptado: Agosto 1995