



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FÍSICA Y ANALÍTICA**

TESIS DOCTORAL
**DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN
ACEITES DE OLIVA. CUANTIFICACIÓN DEL
CONTENIDO GRASO Y HUMEDAD EN
ACEITUNAS Y ORUJO**

**PRESENTADA POR:
ANDRÉS GARCÍA SÁNCHEZ**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. EVARISTO ANTONIO BALLESTEROS TRIBALDO
DRA. DÑA. NATIVIDAD RAMOS MARTOS**

JAÉN, 5 DE OCTUBRE DE 2017

ISBN 978-84-9159-328-7

**Desarrollo de Metodologías para la Determinación de Contaminantes en
Aceites de Oliva. Cuantificación del Contenido Graso y Humedad en
Aceitunas y Orujo**

Los Directores,

Fdo. : Dr. Evaristo Antonio Ballesteros Tribaldo
Catedrático de Universidad

Fdo. : Dra. Natividad Ramos Martos
Profesora Titular de Universidad

**Memoria presentada para aspirar al Grado de
Doctor por la Universidad de Jaén**

Andrés García Sánchez

Jaén, Junio de 2017

Fdo. : Andrés García Sánchez

D. **Evaristo Antonio Ballesteros Tribaldo**, Catedrático de Universidad, y D^a **Natividad Ramos Martos**, Profesor Titular de Universidad, del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén, en calidad de Directores de la Tesis Doctoral presentada por el Licenciado D. Andrés García Sánchez.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral “**Desarrollo de Metodologías para la Determinación de Contaminantes en Aceites de Oliva. Cuantificación del Contenido Graso y Humedad en Aceitunas y Orujo**” ha sido desarrollada totalmente en el laboratorio del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén y que, a su juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajo.

Y para que conste y surta efectos pertinentes, expiden el presente certificado en la ciudad de Linares a 25 de Junio de 2017.

Evaristo Antonio Ballesteros Tribaldo

Natividad Ramos Martos

Agradecimientos

En todos estos años, han sido muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo a las que quiero expresarles mi más profundo agradecimiento.

Especial mención, para mis Directores de Tesis, el Dr. Evaristo Ballesteros Tribaldo y la Dra. Natividad Ramos Martos, por su incondicional apoyo y dedicación, durante estos años, durante los cuales, muchos han sido los altibajos, cambios personales, laborales y circunstanciales, y sin ellos y su apoyo no hubiera sido posible llevar a buen puerto este trabajo.

Gracias al Departamento de Química Física y Analítica por ofrecerme la posibilidad de la realización de esta Tesis Doctoral. Igualmente, a todos los compañeros del Departamento que algún momento me han ayudado al desarrollo de los trabajos de investigación que se incluyen en esta Memoria.

A mi Madre, que siempre me ha apoyado, en toda mi trayectoria académica y profesional, entendiendo mis ausencias y mis malos momentos.

A mi Hijo, que en estos últimos años, está siendo el motor y la gasolina que me empuja a conseguir los objetivos, y que siempre entiende mi trabajo y por ello le estoy enormemente agradecido.

Y como no, a mi compañera, que siempre está ahí, que nunca desfallece, y que le quedan fuerzas para animarme a superar todas las dificultades, que nos cuida y que no se olvida recordarme que yo puedo conseguirlo. Como no, si este trabajo tuviera que tener un nombre a quien brindarlo sería el tuyo sin lugar a dudas, Loli.

A todas las personas que se me han olvidado citar y que me han ayudado durante todos estos años.

Gracias.



ÍNDICE



RESUMEN	2
SUMMARY	4
OBJETO DEL TRABAJO	6
I. INTRODUCCIÓN	8
I.I. EL OLIVO, LA ACEITUNA Y EL ACEITE	10
<i>I.I. 1 El Olivo</i>	10
<i>I.I.2 La Aceituna</i>	19
<i>I.I.2.1 Aceituna de mesa</i>	19
<i>I.I.2.2 Aceituna de producción de aceite</i>	20
<i>I.I.3 El Aceite de oliva</i>	23
<i>I.I.3.1 Composición</i>	23
<i>I.I.3.2 Alteraciones de los aceites de oliva</i>	25
<i>I.I.3.3 Proceso de elaboración del aceite de oliva virgen</i>	25
<i>I.I.3.4 Extracción del aceite de orujo de oliva</i>	32
<i>I.I.3.5. Proceso de refinación de aceites</i>	36
<i>I.I.3.6. El envasado</i>	39
I.II. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ACEITE DE OLIVA	42
<i>I.II.1. Parámetros de calidad</i>	42
<i>I.II.2. Aspectos nutricionales: el aceite de oliva y la salud</i>	48
<i>I.II.2.1. Efectos del aceite de oliva.</i>	48
<i>I.II.2.2. Aceite de oliva y arteriosclerosis</i>	50
<i>I.II.2.3. Aceite de oliva y frituras</i>	51
I.III. RESIDUOS EN ACEITE DE OLIVA	53
<i>I.III.1. Introducción</i>	53
<i>I.III.2. Plaguicidas</i>	65
<i>I.III.2.1 Clasificación química de los plaguicidas.</i>	66
<i>I.III.3 Hidrocarburos policíclicos aromáticos</i>	72
<i>I.III.2.1. Origen de los hidrocarburos policíclicos aromáticos</i>	72
<i>I.III.2.2. Toxicidad de los hidrocarburos policíclicos aromáticos</i>	73
I.IV. ASPECTOS LEGALES. REGLAMENTACIÓN	76
I.V. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ACEITE DE OLIVA	77

I.V.1. Criterios de Calidad	77
I.V.2. Criterios de Pureza	78
I.V.2.1 Basados en los componentes de la fracción insaponificable	78
I.V.2.2 Basados en componentes de la fracción saponificable	78
I.V.3. Aspectos legales del aceite de oliva	83
I.V.4. Aspectos legales sobre contaminantes y residuos	88
I.V.5. Otros aspectos legales de interés alimentario	91
I.V.5.1. Normas de higiene de los alimentos/manipulación/control oficial	91
I.V.5.2 Envasado	94
I.V.5.3. Etiquetado	94
I.V.5.4. Material en contacto con los alimentos	97
I.V.5.5. Establecimientos alimentarios / registro sanitario	99
I.V.5.6. Aditivos	99
I.VI. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN ALIMENTOS	103
I.VII. BIBLIOGRAFÍA	107
II. TÉCNICAS INSTRUMENTALES EMPLEADAS EN LA MEMORIA	112
II.I. Técnicas extractivas	114
II.I.1 Extracción líquido-líquido	115
II.I.2 Extracción líquida presurizada	116
II.I.3 Extracción asistida por microondas	117
II.I.4 Extracción por fluidos supercríticos	118
II.I.5 Extracción acelerada con disolventes	119
II.I.6 Extracción en fase sólida	120
II.I.7 Extracción asistida por ultrasonidos	123
II.I.8 Microextracción en fase sólida	124
II.I.9 Cromatografía en geles permeables	126
II.I.10 Extracción Soxhlet	127
II.II. Técnicas espectroscópicas	128
II.II.1.1 Interacción de la radiación con la materia	131
II.II.1.2 Espectros de absorción (espectroscopia UV-visible)	132
II.II.1.3 Instrumentación	132
II.II.1.4 Medida de la absorción	136
II.II.1.5 Espectros de absorción	138
II.II.2 Infrarrojo Cercano (NIR)	139
II.II.2.1 Fundamentos	139
II.II.2.2 Métodos quimiométricos	143
II.II.3 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	146
II.II.3.1 El espectrómetro de resonancia magnética nuclear	149
II.II.3.2 Resonancia magnética nuclear ¹ H	150
II.II.3.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear ¹³ C	152
II.II.3.4 Aplicaciones de la RMN en la industria oleícola	153

II.III. MÉTODOS BASADOS EN LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA	159
II.III.1 Cromatografía de gases	159
II.III.1.1 Columna Cromatográfica	160
II.III.1.2 Control de la temperatura en la columna	161
II.III.1.3 Detectores	162
II.III.2 Cromatografía líquida en columna	170
II.III.3.1 Fase inversa	170
II.III.3.2 Intercambio iónico	170
II.III.3.3 Pares iónicos	171
II.III.3.4 Exclusión molecular	172
II.III.3.5 Detectores	172
II.III.3 Espectrometría de masas	181
II.III.3.1 Método de introducción de muestras	181
II.III.3.2 Fuente de ionización	181
II.III.3.3 Analizador de iones	182
II.III.3.4 Detectores	186
II.III.4 Acoplamiento de Técnicas Cromatográficas-Espectrometría de masas	188
II.III.4.1 Cromatografía de gases – espectrometría de masas	188
II.III.4.2 Acoplamiento de la cromatografía líquida en columna con la espectrometría de masas	189
II.III.4.3 Espectrometría de masas en tándem	193
II.IV. BIBLIOGRAFÍA	196
III. ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTAS TÉCNICAS ANALÍTICAS (ESPECTROSCOPIA DE NIR Y RMN Y EXTRACCIÓN MEDIANTE SOXHLET) PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTENIDO GRASO Y DE HUMEDAD EN ACEITUNAS Y ORUJO	208
IV. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS E HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN ACEITES DE OLIVA Y DE ORUJO	222
V. CONCLUSIONES	246
VI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA INVESTIGACIÓN	252

RESUMEN

Durante miles de años se ha cultivado el olivo en los países de las riberas del mar Mediterráneo, y ha representado un importante papel en la alimentación, en la cultura y en la economía de sus gentes. La producción mundial de aceite de oliva es del orden de dos millones de toneladas anuales, representando solo un 4 % de la producción mundial de aceites vegetales y un 2.5 % del total mundial de aceites y grasas comestibles. Para poder competir con estas cifras es necesario que las industrias oleícolas apuesten por un aceite de calidad, tanto desde el punto de vista de su origen en el cultivo del olivo que evite el tratamiento con sustancias que pueden ser residuos tóxicos en el aceite, como desde el punto de vista del producto usando mecanismos de producción que no incorporen residuos tóxicos en el alimento final. Por otro lado, el contenido total de grasa es el parámetro fundamental para cuantificar la calidad de una aceituna. Junto a esta cuantificación, el agua de vegetación del fruto del olivo afecta a distintas variables de regulación del sistema de elaboración y sobre todo a los denominados de dos fases y que están relacionadas con el rendimiento industrial.

En esta Memoria se ha desarrollado una metodología de análisis basada en la simplificación y automatización de los procedimientos para la determinación de constituyentes mayoritarios y residuos de plaguicidas hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos derivados del olivo.

Por una parte, se presentan las ventajas de las metodologías basadas en el uso de técnicas espectroscópicas de infrarrojo cercano (NIR) y de resonancia magnética nuclear (RMN) sobre los Métodos de Referencia para la determinación de humedad y contenido graso en aceitunas y orujo. Para el análisis mediante espectroscopia NIR las muestras se depositan en las cubetas destinadas a tal fin. El equipo posee una lámpara de wolframio que nos permite trabajar en el rango de longitudes de onda de entre 850 a 1050 nm en la zona visible, en modo transmitancia. Para la calibración del NIR se han llevado a cabo 2000 muestras de aceites de diferentes zonas de España, en el caso de orujos se han usado 700 muestras. El análisis mediante espectroscopia RMN se llevó a cabo mediante un equipo que proporciona un campo magnético de 0,237 Tesla, una frecuencia de 10 MHz para el trabajo en ^1H y a una temperatura de trabajo de $40 \pm 0,3$ °C, para el análisis las muestras deben ser secadas por convección de aire a 103 °C durante un tiempo de 10 a 12 horas. Del estudio

estadístico mediante el cual se han comparado las tres técnicas se concluye que conllevan a los mismos resultados. Las ventajas que presentan ambos métodos (NIR y RMN) con respecto al Oficial (reducción de la manipulación de la muestra, reducción del consumo de reactivos y disolventes, y disminución del tiempo de análisis) hace que se puedan proponer como métodos normalizados de un laboratorio para la determinación de ambos parámetros en aceitunas y orujo.

Por otra parte, se ha desarrollado un método para la determinación de plaguicidas en aceites de oliva y aceite de orujo basado en el pretratamiento de la muestra por cromatografía en geles permeables y en la determinación por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas en tándem. El método propuesto proporciona una respuesta lineal en el intervalo comprendido entre 1 y 500 $\mu\text{g/Kg}$, con límites de detección entre 0,1 y 1,6 $\mu\text{g/Kg}$. La precisión fue estudiada, obteniéndose unos resultados de desviación estándar relativa (RSD) entre 4,93 y 8,11 %. Los porcentajes de recuperación conseguidos con el método eran superiores del 84 %. El método fue aplicado para la determinación de 26 plaguicidas en muestras de diferentes tipos de aceite de oliva.

Finalmente, se ha puesto a punto un método multiresiduo para la determinación simultánea de plaguicidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos en diversos tipos de aceites de oliva y en aceite de orujo. El método consta de una etapa de preparación de muestra (extracción líquido-líquido y purificación del extracto por cromatografía en geles permeables) y de otra de cuantificación de los contaminantes mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Las características analíticas del método son: a) es lineal en los intervalos de 1–500 $\mu\text{g/Kg}$ para plaguicidas y de 0,3–200 $\mu\text{g/Kg}$ para PAHs; b) los límites de detección encontrados se encuentran entre 0,1 y 1,7 $\mu\text{g/Kg}$ (plaguicidas) y entre 0,05 y 0,07 $\mu\text{g/Kg}$ (PAHs); c) la precisión encontrada, expresada como desviación estándar relativa (RSD) estaba comprendida entre 3,40 y 8,61 %; d) los porcentajes de recuperación conseguidos se encontraban entre 84 y 110 %. La metodología desarrollada se aplicó para el análisis de 15 muestras de aceite de oliva y 10 muestras de aceite de orujo.

SUMMARY

Olives, which have been cultivated in the Mediterranean region for thousands of years, play a major role in the diet, culture and economy of its population. The global production of olive oil is about 2000 t/year, and accounts for only 4 % of vegetable oil production, and for 2.5 % of fat and edible oil production. In order to be more competitive, the olive oil industry should strive to obtain high-quality oil from the start by avoiding the use of potentially toxic substances and production processes leaving toxic residues in the end-product. Quality in olive oil is assessed basically from total fat content. However, the water content of olives is also influential and affects some variables of the processing system (especially the “two-phase system”) and industrial performance).

In this doctoral work, a simplified analytical method by which the steps involved in the determination of major constituents, and pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs), in olive-derived products was developed. The proposed method uses near infrared (NIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy instead of existing reference procedures for quantifying moisture and fat in olives and olive pomace. Samples for NIR analysis were placed in cells and irradiated with light spanning the wavelength range 850–1050 nm from a wolfram lamp to record spectra in the transmittance mode. The NIR spectrophotometer was calibrated by using 2000 olive oil samples from different locations in Spain in addition to 700 pomace oil samples. For $^1\text{H-NMR}$ analysis, the spectrometer was operated at a magnetic field of 0.237 Tesla, a frequency of 10 MHz and a temperature of 40 ± 0.3 °C, using a convective air stream at 103 °C for 10–12 hr. Based on their statistics, the previous techniques gave essentially identical results. Both NIR and NMR spectroscopy have some advantages over the reference methods including reduced sample handling, also reduced use of solvents and reagents, and shorter analysis times. Therefore, they are effective choices for quantifying moisture and fat in olives and pomace, and could be turned into useful standardized methodologies for this purpose.

A method for determining pesticides in olive and pomace oils involving sample preparation by gel permeation chromatography and determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry was also developed. The proposed method provided a linear response over the pesticide concentration range 1–500 $\mu\text{g/Kg}$ and limits of detection from 0.1 to 1.6 $\mu\text{g/Kg}$. Its precision, as relative standard deviation (RSD), was 4.93–8.11 % and

recoveries exceeded 84 % for all pesticides. The method was successfully applied to the determination of 26 pesticides in olive oils.

Finally, a multiresidue method for the simultaneous determination of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and pomace oils was developed and optimized. The method pretreats samples by liquid–liquid extraction and purifies extracts by gel permeation chromatography prior to quantifying the analytes by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Based on the results, it provided a linear response over the concentration range 1–500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ for pesticides and 0.3–200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ for PAHs, with limits of detection of 0.1–1.7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ for the former type of analyte and 0.05–0.07 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ for the latter. Its precision, as relative standard deviation (RSD), was 3.40–8.61 % and recoveries ranged from 84 to 110 %. The method was successfully used to analyse 15 olive oil samples and 10 pomace oil samples.

OBJETO DEL TRABAJO

En el campo del análisis de alimentos existe una necesidad continua centrada en el desarrollo de metodologías que proporcionen una elevada selectividad y sensibilidad, todo ello sin detrimento de simplificar, automatizar y miniaturizar los procedimientos. Estas necesidades se hacen todavía más importantes cuando se trata de la determinación de especies contaminantes a niveles de trazas en matrices complejas como son las de los alimentos. En la presente Memoria se pretenden desarrollar una metodología para la determinación de plaguicidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en aceites de oliva y por otro lado la comparación de varios procedimientos para la cuantificación de contenido graso y humedad en aceitunas y orujo, para la selección del más rápido, selectivo y sensible.

Los objetivos específicos que se han marcado son:

- a) Desarrollo y puesta a punto de metodologías basadas en el uso de las técnicas de espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR) y de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) para la determinación de contenido graso y humedad en muestras de aceitunas y orujos
- b) Comparación del método propuesto para la determinación de humedad y contenido graso frente al Método Oficial (Sohxlet) para comprobar su validez y ventajas.
- c) Desarrollo de una metodología para la determinación de plaguicidas en aceites de oliva y de orujo basada en el uso de una etapa de preparación de muestra (extracción líquido-líquido y purificación mediante cromatografía en geles permeables) y otra de cuantificación de los analitos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
- d) Desarrollo de un método analítico multiresiduo para la determinación de plaguicidas y PAHs basado en el empleo de las técnicas de cromatografía en geles permeables para la purificación de los extractos de las muestras y de cromatografía de gases acoplada en tándem a espectrometría de masas para la cuantificación de estos contaminantes a niveles de traza. Para ello se optimizarán todas las variables que

afecten tanto a la etapa de purificación de los extractos de las muestras como a la etapa de determinación de los contaminantes.

- e) Aplicación de las metodologías desarrolladas para la determinación de multirresiduos en diferentes tipos de aceite de oliva (virgen, refinado) y de aceite de orujo.



I. INTRODUCCIÓN



I.I. El olivo, la aceituna y el aceite

I.I. 1 El Olivo

El origen del olivo se pierde en la noche de los tiempos, coincidiendo y confundándose su expansión con las civilizaciones que se han desarrollado en la Cuenca del Mediterráneo y que, durante largos períodos de tiempo, han regido los destinos de la humanidad y han dejado su impronta en la cultura occidental. Se han encontrado fósiles de hojas de oliva en los yacimientos pliocénicos de Mongardino (Italia); restos fosilizados en estratos del Paleolítico Superior, en el criadero de caracoles de Relillai, en el norte de Africa; trozos de acebuche y huesos en excavaciones del Eneolítico y la Edad de Bronce, en España. La existencia de esta especie, por todo ello, data del XII milenio, a.C. (Civantos, 1998).

El origen del olivo silvestre se sitúa en Asia Menor, donde es abundantísimo, formando verdaderos bosques. Parece haberse extendido desde Siria hacia Grecia, a través de Anatolia (Civantos, 1998), aunque otras hipótesis lo sitúan en el Bajo Egipto, en Nubia, en Etiopía, en las montañas del Atlas o en determinadas regiones de Europa. Por ello, se considera indígena de toda la Cuenca Mediterránea y ubica el origen del olivo cultivado en Asia Menor, hace unos seis milenios. De los pueblos antiguos de la zona, únicamente los asirios y los babilonios no lo conocían. El olivo, que se había introducido en España durante la dominación marítima de los fenicios (1050 a.C.), no alcanzó notable desarrollo hasta la llegada de Escisión (212 a.C.) y la dominación de Roma (45 a.C.). Después de la tercera guerra púnica, el olivar ocupaba una importante extensión en la Bética y se expandió hacia el centro y el litoral mediterráneo de la Península Ibérica. Los árabes introdujeron sus variedades en el sur de España e influyeron en la difusión del cultivo hasta el punto de que los vocablos castellanos de aceituna, aceite o acebuche, tienen raíz árabe (Civantos, 1998).

El cultivo del olivo salta fuera de la cuenca mediterránea con el descubrimiento de América (1492). Desde Sevilla pasan los primeros olivos a las Antillas y después al continente. En 1.560 hay olivares en producción en México, después en Perú, California, Chile o Argentina, donde todavía vive una de las plantas llevadas en la conquista, el viejo

olivo de Arauco (Civantos, 1998).

El olivo cultivado es propio del clima templado-cálido característico de la Cuenca del Mediterráneo, de la que es especie autóctona y en la que está prioritariamente asentado en la actualidad. En el hemisferio norte, la zona por la que se disemina, está delimitada entre las latitudes 30° y 45°, y aunque fuera de ella el olivo puede vegetar bien, la fructificación se malogra por exceso o falta de temperatura en la estación fría. En el hemisferio austral, la mayor parte de las plantaciones corresponde a latitudes similares. El olivo puede admitir unas temperaturas límites inferiores de hasta 8 ó 10 °C bajo cero; incluso soporta temperaturas menores, siempre que no se prolonguen durante muchas horas, que el deshielo se verifique con lentitud y que el árbol no se encuentre en vegetación activa. Este árbol, en vegetación es sensible a temperaturas menos bajas, que pueden ocasionar importantes daños en ramillos y ramas secundarias, incluso en el tronco y en ramas principales. La resistencia al frío es un carácter varietal. Para una buena fructificación, ha de estar expuesto durante el invierno a temperaturas próximas a cero grados, que induzcan al reposo vegetativo. El olivo soporta bien las altas temperaturas estivales aun con falta de humedad en el suelo, aunque ajusta su actividad vegetativa a un mínimo vital. En el área geográfica del olivo se aprecia una relación inversa entre latitud y altitud. En España hay olivares en cotas de 250 m en la Rioja, de 700 m en Castilla-La Mancha, de 1.200 en Jaén y Granada. En Marruecos, el olivo alcanza en el Atlas los 1.600-1.700 m. de altitud y llega a los 2.000 m en Argentina.

La pluviometría de la región del olivo se caracteriza por la escasez en muchos puntos, por la irregularidad en la distribución en numerosos años y sobre todo, por la casi ausencia de precipitaciones en el verano, con la excepción de lluvias tormentosas, intensas, que son poco aprovechadas porque producen una fuerte escorrentía. En Sfax, Túnez, en ciertas zonas olivareras la lluvia media anual es de 180 l/m², que en años secos es casi nula. En Marrakech (Marruecos) la precipitación media anual es del orden de 230 l/m², y allí prácticamente el olivo productivo sólo está en condiciones de riego. En el extremo opuesto, en regiones de Italia o de los países Balcánicos, las lluvias medias pueden alcanzar los 900 l/m² anuales. La naturaleza del suelo y del subsuelo, así como la topografía, influyen especialmente en la adaptación del olivo a un determinado régimen hídrico. El olivo es poco exigente en suelos para su desarrollo, pudiendo encontrarse tanto en los silíceos como en los

calizos. Los terrenos muy arcillosos pesados, suponen una limitación, así como los que contiene gran cantidad de humedad durante períodos largos. La distribución del olivo por países se resume en la Tabla I.1 (Civantos, 1998).

Tabla I.1. Distribución de la superficie dedicada al cultivo del olivar

Países	Superficie Olivar (Ha)
Argelia	195.530
Angola	400
Egipto	25.200
Libia	100.000
Marruecos	412.000
Túnez	1.538.000
Rep. Africa del Sur	1.345
Argentina	28.670
Brasil	840
Chile	2.955
Estados Unidos	12.150
México	6.000
Perú	5.605
Uruguay	890
China	19.230
Chipre	7.500
Irak	10.000
Irán	5.355
Israel	17.300
Jordania	16.360
Líbano	32.000
Siria	405.000
Turquía	877.700
Palestina	95.000
Albania	45.000
España	2.127.000
Francia	20.000
Grecia	690.800
Italia	1.141.350

Malta	200
Portugal	316.000
Antigua Yugoslavia	29.960
Australia	2.000
Cuenca del Mediterráneo	7.955.340
Total mundial	8.187.300

El olivo pertenece al orden botánico de las *Ligustales*, familia de las *Oleáceas*, que comprende a géneros tan extendidos como *Jasminum* (jazmín), *Phillyrea*, *Ligustrum* (aligustre), *Syringa* (lilo), *Fraxinus* (fresno), y *Olea* (olivo).

En el género *Olea* se describen 30 especies diferentes, repartidas por todo el mundo, todas ellas con el mismo número de cromosomas ($2n=46$), entre las que se cuenta el *Olea europea* L con dos subespecies: *oleaster* (acebuche) y *sativa* (olivo). Se han aportado nuevos elementos de sistemática geográfica atribuyendo a *Olea europea* L, las siguientes subespecies y variedades (Civantos, 1998):

- Subespecie Euro-mediterránea: Serie *sativa* (*O.sativa*) Serie *oleaster* (*O. Oleaster*) poseen drupas gruesas, oleosas y carnosas e inflorescencia en racimo compuesto.
- Subespecie Laperrini: situada desde el Atlántico marroquí hasta la Cirrenaica, con drupas pequeñas, poco oleosas y sin aprovechamiento en alimentación humana.
- Subespecie Cuspidata: planta espontánea en el Himalaya y en otras regiones asiáticas, con drupas pequeñas, poco oleosas, sin utilización práctica.

En la Tabla I.2, se citan algunos de los cultivos de olivar de más importancia en los diferentes países oleícolas (Civantos, 1998).

Tabla I.2. Variedad de cultivos en los países oleícolas

PAIS	CULTIVAR	UTILIZACIÓN
Argelia	Chemial	Aceite
	Azeradj	Aceite/Mesa
	Sigoise	Mesa
Argentina	Arauco	Aceite/Mesa
	Arbequina	Aceite
España	Picual	Aceite
	Hojiblanca	Aceite/Mesa
	Cornicabra	Aceite
	Lechín	Aceite
	Manzanilla	Mesa(verde)
	Verdial de Badajoz	Aceite
	Empeltre	Aceite
	Arbequina	Aceite
	Cacereña	Aceite/Mesa(negra)
Estados Unidos	Manzanilla	Mesa
	Mission	Mesa
Francia	Picholine	Mesa (verde)
	Tanche	Mesa (negra)
	Aglandeau	Aceite
Grecia	Koroneiki	Aceite
	Conservolia	Mesa
	Kalamata	Mesa (negra)
	Mastoidis	Aceite
Israel	Souri	Aceite
	Manzanilla	Mesa (verde)
Italia	Frantoio	Aceite
	Moraiolo	Aceite
	Leccino	Aceite
	Coratina	Aceite
	Carolea	Aceite/Mesa
	Noccellara del Belice	Mesa (verde)
	Itrana	Mesa (negra)
	Ascolana tenera	Mesa(verde)
Líbano	Soury	Aceite/Mesa
Marruecos	Picholine marroquí	Aceite/Mesa
Portugal	Galega	Aceite/mesa (negra)
	Carrasquenha	Aceite/Mesa (verde)
	Redondil	Aceite/Mesa (verde)
Siria	Al-Zeity	Aceite
	Al-Sorani	Aceite
	Al-Doebly	Aceite/Mesa
Túnez	Chemlali	Aceite
	Chetoui	Aceite
	Meski	Aceite/Mesa
Turquía	Ayvalik	Aceite
	Cakir	Aceite
	Gemlik	Mesa (negra)
	Memecik	Mesa(negra)
	Domat	Mesa
Antigua Yugoslavia	Oblica	Aceite/Mesa
	Zutica	Aceite/Mesa

Las técnicas de cultivo han de contribuir fundamentalmente a la consecución de aceitunas sanas y bien desarrolladas que serán la mejor garantía para la obtención de un aceite de calidad. La nueva olivicultura intensiva ha de tener presente, que además de producir cantidad es necesario producir calidad, sin que ambos objetivos tengan que ser incompatibles. Para ello, la distribución de las plantas en el terreno y la forma de los árboles han de permitir una perfecta iluminación de superficies productivas de las mismas a fin de que los frutos alcancen un buen desarrollo y una madurez adecuada (Humanes y Civantos, 1993).

La protección fitosanitaria del árbol es sin duda la técnica de cultivo más influyente en la obtención de aceites de calidad. Para alcanzar esta calidad es absolutamente necesario que los frutos se conserven sanos y que permanezcan en el árbol hasta el momento de la recolección. Las plagas y enfermedades que atacan al olivo se pueden clasificar en dos grupos según los daños que causan: aquéllos que ocasionan la caída de las aceitunas antes del momento de la recogida y aquéllos que provocan en los aceites características sensoriales defectuosas, cuyo prototipo es el *Gloeosporium olivarum*, siendo de todas ellas la más importante la mosca del olivo, al favorecer el desarrollo de hongos y microorganismos que alteran gravemente la calidad de los aceites, originando un aumento del grado de acidez y el deterioro de las características organolépticas (Humanes et al., 1993).

En los productos a utilizar en la lucha contra las plagas y enfermedades, hay que considerar los principios de una lucha dirigida, como preámbulo a la lucha integrada, para lo que es preciso utilizarlos en el momento oportuno, con dosis adecuadas y respetando los plazos de seguridad que deben de tomarse entre la aplicación y la recolección para que no lleguen residuos nocivos a los consumidores (Civantos et al., 2008).

Algunas plagas y enfermedades solamente producen depresión vegetativa en el árbol, afectando a la producción en los casos extremos en que se comprometa el estado de maduración; entre éstos se encuentran:

- *Parlatoria oleae* COLVEE, que produce ataques en las ramas, con depresión vegetativa. Puede ocasionar daños en los frutos con pérdidas del 20 % del aceite.

- *Aspidotes nerii* BOUCHE. Cuando la cochinilla se fija en los frutos afecta a la calidad de la producción; las aceitunas quedan pequeñas e incluso deformes en caso de fuertes ingestaciones. En ataques tardíos, a partir de más de 10 insectos por fruto, las pérdidas pueden ser considerables, como ha descrito (Civantos et al., 2008) en los cultivos griegos Koroneiki y Tsounati. La disminución del peso en aceite va acompañada de alteración en los caracteres organolépticos.
- *Lepidosaphes ulmi* LINNEO (serpeta), que deseca ramas y ramones.
- *Saissetia oleae* OLIVER, que unido a *Capnodium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, etc., producen el complejo denominado “fumagina” que igualmente ocasiona la depresión del árbol. Los frutos situados en las zonas interiores más afectadas, maduran con dificultad y suponen una merma para la calidad del aceite.

Otras fisiopatías ocasionan caídas del fruto antes de que reúna condiciones adecuadas para ser sometido al proceso de extracción y los daños quedan en una disminución de la cosecha, pero no afectan directamente al aceite.

Un tercer grupo de plagas y enfermedades lo forman aquellas que atacan al fruto en la madurez o una vez alcanzada ésta y por tanto afectan a la calidad del aceite. A su vez lo podemos clasificar en los siguientes apartados:

- Agentes fitopatológicos que producen la caída de la aceituna madura o en estadios próximos a la madurez: Insectos escolíticos, principalmente *Phloeotribus scarabeoides* Bern; *Cycloconium oleaginum* CAST; *Macrophoma dalmatita* THUM. Los frutos caen a tierra y se ven sometidos a un conjunto de acciones que, de actuar de forma prolongada, alteran gravemente la calidad de los aceites.
- Agentes fitopatológicos que modifican la pulpa de la aceituna: *Gloeosporium olivarum* ALM; *Pseudomonas savastanoi* STEVENS. En muchos casos los frutos quedan en el árbol pero con disminución de la calidad del aceite. Los aceites extraídos de frutos atacados por

Gloeosporium son de color rojizo, con mal sabor y elevada acidez, a la vez que disminuye la producción (40 a 50 % en 35-40 días de ataque continuado).

- Agentes fitopatológicos que producen heridas y galerías en las aceitunas: *Prolasioptera erlessiana* PAOLI; *Dacus Oleae* GMEL. El primero de escasa importancia, produce la caída anticipada de los frutos y favorece el desarrollo del *Macrophoma* en las galerías. La larva de *Dacus* abre una galería en el interior de las aceitunas para alimentarse de la pulpa, ocasionando pérdidas que en algún caso se han valorado en 100-150 mg por galería, que reviste importancia en frutos pequeños y sobre todo en fuertes ataques del insecto. El recorrido de la larva afecta a vasos de nutrición de la aceituna que se traduce en trastornos en la maduración y en la caída al suelo. La galería que comunica con el exterior por el orificio de salida, favorece la entrada de hongos y bacterias que se desarrollan sobre la pulpa de la aceituna, en buenas condiciones de humedad, temperatura y principios nutritivos. Los hongos encontrados con más frecuencia en aceitunas atacadas por *Dacus*, con orificio de salida, son de los géneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium*, Levaduras varias, *Cladosporium*, *Nigrospora*, etc.

La hidrólisis de los ácidos grasos inducida por estos agentes, se manifiesta con el aumento de la acidez de los aceites que varía enormemente según la aceituna permanezca en el árbol, caiga al suelo, se elabore inmediatamente o queden almacenadas en espera de turno para la elaboración (Civantos et al., 2008).

En la Tabla I.3, se muestran los plaguicidas susceptibles de encontrarse en las muestras a procesar con mayor incidencia. Se ha tenido en cuenta la utilización de plaguicidas más habitual, los que se han encontrado en los análisis solicitados por las distintas cooperativas y aquellos cuyo uso es el recomendado según el reglamento de la Producción Integrada del Olivar (BOJA, 2008).

Tabla I.3. Plaguicidas de mayor incidencia.

	Fitosanitarios del olivar	Fitosanitarios de mayor incidencia (hasta la fecha)	P.I.O. 2002 *
INSECTICIDAS	Carbaril	Carbaril	Carbaril
	Clorpirifos	Clorpirifos	
	Dimetoato	Dimetoato	Dimetoato (LMR = 2) ***
	Endosulfan	Endosulfan	
	Captan		
	Diazinon		Diazinon *
	Fenitrothion		Fenitrothion
	Formotion		Formotion
	Fosmet		Fosmet
	Malathion		Malathion (LMR = 3) ***
	Triclorfon		Triclorfon
	Metidación (LMR = 1) ***		
	Promecarb		
	Zineb **, Maneb **		Ditiocarbamatos (LMR = 5) ***
			Difenoconazol
		Esfenvalerato *	
		Fenoxicarb	
		Metil-pirimifos *	
		Piriproxifen	
		δ -cihalotrin	
		α -cipermetrin	
HERBICIDAS		Diuron	Diuron
	Simazina	Simazina	
		Terbutilazina	Terbutilazina
	Diquat		
	Glifosato		Glifosato/Sulfosato
	Paracuat		
			Aminotriazol
			Clortoluron
			Diflufenican
			Flazasulfuron
			Fluroxipir
			Glufosinato amónico
			MCPA (forma hidroxí) Norfluorazona Quizalofop-P-etil (sin especificar ramificación) Terbutrina Tiazopir

* P.I.O.: Producción Integrada de Olivar. ** No tienen establecidos LMR. *** (mg/Kg)

1.1.2 La Aceituna

1.1.2.1 Aceituna de mesa

La aceituna es una drupa que contiene un principio amargo, que es la oleuropeína, un bajo contenido en azúcares (2.6 a 6 %), en contraste con el resto de las drupas que alcanzan el 12 % o más, y un elevado contenido en aceite, del 12 al 30 %, según el estado de madurez y la variedad. Debido a estas características este fruto no se puede consumir tal como está en el árbol, sino que hay que someterlo a unos procesos que varían considerablemente de unas regiones a otras y que están en función, también de la variedad. Se distinguen tres tipos de aceitunas de mesa: verde, semi-maduras y maduras (Civantos, 1.998).

La *oleuropeína* propia de la aceituna ha de ser eliminada por su fuerte sabor amargo, aunque no es perjudicial para la salud. En general, los frutos se someten a tratamientos con hidróxido sódico o potásico, salmuera o sucesivos lavados con agua, según sistemas y hábitos locales.

La aptitud de las aceitunas para el uso de mesa está en función del tamaño que es importante para su presentación. Con pesos comprendidos entre 3 y 5 g., considerándose medianas, y grandes si sobrepasan los 5 g. Las aceitunas de forma más o menos esférica suelen tener mejor mercado, aunque algunas alargadas están acreditadas. El hueso debe separarse con facilidad y la relación entre los pesos de pulpa y hueso es aceptable con valores de 5 a 1, mejorando el valor comercial con el incremento de esta proporción. La epidermis de la aceituna debe ser fina pero elástica y resistente a los golpes y a la acción de los álcalis y a la salmuera. El alto contenido de azúcares en pulpa es favorable, admitiéndose una cifra del 4 % como límite inferior, sobre todo en aceitunas que se someten a fermentación. El contenido en aceite conviene que sea lo más bajo posible porque en muchos casos, perjudica a la conservación del producto y a la consistencia del fruto elaborado. Sólo en algún tipo de aceitunas negras es bueno un contenido en aceite medio o alto.

I.I.2.2 Aceituna de producción de aceite

I.I.2.2.1 Composición

El fruto del olivo es la aceituna, una drupa de tamaño variable que depende de las variedades, suelos, climatología, etc.

En la aceituna se puede distinguir un tejido superficial que sirve de envoltura, denominado epicarpio y que representa entre el (2 – 2,5) % del peso del fruto. La parte carnosa de la aceituna es el mesocarpio, al que corresponde la mayor parte del peso del fruto, entre el (70 - 80) %. En endocarpio o hueso supone entre el (15 – 23) % de la aceituna y encierra a la semilla con el embrión (2 – 4) % de peso del fruto.

Desde el punto de vista de la elaboración del aceite, la composición del fruto en el momento de la recolección es el siguiente:

• Agua de vegetación	40 - 55 %
• Aceite	18 - 32 %
• Hueso	14 - 22 %
• Almendra o semilla	1 - 3 %
• Epicarpio y resto de pulpa	8 - 10 %

La composición del análisis básico de las principales partes de la aceituna queda reflejada en la Tabla I.4. La casi totalidad del aceite está contenido en el mesocarpio, mientras el endocarpio está predominantemente formado por celulosa bruta (Civantos et al., 2008).

Tabla I.4. Composición del análisis básico de las partes de la aceituna, (% sobre materia grasa, % sobre materia seca)

Parte	Materia		Celulosa Bruta	Extracto no Nitrogenado	Materia mineral
	Nitrogenada	Materia grasa			
Epicarpio	9.8	3.4	2,4	82.8	1.6
Mesocarpio	9.6	51.8	12.0	24.2	2.3
Endocarpio	1.2	0.8	74.1	22.7	1.2

I.I.2.2.2 Proceso de maduración

Después del cuajado de las aceitunas comienza una etapa de crecimiento rápido de unos 30 o 40 días, que culmina en la formación de la semilla y endurecimiento del hueso. El peso de éste no varía prácticamente nada a partir de este momento. La pulpa aumenta de peso lentamente durante el verano, aún en condiciones de suministro de agua de riego, para acelerar su crecimiento a partir de mediados de septiembre, cuando se perciben cambios estructurales en el fruto que indican la aproximación del cambio de color o envero. El peso de las aceitunas sigue aumentando una vez que aparecen las tonalidades rojizas del epicarpio, para llegar a un peso máximo en el momento en que el árbol presenta el mayor porcentaje de frutos en envero, que viene a coincidir aproximadamente con la desaparición de los frutos verdes. A nivel individual, cada fruto llega al máximo peso en húmedo cuando alcanza la pigmentación total. A partir de entonces, los frutos son más propensos a las deshidrataciones, muchas veces a causa de las bajas temperaturas, con tendencia hacia la pérdida de peso, aunque con ligeras recuperaciones tras épocas de lluvias o de elevada humedad ambiental.

La cantidad de aceite contenido en los frutos es uno de los principales valores a tener en cuenta para fijar el momento de la recolección de aceitunas con destino a la elaboración de

aceite. El seguimiento se hace en muchas ocasiones midiendo el rendimiento de las aceitunas, entendiéndose como tal el porcentaje de aceite total respecto al peso en húmedo de los frutos. Como el peso de los frutos desciende desde el momento del ennegrecimiento, a consecuencia de las deshidrataciones, se puede llegar a pensar que un rendimiento más elevado significa mayor cantidad de aceite por olivo o por hectárea, cuando no es así. Este falso concepto lleva al retraso de la recolección en muchas ocasiones. Siendo recomendable que se utilice para estos efectos, la relación entre el contenido de aceite total y materia seca expresada en porcentaje, que orienta mejor sobre el aceite contenido en la aceituna. Existe una sencilla relación entre el parámetro propuesto y el rendimiento [siendo H, la humedad de la aceituna (%)]:

$$\frac{\text{Aceite total}}{\text{Materia seca}} (\%) = \frac{\text{Rendimiento} (\%)}{100 - H} \times 100$$

La madurez escalonada de las aceitunas se pone de manifiesto en la caída natural. Antes de la madurez se presenta caída de aceitunas sanas a causa de ajustes fisiológicos, pero generalmente carece de importancia hasta el momento en que comienzan los cambios de coloración de los frutos, que se hace más intensa cuanto más coloreados están, aunque depende mucho de la variedad. También pueden encontrarse variaciones notables de caída entre unos años y otros, según existan o no condiciones meteorológicas que fomenten la caída de los frutos maduros (Civantos et al., 2008).

Al principio de la maduración, la fuerza de resistencia al desprendimiento es muy elevada, con una caída natural escasa o nula y al avanzar el período, la fuerza decrece, también con las oscilaciones descritas en la caída natural, a la vez que el porcentaje de frutos en suelo va siendo más cuantioso. Esta fuerza va disminuyendo con el cambio de pigmentación de la aceituna: mayor en la verde, que en la coloreada y en ésta que en la negra.

I.1.3 El Aceite de oliva

I.1.3.1 Composición

En el aceite de oliva se pueden considerar dos grandes grupos de compuestos químicos, una fracción saponificable y una fracción insaponificable, compuestos que procedemos a describir con más detalle (Civantos et al., 2008):

A) Fracción saponificable: Representa entre el 98.5 y el 99.5 % del peso del aceite de oliva, estando formada por triglicéridos y algunos ácidos grasos libre. De forma general los ácidos grasos que forman los triglicéridos van a definir y caracterizar a los aceites siendo estos ácidos de diversa naturaleza:

- a. Ácidos grasos saturados.
 - i. Ácido mirístico: hasta 0.05%
 - ii. Ácido palmítico: 7 - 18 %
 - iii. Ácido esteárico: 0.5 - 5 %
 - iv. Ácido araquídico: hasta 0.5 %

- b. Ácidos grasos monoinsaturados.
 - i. Ácido palmitoleico: 0.3 – 3 %
 - ii. Ácido oleico: 61 - 83 %

- c. Ácidos grasos poliinsaturados:
 - i. Ácido linoleico: 2 - 18 %
 - ii. Ácido linolénico: hasta 1.5 %

Los ácidos grasos se presentan en estado líquido a una temperatura que depende de la longitud de la cadena de carbonos; a más longitud más elevado es el punto de fusión. También depende del número de enlaces dobles; a mayor número de estos enlaces dobles

más baja será la temperatura de fusión.

Los dobles enlaces son puntos vulnerables de los aceites, por ser susceptibles a las oxidaciones ante el oxígeno del aire, o a nivel celular por la presencia del oxígeno de respiración. La oxidación da lugar a compuestos tales como alcoholes, aldehidos, cetonas, etc., que producen mal olor y sabor y son causas del enranciamiento. Puesto que los ácidos grasos poliinsaturados son muy sensibles a la oxidación, tanto el contenido de ácidos grasos como los porcentajes de oleico y linoleico y de su relación entre ambos, caracterizarán la estabilidad oxidativa de los aceites.

- B) Fracción insaponificable: Supone entre el 1.5 y el 0.5 % del peso del aceite de oliva, siendo esta fracción responsable de la gran cantidad de componentes menores del aceite de oliva y con una influencia crucial en la calidad de los aceites de oliva, entre los que destacamos:
- a. *Hidrocarburos*: terpenos, fundamentalmente el escualeno. Carotenos, que comunican la coloración amarillenta de los aceites.
 - b. *Pigmentos no terpénicos*: entre los que destaca la clorofila; responsable de la coloración verdosa.
 - c. *Tocoferoles*: fundamentalmente el alfa-tocoferol con gran carácter antioxidante.
 - d. *Esteroles*: son alcoholes superiores monovalentes, entre los que predomina el beta sitosterol.
 - e. *Polifenoles*: antioxidantes e influyen en las características organolépticas de los aceites. Son función de la variedad, grado de maduración y elaboración. En los procesos de refinación se pierden una cantidad importante de ellos.
 - f. *Productos volátiles*: responsables de los aromas de los aceites y forman alcoholes, cetonas ésteres y derivados furánicos.

El equilibrio entre las fracciones saponificable e insaponificable del aceite de oliva virgen, es digno de destacar y tiene una gran influencia en las cualidades beneficiosas de éste, junto con el predominio de triglicéridos con ácido oleico, muy estable antes oxidaciones,

completado con una baja proporción de poliinsaturados, suficiente para el aporte de ácidos grasos esenciales, junto con la protección del tocoferol y los polifenoles, le hacen muy beneficioso para la salud al aceite de oliva virgen.

Los componentes volátiles son causas de aroma y los polifenoles de sabor. Un alto contenido en ácido oleico es favorable en el comportamiento del aceite de oliva ante la salud, tanto en su uso en crudo como en frituras, siendo mucho más estable que los demás aceites vegetales, ricos en poliinsaturados, ante las elevadas temperaturas que se alcanzan y que potencian la oxidación y alteración de los aceites.

1.1.3.2 Alteraciones de los aceites de oliva

Las alteraciones del aceite de oliva tienen como causas principales (Civantos et al., 2008):

- Fermentaciones que dan lugar a enzimas lipolíticas que producen procesos de hidrólisis sobre los triglicéridos, provocando subidas de acidez, sabores y olores anómalos.
- Procesos oxidativos, potenciados por la presencia de la luz, el aire y el calor y las trazas metálicas. Dicha oxidación provoca el fenómeno de la rancidez.
- Pérdidas de sustancias volátiles causantes de aromas, como consecuencia de aireación excesiva y calentamientos de masas anormalmente altos.

1.1.3.3 Proceso de elaboración del aceite de oliva virgen

El aceite de oliva virgen es el obtenido de la aceituna, exclusivamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite. Tal y como puede apreciarse en la Figura I.1, no

debe tener más tratamiento que el lavado del fruto, la molienda, la preparación de la pasta, la separación de fases sólidas y líquidas, la decantación y/o centrifugación, y el filtrado. El aceite de oliva virgen, es, por tanto, el zumo oleoso de un fruto: la aceituna; prácticamente el único aceite que puede consumirse como sale del fruto. Con una buena elaboración se mantiene sin alteración del sabor, de los aromas y de las vitaminas que el aceite contenía en la aceituna.

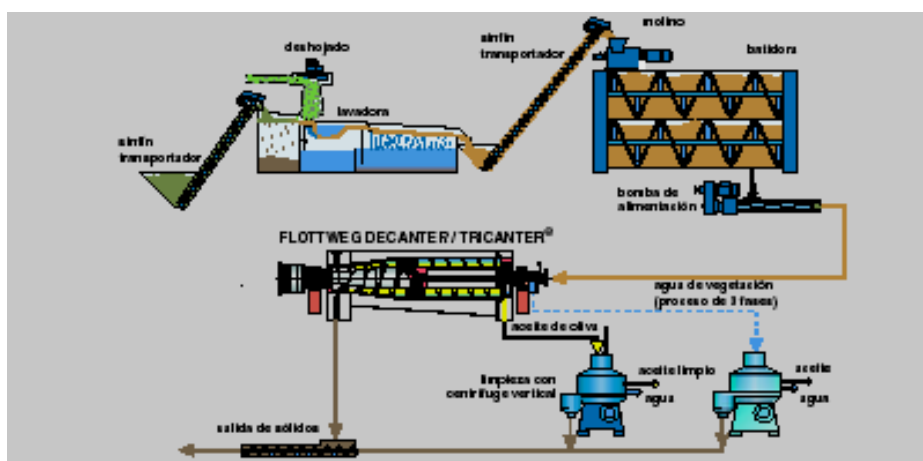


Fig. I.1. Esquema general del proceso de elaboración de Aceite de Oliva Virgen.

Para obtener un aceite de calidad se debe partir de unas aceitunas enteras, sanas y maduras. De ahí la importancia que tiene el cultivo, no sólo para obtener cantidad, sino para preparar en condiciones óptimas un fruto del que se pueda extraer un buen aceite. Ahora bien, el trato que la aceituna reciba en la industria va a determinar también la calidad, pues si no se actúa correctamente en todas las fases de la elaboración, la buena calidad potencial encerrada en la aceituna se puede perjudicar.

I.I.3.3.1 Entrada en la almazara

A su entrada en la almazara los frutos deben ser clasificados en función de la variedad, de su procedencia del árbol o del suelo, de que estén sanos o presenten ataques de patógenos, especialmente de la mosca del olivo, a fin de ser elaborados separadamente los de cada clase. Las aceitunas deberán entrar limpias. De no ser así, se pueden instalar en la propia almazara

equipos de limpieza y lavado para emplearlos en aquellas partidas que lo requieran.

Se obtienen aceites de calidad cuando las aceitunas se trituran lo más rápidamente posible, pues el almacenamiento (atrojado) desencadena procesos fermentativos sobre el fruto; por lo que el aceite contenido eleva la acidez y toma malos sabores y olores que lo perjudican.

I.I.3.3.2 Molienda y preparación de la pasta

En los tiempos más remotos el triturado se hacía a mano en recipientes de piedra de forma esférica o cónica. Para mejorar los rendimientos se aumentó el tamaño del recipiente o solera y se colocó sobre ésta unas muelas giratorias de piedra accionadas por fuerza animal. La forma de las piedras ha ido variando, desde cilíndricas hasta troncocónicas, dotadas de doble giro, alrededor del eje vertical de la solera y del eje del cono mejorando de esta forma las condiciones de la pasta resultante. Unas paletas remueven y sacan la pasta.

Inmediatamente antes del molino debe situarse una lavadora de suficiente capacidad para eliminar las últimas impurezas. Generalmente, las aceitunas se muelen enteras, sin deshuesado previo, en molederos de piedras y modernamente, en molinos de martillos.

Para preparar adecuadamente la pasta y conseguir una separación fácil del aceite, se debe de homogeneizar en unas máquinas batidoras provistas de paletas o hélices que giran a baja velocidad para evitar emulsiones. Esta operación se efectuará a temperatura moderada, para lo cual la batidora está provista de una cámara envolvente por la que circula el agua templada. El aceite se hace más fluido, actuando dentro de unos límites muy estrictos de temperaturas para no favorecer el desprendimiento de productos volátiles, causa del aroma del aceite, y que no se inicien procesos de oxidación.

En algunos sistemas industriales, la pasta así preparada pasa por un extractor que separa una parte del aceite que contiene, basado en la diferente tensión superficial de aceite y agua.

I.I.3.3.3 Separación de sólidos y líquidos

Desde procedimientos muy elementales de separación se pasó a otros, también simples, pero que mejoraban las capacidades de trabajo y las cantidades de aceite recuperado; es el caso de la prensa de palanca o, bastante después, de la prensa de husillo y, más recientemente, de las prensas hidráulicas. En los más primitivos, la pasta se introducía en jaulas, pero la salida de los caldos no era fácil ni completa. Supuso una mejora el uso de capachos o discos filtrantes, sobre cada uno de los cuales se pone una capa de masa de aceituna, formando un conjunto cilíndrico (carga) que se fija por una aguja o guía central. La presión transmitida da lugar a la salida de los líquidos, mientras que los sólidos quedan retenidos en los capachos. La pasta, con su estructura granular, junto con los capachos actúan de filtros. En las prensas hidráulicas modernas se aplican presiones en la masa del orden de 50 a 65 Kg/cm². El agua de vegetación y el aceite van saliendo poco a poco hacia la vagoneta que contiene el cargo, y desde allí son conducidos a la batería de decantación. Los caldos obtenidos con presiones de hasta 40 Kg/cm² se pueden llevar los aceites menos retenidos, que pueden ofrecer una mejor calidad.

La distribución de la pasta sobre los capachos se ha venido haciendo de forma manual, aunque desde hace varios lustros se utilizan distribuidores mecánicos que hacen una correcta operación, con un incremento de la productividad de la mano de obra. Los capachos deben lavarse con frecuencia para evitar que sobre ellos se desarrollen fermentaciones que comuniquen malas propiedades a los aceites.

En la actualidad, la separación de fases orujo, aceite y alpechín, se hace por procedimientos continuos de centrifugación de masas. En el comienzo de la década de los años setenta, apareció el que daba lugar a la separación de las tres fases enunciadas (Figura I.2). En este sistema la pasta, debidamente diluida en agua templada, se inyecta en los denominados decánter o centrifugadoras de eje horizontal, que giran a 3.000- 4.000 r.p.m. Por la diferente densidad de las tres fases, éstas se separan de forma inmediata. Por una tobera sale el orujo (materia seca casi desengrasada) acompañado de humedad, próxima al

48-50 %. Por la segunda tobera se extrae el alpechín (agua de vegetación) con algo de aceite. La tercera tobera es para la salida del aceite, con alguna humedad. Las dos fases líquidas son tratadas en centrifugadoras de eje vertical para la correcta separación del aceite así el aceite se retiene en la fábrica mientras que se da salida a los alpechines libres.

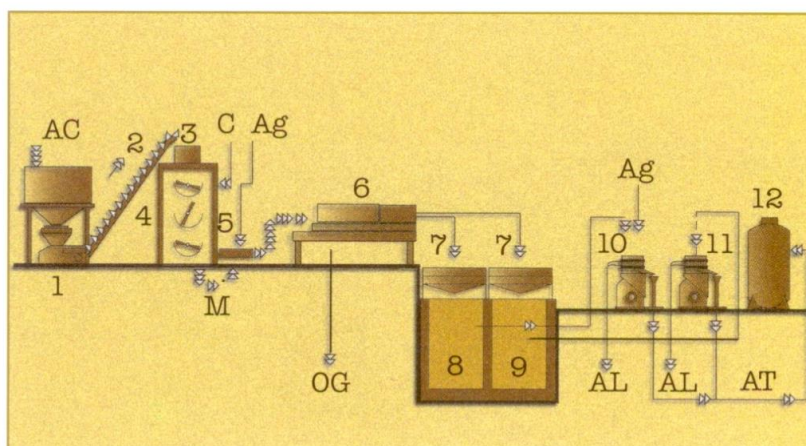


Fig. I.2. Sistema continuo de centrifugación de tres fases (Civantos, 1.998).

1. Limpieza/Lavado.; 2. Elevador aceituna; 3. Molino; 4. Termobatidora; 5. Bomba inyectora de masa; 6. Decánter de tres Fases; 7. Tamices vibratorios; 8. Depósito Fase aceite; 9. Depósito Fase alpechín; 10. Centrifugadora aceite; 11. Centrifugadora repaso alpechín; 12. Almacenamiento aceite; AC- Aceituna; M-Masa de aceituna; OG -Orujo Graso Húmedo; AT-Aceite; AL-Alpechín; C-Agua de Calefacción; Ag-Agua Caliente Directa.

Desde el año 1.992 se dispone de otro sistema de centrifugación de masas, el denominado sistema de dos fases (Figura I.3). En este caso no se adiciona agua, de forma habitual, a la pasta, únicamente cuando la aceituna está muy seca. En el decánter sólo hay dos toberas. Por una sale el aceite, con algo de humedad, por la otra un orujo con el 55 % de humedad aproximadamente, que equivale a la materia seca y al agua de vegetación contenidos en las aceitunas. El aceite se depura en la centrifugadora de eje vertical para quitarle la humedad y el orujo sirve de base para la industria extractora.

A nivel comercial los sistemas de tres fases implicaban dos condicionantes:

- Producción importante de alpechín (1 - 1,2 l. por Kg de aceituna) con un alto poder contaminante.

- Alto consumo de agua (de fluidificación de la pasta y de lavado de aceites) evaluable en 0,7-0,8 l. por Kg de aceituna.

Con el objetivo fundamental de hacer frente a esos dos inconvenientes, aparecieron comercialmente los sistemas continuos llamados de dos Fases, dos salidas o ecológicos, en los que como ya hemos comentado, el elemento básico diferenciador es el decánter, en el que se anulan las salidas de alpechín y se aumenta la distancia al eje del bol, de la salida del aceite (Hermoso et al., 1995).

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1.LimpiezaLavado. | AC - Aceituna. |
| 2.Elevador aceituna. | M - Masa de Aceituna. |
| 3.Molino. | OG - Orujo Graso Húmedo. |
| 4.Termobatidora. | AT - Aceite. |
| 5.Bomba inyectora de masa. | AL - Agua Lavado Aceite. |
| 6.Decánter de dos Fases. | C - Agua de Calefacción. |
| 7.Tamiz vibratorio. | Ag - Agua Caliente Directa. |
| 8.Deposito Fase aceite. | |
| 9.Centrífugadora lavado aceite. | |
| 10.Almacenamiento aceite. | |

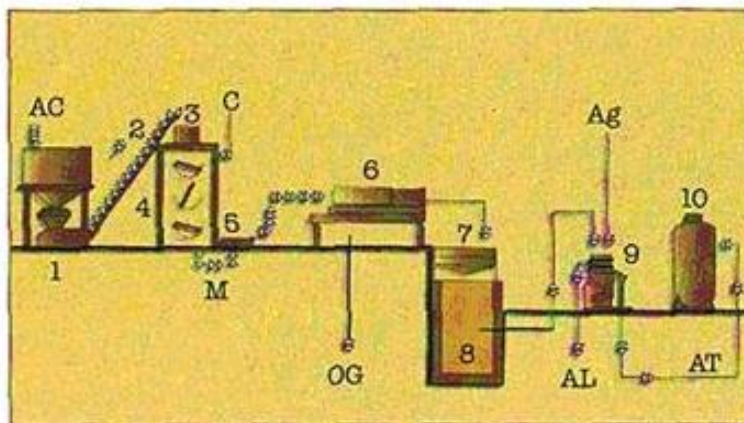


Figura I.3. Sistema continuo de centrifugación de dos fases (Civantos, 1.998)

I.I.3.3.4 Separación del aceite

La mezcla de agua y aceite procedente de un sistema tradicional de prensas puede separarse por gravedad en depósitos decantadores, haciendo un largo recorrido por recipientes comunicados por sifones, que en un sentido permiten enriquecer la proporción de

aceite y, en otro agotar más los alpechines. Existe también la posibilidad de hacer esta separación de forma rápida mediante centrifugadoras de líquidos de eje vertical, que giran a 6.000–7.000 r.p.m., pero previamente los caldos se deben situar en unos depósitos que homogeneicen los que van a cada centrifugadora, para que la operación sea eficaz. Unas centrifugadoras se preparan para tratar caldos con alta proporción de aceite y otras para alpechines con una proporción de aceite recuperable.

Anteriormente, en las instalaciones con sistema continuo de tres fases, la separación de caldos se hace siempre de forma inmediata, centrifugando cada una de las fracciones líquidas emitidas por el decánter, una fracción en centrifugadoras verticales especializadas para alta proporción de aceite, y la otra en centrifugadoras verticales preparadas para baja concentración oleosa. En el actual sistema continuo de dos fases, el aceite va a una centrifugadora vertical para quitarle la humedad e impurezas que pueden acompañarlo; operación denominada comúnmente lavado.

I.I.3.3.5 Almacenamiento del aceite

La cantidad de aceite de oliva virgen que se obtiene depende de la variedad, del estado de hidratación del fruto y de las características de cada campaña. Cifras comprendidas entre el 15 y el 25 % son las más habituales, especialmente las próximas al centro del intervalo: 20 %; si bien es cierto que, para una misma variedad e igual riqueza grasa sobre seco, la grasa total obtenida o riqueza grasa sobre húmedo va a depender del grado de humedad del fruto.

El aceite que se obtiene en la almazara tiene que quedar almacenado un tiempo más o menos largo hasta que se comercializa. Los mejores depósitos son los que mantienen temperaturas sin grandes cambios, de material inerte al aceite y que eviten en lo posible la influencia del aire y de la luz sobre el volumen almacenado, son más recomendables los subterráneos, cubiertos y revestidos interiormente de baldosas vitrificadas. En bodegas bajo techo pueden utilizarse con buenos resultados los depósitos de acero inoxidable con tapa, o los de chapa de acero recubiertos interiormente de resinas epoxídicas u otras similares

garantizadas para usos alimentarios. Si se trata de depósitos al aire libre es interesante protegerlos con un revestimiento externo para evitar los fuertes cambios de temperatura que no benefician nada a la calidad de los aceites. En todo caso, es conveniente que lleven fondos inclinados o cónicos, con posibilidad de purga, para extraer las impurezas acumuladas en esta zona durante el período de almacenamiento.

Los mejores aceites de oliva virgen, son envasados tras preparar una composición ó mezcla de aceites de oliva virgen extra convenientemente escogidos (coupage) o encabezar otros tipos (aceites de oliva), sin embargo en la elaboración siempre se obtienen aceites que, por proceder de una materia prima alterada, por un proceso industrial o un almacenamiento defectuosos, no son comestibles como tal, nos referimos a los aceites lampantes, que requieren procesos para corregir los defectos que los hacen impropios para el consumo directo, es decir, un proceso de refinación.

1.1.3.4 Extracción del aceite de orujo de oliva

De la elaboración del aceite resulta un subproducto, el orujo, que contiene la mayor parte de la materia seca de la aceituna (piel, pulpa, semilla y trozos de hueso) junto con una cierta proporción del agua de vegetación con los componentes hidrosolubles de la aceituna, que depende del sistema de elaboración utilizado, y con una parte de aceite que retiene la materia seca o que queda ocluido en el agua de vegetación que forma parte del orujo. Por esta razón, hay que considerar diferentes tipos de orujos, que requieren variantes en los procesos tecnológicos aplicados para la recuperación del aceite existente en este subproducto, como se observa en la Tabla I.5.

Tabla I.5. Sistemas de elaboración y condiciones para la obtención del aceite de orujo

Características	Sistema de elaboración		
	<i>Presión</i>	<i>Centrifugación tres fases</i>	<i>Centrifugación dos fases</i>
<i>Cantidad (Kg./t)</i>	350	500	800
<i>Humedad (%)</i>	25-27	48-52	55-60
<i>Grasa (%/húmedo)</i>	6	3	2,5
<i>Grasa(%/seco)</i>	8	6	6
<i>Azúcares reduc. (%)</i>		2	4.8
<i>Polifenoles ppm.</i>		10.000	23.000
<i>N.(%/seco)</i>		0.50	0.80
<i>P.(%/seco)</i>		0.12	0.25
<i>K.(%/seco)</i>		0.5	1.80

El orujo obtenido por presión se disgregaba en agua caliente y, sometido a una nueva prensada, se extraía un líquido, que decantado, daba un aceite escaso en cantidad y de mala calidad. Hasta finales del siglo XIX no se contó con instalaciones industriales que permitieran la recuperación de los aceites de los orujos mediante tratamiento con disolventes orgánicos que arrastran la grasa y que, por posterior destilación de la miscela, permite la obtención de aceite. Al principio se empleaba el sulfuro de carbono, pero como los orujos se trataban después de que comenzaran a fermentar, los aceites extraídos eran de mala calidad, muy ácidos y únicamente servían de base para la industria jabonera. Más adelante, se perfecciona el sistema ante las posibilidades que ofrecen los métodos de refinación de aceites, y comienzan a obtenerse aceites de orujo destinados a la alimentación. Los procedimientos se mejoran con la aparición de otros disolventes, en especial el hexano que, a causa de su selectividad, permite la obtención de buenos aceites de orujo.

La calidad del aceite de orujo depende, en primer lugar, de las características del orujo

del que se parte. Por naturaleza, el orujo es un material que fermenta con gran facilidad, alterándose la calidad del aceite, que es presa de procesos oxidativos en un corto espacio de tiempo.

I.I.3.4.1. Secado y molido

El orujo debe someterse a desecación en el momento de entrar en la extractora. Esta debe disponer de entradas diferentes para cada tipo, puesto que la manipulación del orujo de dos fases es completamente diferente debido a sus características, falta de consistencia, contenido en azúcares, pectinas, resinas y otras materias orgánicas, y a la elevada humedad. El orujo de prensas es bastante más seco que el de centrifugación de tres fases. Por todo ello, la organización del secado es diferente.

En cualquier caso, el orujo ha de tener una humedad próxima al 10 % al final del secadero; humedades superiores dan lugar a malos agotamientos. Los secaderos están formados por grandes cilindros de eje horizontal que giran lentamente, con sistema interior de hélices o paletas para que el orujo avance hasta el extremo opuesto, en corriente de aire caliente. La gran masa de aire necesaria se insufla a través de un horno, que por lo general utiliza como combustible el orujo extractado. Los gases enfriados y el polvo son aspirados por un recuperador, mientras que el orujo desecado puede almacenarse con menor peligro de fermentaciones, aunque persiste el de oxidación. Para la calidad es preferible continuar inmediatamente el proceso. El agotamiento del orujo depende del tamaño de las partículas en que se disgregue, por lo que es conveniente molerlo de forma que no sobrepase los 5 mm, para aumentar la superficie de contacto con el disolvente.

I.I.3.4.2. Tratamiento con disolvente

El orujo graso, bien disgregado, se coloca en depósitos cilíndricos y sobre él se inyecta un disolvente precalentado, que recorre la carga sucesivamente hasta un buen agotamiento. El trabajo se efectúa, en la mayor parte de los casos, disponiendo los extractores

en batería, para que la corriente de disolvente vaya pasando de uno a otro, de forma que el disolvente puro entre en el extractor más agotado. La miscela, formada por disolvente y aceite, se va recuperando de forma continuada a la salida de los extractores.

Una vez agotado el aceite de un extractor, se inyecta vapor a 1.5 Kg/cm^2 para eliminar los restos de disolvente y a continuación con la sobrepresión se provoca la descarga automática por la compuerta trasera. Existen extractores continuos en los que el orujo grasoso dispuesto en cadenas móviles se encuentra en contracorriente con el disolvente.

Tiene gran importancia el disolvente usado en el proceso. En un principio fue el sulfuro de carbono, poco selectivo por arrastrar, junto al aceite, resinas y gomas, y por llevar azufre libre que queda en el aceite y es agresivo para las conducciones. El punto de ebullición de $46 \text{ }^\circ\text{C}$ lo hace fácilmente inflamable, hoy en día su uso está relegado. El tricloroetileno no es inflamable (temperatura de ebullición de $87 \text{ }^\circ\text{C}$), ni desprende gases venenosos, aunque arrastra materias colorantes y resinas. Se utiliza poco, limitado a lugares donde hay limitaciones para el empleo de los otros disolventes.

Los aceites de orujo de más calidad son los obtenidos con el hexano, que es muy selectivo y con punto de ebullición intermedio entre los anteriores, por lo que es el más usado en la actualidad.

La materia seca del orujo grasoso está compuesta por un 60 % de pulpa y un 40 % de huesos, y el aceite se encuentra en un 95 % en la pulpa. Puede resultar una buena medida para incrementar la capacidad de trabajo de las extractoras, hacer un deshuesado del orujo y tratar exclusivamente la pulpa. Este material es poco poroso y dificulta la circulación de la miscela dentro del extractor, lo que puede soslayarse haciendo el granulado de la pulpa y cargándolo en los extractores. En instalaciones modernas se trabaja con este procedimiento, que permite reducir la espera del orujo grasoso antes de ser extractado. Por el aumento de capacidad de trabajo y la reducción del período de fermentaciones el aceite resulta mejor. También se recomienda el deshuesado y granulación en el tratamiento de los orujos de centrifugación de dos fases, aunque en este caso el hueso debe incorporarse por tongadas en el extractor para facilitar la circulación interna de la miscela.

I.I.3.4.3. Separación del aceite y recuperación del disolvente

La miscela que procede de los extractores pasa a un destilador donde es calentada, de forma indirecta, con vapor; el disolvente se vaporiza y se conduce a los refrigeradores para condensarlo y recuperarlo, después de eliminar por decantación la humedad que lo acompaña. El aceite se envía a los depósitos una vez que ha concluido el proceso. Se trata de aceite de orujo de oliva crudo, que requiere pasar por una refinería para poder ser utilizado en la alimentación. Quedando como subproducto el orujo agotado, llamado también orujillo, con un resto de aproximadamente 1 % de grasa, que sirve como combustible y también, después de eliminar el hueso, como alimento para el ganado; en este caso se hacen pequeños gránulos para facilitar el transporte y su uso.

I.I.3.5. Proceso de refinación de aceites

Los aceites de oliva vírgenes denominados lampantes, que reúnen características defectuosas a nivel organoléptico, o elevada acidez, deben ser sometidos a un tratamiento que los haga aptos para el consumo (refinación). Además, los aceites de orujo de oliva y los de semillas deben ser sometidos a refinación antes de ser consumidos.

La refinación puede llevarse a cabo por métodos físicos, químicos o por la combinación de ambos, siendo esto lo más frecuente en los aceites de oliva y orujo.

En la refinación química lo más característico es la neutralización de la acidez libre del aceite mediante álcalis fuertes, en especial con hidróxido sódico. Además de eliminar la acidez produce otros efectos deseables tales como la destrucción parcial de peróxidos, la eliminación de sustancias oxidadas de naturaleza ácida o la formación de hidróxidos de los metales pesados presentes en los aceites (Civantos, 1998).

En el sistema físico, la eliminación de los ácidos grasos libres se efectúa mediante la destilación en condiciones de temperatura y presión adecuadas, operación necesaria en todo

caso para la eliminación de las sustancias volátiles responsables de los olores defectuosos.

Para la refinación adecuada de los aceites es necesario recurrir a todas o a algunas de las siguientes fases esquematizadas en la Figura I.4.

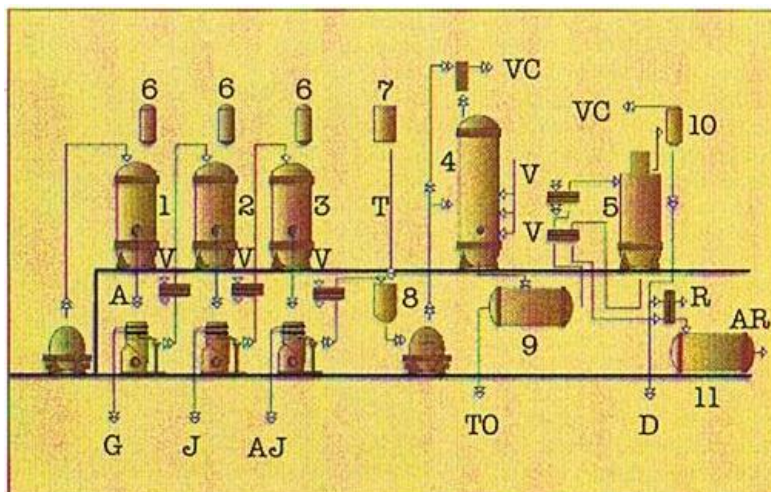


Fig. I.4. Sistema de Refinación de aceites de oliva y de orujo de oliva (Civantos, 1.998).

1. Desgomado; 2. Neutralizado; 3. Lavado; 4. Decolorado; 5. Desodorizado; 6. Dep. Auxiliares; 7. Dep. Tierra; 8. Homogeneizador; 9. Filtro Tierra; 10. Recuperador Destilados; 11. Desmargarinado; A-Línea Aceite; V-Vapor; T-Tierras; R-Refrigerante; VC-Vacío; G-Gomas; J-Jabones; AJ-Agua Jabonosa; TO-Tierra oleosa; D-Destilados; AR-Aceite Refinado.

I.I.3.5.1. Desgomado

Facilita la posterior desacidificación del aceite. La aplicación de ácidos minerales al aceite caliente, generalmente el ácido fosfórico, produce la hidratación y precipitación de las gomas presentes. La operación se efectúa en un depósito de fondo cónico. La centrifugación del aceite tratado facilita la separación de las impurezas.

I.I.3.5.2. Neutralización

Se considera básica en el sistema químico de refinación y tiene por objeto eliminar los ácidos libres existentes en el aceite. Se realiza en tanques cilíndricos de fondo cónico, una vez calentado el aceite. La reacción del álcali con los ácidos libres produce jabones, que

ocluyen a su vez una cierta proporción de grasa, ocasionando una pérdida en la cantidad de aceite tratado. La temperatura se controla en el intervalo de 80 a 100 °C. Una disolución de cloruro sódico mejora la separación de aceite y jabón.

I.I.3.5.3. Lavado

El aceite calentado en el intercambiador pasa a un nuevo mezclador para encontrarse con agua caliente tamizada. Disuelve los jabones aún existentes, aunque en baja proporción. La separación se puede realizar en una centrifugadora, enviando los lodos y aguas jabonosas a un depósito en el que se recupera la grasa y se recicla al inicio del proceso.

I.I.3.5.4. Decoloración

En muchas ocasiones los aceites lampantes presentan coloraciones intensas o anormales que conviene corregir. La decoloración se efectúa por tratamiento físico, mediante absorción superficial en sustancias que poseen este poder, como son las tierras decolorantes o una mezcla de éstas en carbones activos. Estos productos se añaden al aceite en los tanques de decoloración, sometiéndolos a temperaturas altas y a un batido lento, en medio ligeramente ácido, para eliminar coloides y potenciar la acción de las tierras. El aceite se pasa a través de filtros prensa de placas y lonas, en los que se retienen las tierras con las materias colorantes.

I.I.3.5.5. Desodorización

Esta fase tiene por objeto eliminar los olores y sabores defectuosos del aceite y a la vez, ciertos productos incorporados en los procesos industriales, como son los restos de disolventes especialmente en el caso de los aceites de orujo de oliva. El aceite se coloca en los aparatos desodorizadores, de forma que el vapor de agua recalentado, entre 220 y 280 °C,

atraviese las capas de aceite sometido a un alto vacío. En unas bandejas resistentes a los ácidos se produce la desodorización. En esta operación el vapor de agua arrastra ácidos grasos libre, por lo que se puede utilizar para la desacidificación del aceite, en lugar de la neutralización química. Se considera una ventaja la recuperación de los ácidos grasos en forma de destilado, en lugar de las pastas jabonosas obtenidas en el tratamiento con álcalis. Es frecuente hacer un uso mixto de la desacidificación física y química, con el primer sistema, se rebaja la acidez (hasta 2 o 2.5°) y con el segundo método, se terminan de reducirla.

I.I.3.5.6. Desmargarinado

Determinados aceites, entre los que se encuentran los de orujo de oliva, llevan glicéridos de punto de fusión más elevado, que enturbian los aceites fluidos a temperaturas algo bajas. El procedimiento para eliminarlos consiste en producir un enfriamiento del aceite con temperaturas entre 2 y 12° C y filtrarlo a continuación en un filtro de placas para retener las ceras (ésteres de los ácidos grasos con alcoholes de cadena larga) y las margarinas.

- Utilización de los aceites refinados: Los aceites de oliva procedentes de un proceso de refinación son de color muy pálido, poco viscosos, con poco o ningún sabor y olor que recuerden a la aceituna, y de muy baja acidez. Estos aceites, encabezados en la proporción adecuada con un aceite de oliva virgen, constituyen los llamados “aceites de oliva” que cuentan con una importante cuota de consumo en todo el Mundo. Resultan aceites suaves, que gustan al consumidor de muchas zonas urbanas, agradables de sabor, aunque poco intenso.

I.I.3.6. El envasado

Uno de los últimos eslabones de la larga cadena para producir el aceite lo constituye la operación de envasado. Está realizado por industrias que cuentan con las oportunas

licencias, que garantizan unos tratamientos higiénicos y adecuados para un producto de alimentación humana, a la vez que se responsabilizan de que se respeten las normas vigentes exigibles a los aceites de oliva y a los aceites de orujo de oliva (Civantos, 1.998).

Todos los cuidados a los que se someten los aceites en las envasadoras y los envases que se utilizan están orientados a mantenerlos en las mejores condiciones hasta el momento del consumo. Los mayores enemigos para la calidad de un aceite son los fenómenos fermentativos y oxidativos; estos últimos son especialmente los más agresivos para el aceite envasado ya que en caso de desarrollarse, atentan contra la integridad cualitativa. Además, el producto comestible debe tener una presentación y una presencia adecuadas a su utilización.

Inmediatamente antes del envasado, el aceite ha de ser filtrado para retener aquellas impurezas que pudiera llevar en suspensión. Tras un correcto proceso de elaboración y de conservación en bodega basta con un filtrado de abrillantamiento, en el que se elimina cualquier traza de humedad y se evita la formación de pequeños depósitos en el fondo del envase.

El filtro de abrillantamiento está constituido, en su parte esencial, por placas filtrantes de polipropileno, en número variable según su capacidad. Entre las placas se coloca, como material filtrante, tela de algodón compacto o papel de filtro.

En ocasiones, el aceite contiene glicéridos que solidifican a temperaturas algo bajas y que pueden darle un aspecto turbio con formación de madejas, volviendo al estado brillante cuando la temperatura sube. Es un fenómeno natural que no implica ninguna adulteración.

El envase en el que se deposita el aceite influye también en la conservación, en función de su permeabilidad al aire, del grado de protección de la luz y del hermetismo del cierre. Tanto el oxígeno del aire como la radiación luminosa favorecen la oxidación, el enranciamiento y la decoloración por pérdida de los colorantes naturales. Los envases de polietileno son más sensibles; siendo el PET actualmente el envase de plástico más usado por su menor permeabilidad al aire y su mayor transparencia; siendo conveniente protegerlo de la luz en el interior de cajas adecuadas. El cristal, empleado generalmente en el envasado de los aceites de mayor precio, ofrece buenos resultados siempre que las botellas estén protegidas de la luz en el interior de cajas adecuadas. El envase de hojalata conserva en buenas

condiciones el aceite durante un período largo. La normativa fija que los envases se llenarán hasta un mínimo del 90 % de su capacidad para no dejar bolsas de aire que lo perjudiquen, salvo en los envases de hojalata, en los que superará el 80 % (Civantos, 1.998).

La operación de envasado se efectúa en cadenas en las que de forma más o menos automatizada se sitúan los envases, se llenan, se encapsulan, reciben las etiquetas y se sitúan en cajas o contenedores para su expedición hasta los comercios. En cada envase irá una etiqueta con la denominación genérica y la específica del aceite, la acidez libre expresada en grados (y demás parámetros físico-químicos indicados en la legislación vigente), el contenido neto en peso o en volumen, la identificación del envasador, fabricante o distribuidor, así como el país de origen. Se puede indicar la procedencia o la denominación de origen cuando el país de origen haya concedido estos derechos a los aceites de oliva vírgenes. Los lotes deben estar identificados, llevarán el mes y el año en que se envasen y la indicación de la fecha límite de consumo preferente (BOE, 1999; DOUE, 2011)

Los aceites envasados y comercializados bajo marca o los amparados por una Denominación de Origen tienen para los consumidores la garantía de un producto que reproduce fielmente unas características. Las diferentes marcas han establecido a lo largo del tiempo, un determinado patrón de calidad y responden a un tipo, con un flavor del que no se van a apartar y que se consigue, en la mayor parte de las ocasiones, mediante la combinación de aceites de diferente procedencia, en proporciones que pueden variar de unos a otros, según las características de los aceites de cada zona y según las cosechas (Alba et al., 1.997)

Los aceites de oliva amparados por Denominación de Origen ofrecen la garantía de procedencia de unos olivares de ciertas variedades, con un sistema de cultivo y un ambiente determinado que determinan de forma decisiva sus características. Sin embargo, la influencia de las incidencias climáticas de cada año puede ocasionar diferencias apreciables, enriqueciendo los atributos de los aceites de determinadas cosechas (Civantos, 1998; Madrid et al., 1997).

I.II. Características físico-químicas del aceite de oliva

1.II.1. Parámetros de calidad

Las determinaciones analíticas que se aplican tradicionalmente al aceite de oliva se dividen en dos grupos:

- Determinaciones de calidad
- Determinaciones de genuinidad o pureza.

Ambas tienen objetivos claramente diferenciados y usan técnicas también distintas, siendo las determinaciones de genuinidad mucho más complejas y sofisticadas. Así, estas últimas pretenden comprobar si en el aceite de oliva hay otros componentes ajenos al mismo, mientras que las determinaciones de calidad pretenden evaluar si el producto está o no deteriorado y si es posible en que magnitud.

Desde el punto de vista del consumidor, los atributos de calidad más importantes son los sensoriales, ya que son los únicos que va a poder evaluar “per se”, no estando a su alcance la evaluación de los atributos ocultos, teniendo que estar supeditado a la veracidad de la información de la etiqueta del producto en cuestión, en este caso aceite de oliva virgen.

La prueba de calidad más importante del aceite de oliva virgen es su análisis sensorial que nos dirá como es un aceite y en que categoría comercial se debe clasificar. Los parámetros que se suelen utilizar son:

- Grado de acidez
- Índice de peróxidos
- Absorción de luz en la región ultravioleta

Estas determinaciones proporcionan una información del grado de degradación del aceite, que, junto a las características organolépticas, dan una idea de la calidad global. Esta información está íntimamente relacionada con la materia prima de la cual procede el aceite, las aceitunas, y con todo el proceso de elaboración desde que están en el árbol, hasta que se

obtiene el aceite de oliva virgen, así como el sistema y tiempo de almacenamiento, envasado y vida posterior hasta que llega al consumidor (DOCE, 1991).

Existen diferentes definiciones de aceites de oliva, la siguiente pertenece al Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE, 2001; DOCE,2002; DOUE, 2013):

1. Aceites de Oliva Vírgenes: Aceites obtenidos a partir del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos en condiciones que no ocasionen la alteración del aceite, y que no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, el centrifugado y la filtración, con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolvente, mediante coadyuvante de acción química o bioquímica, o por procedimientos de reesterificación de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza.

Estos aceites se clasifican de acuerdo a las siguientes denominaciones:

- a. Aceite de oliva virgen extra: “aceite de oliva de categoría superior obtenido directamente de aceitunas y solo mediante procedimientos mecánicos”. Aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, como máximo de 0,8 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.
 - b. Aceite de oliva virgen: “aceite de oliva obtenido directamente de aceitunas y solo mediante procedimientos mecánicos”. Aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, como máximo de 2 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría
 - c. Aceite de oliva lampante: aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, superior a 2 g por 100 g y/o cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.
2. Aceite de oliva Refinado: Aceite de oliva obtenido mediante el refinado de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser

superior a 0,3 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.

3. Aceite de oliva – contiene exclusivamente aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes: “aceite que contiene exclusivamente aceites de oliva que se hayan sometido a un tratamiento de refinado y de aceites obtenidos directamente de aceitunas”. Aceite de oliva constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del aceite lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.
4. Aceite de orujo de oliva crudo: Aceite obtenido a partir del orujo de oliva mediante tratamiento con disolvente o por medios físicos o que corresponda, con excepción de algunas características determinadas, a un aceite de oliva lampante; con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.
5. Aceite de orujo de oliva refinado: Aceite obtenido mediante refinado de aceite de orujo de oliva crudo, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 0,3 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.
6. Aceite de orujo de oliva: “aceite que contiene exclusivamente aceites procedentes del tratamiento del producto obtenido tras la extracción del aceite de oliva y de aceites obtenidos directamente de aceitunas”. Aceite constituido por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1 g por 100 g y cuyas otras características son conformes a las establecidas para esta categoría.

De la definición genérica de aceite de oliva virgen se desprenden dos aspectos muy importantes, en primer lugar, el carácter de zumo de fruto del mismo, ya que únicamente puede extraerse de la aceituna por medios físicos; y en segundo lugar es que el proceso de obtención debe realizarse en frío con objeto de preservarlas características sensoriales y no favorecer los procesos de deterioro, que se aceleran por acción de la temperatura. Por tanto, los aceites se clasifican en base a dos conceptos, el grado de acidez y los otros criterios físico-químicos y organolépticos fijados en la Norma.

El deterioro del aceite es función de tres causas fundamentales:

- Materia prima en mal estado
- Proceso de extracción
- Proceso de conservación

Lo cual se puede resumir desde el punto de vista químico en dos procesos reactivos degenerativos:

- a) Hidrólisis
- b) Oxidación

a) Procesos hidrolíticos

En los procesos hidrolíticos, a diferencia de la reacción de generación de triglicéridos, el triglicérido pierde ácidos grasos por efecto de hidrólisis, dando generación de ácidos grasos libres, que provocan subida de acidez, como puede observarse en la Figura I.5. Los factores que pueden afectar al grado de acidez son diversos: terreno, variedad de aceituna, periodo de recolección, tipo de recolección, mezcla de aceitunas de suelo y vuelo, tipo de almacenamiento, sistema de elaboración, condiciones de trabajo separación líquido-líquido, estado sanitario de las aceitunas, etc.

b) Procesos oxidativos

El proceso de oxidación del aceite es un proceso natural e irreversible, de forma que no puede ser evitado, pero sí puede ser retardado si se toman una serie de precauciones sencillas y lógicas. La oxidación de los ácidos grasos insaturados por el oxígeno del aire húmedo es un proceso complejo, con reacciones a veces no muy bien conocidas, que implica la aparición de radicales libres y sus reacciones, dando multitud de compuestos de reacción, muchos de ellos responsables del conocido olor a rancio. Para que la acción comience es necesario que uno de los compuestos que van a reaccionar esté activado, o bien el ácido graso o bien el oxígeno molecular. La activación del ácido graso insaturado puede producirse por estabilización, o por resonancia del radical libre (alilo) formado, y la del oxígeno mediante un fotón de luz. El primer mecanismo va a dar una serie de compuestos de reacción en un proceso que se conoce como autooxidación y el segundo mecanismo va a dar lugar a otra serie de compuestos por una vía que se conoce como fotooxidación.

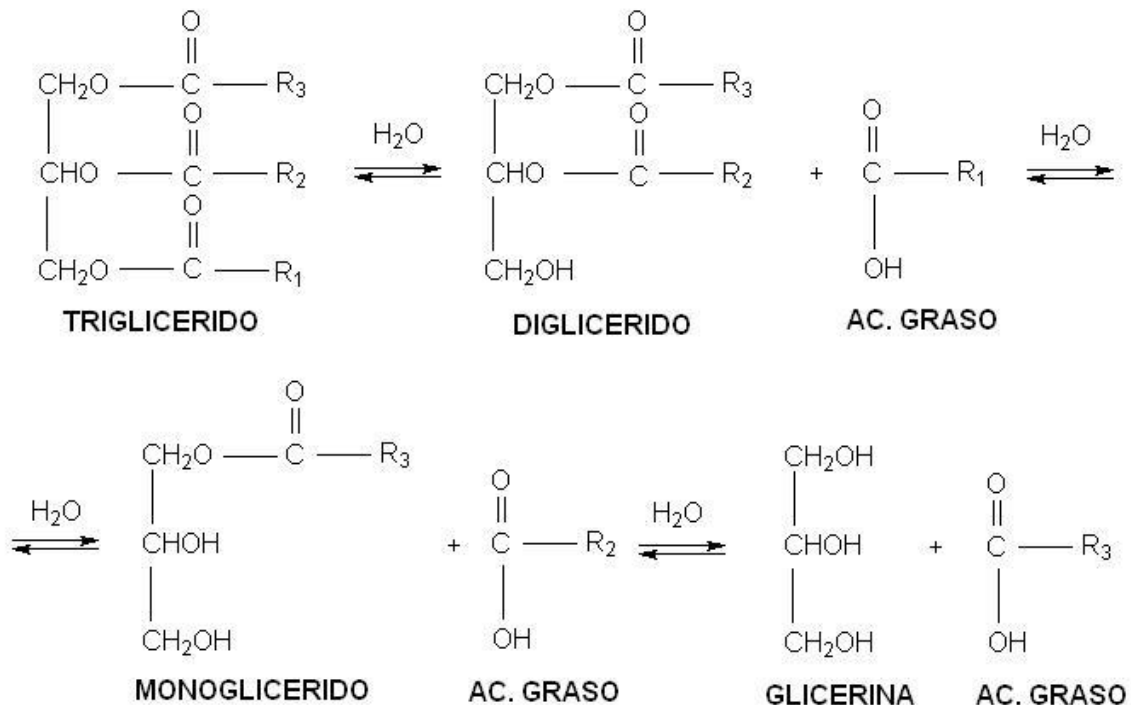
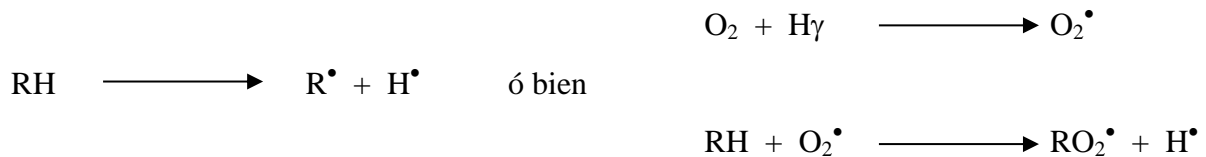


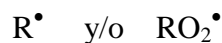
Fig. I.5. Reacción de hidrólisis de triglicéridos. [Civantos et al., 2008]

De cualquier forma que se origine el proceso, los primeros productos que se van a formar son hidroperóxidos insaturados, para posteriormente por vías distintas den a la degradación o la polimerización. Estos hidroperóxidos o peróxidos, son los compuestos primarios de oxidación Dichos peróxidos en reacción favorecida por la temperatura, se descomponen dando moléculas más pequeñas de diferentes especies químicas como hidrocarburos, esteres éteres aldehidos y cetonas, los cuales poseen una tensión de vapor suficiente para ser percibidos por los órganos de los sentidos, dando el característico flavor a rancio (Alba et al., 2008).

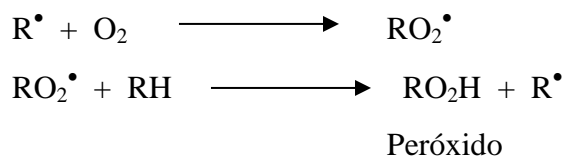
La reacción de iniciación implica la formación de un radical libre:



Así se obtienen los radicales iniciales



Una vez formados los radicales libres, tenemos la fase de propagación



Junto con la acidez, y los parámetros oxidativos (primarios y secundarios) existen otros parámetros de calidad del aceite de oliva que se presentan en el punto I.IV.1. (DOUE, 2013).

I.II.2. Aspectos nutricionales: el aceite de oliva y la salud

Las grasas, o lípidos son nutrientes indispensables para la vida. Su función es predominantemente energética (rendimiento del trabajo y calor). Independientemente del hecho de que una dieta sin grasas no es apetitosa, su valor biológico resulta evidente si se piensa que las estructuras celulares y de los orgánulos intracelulares requieren la presencia de los lípidos para desarrollar su actividad propia. Por tanto, las grasas, aparte de su función energética, tiene también una insustituible función plástica. Además, algunos ácidos grasos son esenciales para el organismo, ya que su carencia produce una serie de alteraciones en el crecimiento, en el aparato reproductor, en el hígado, en la piel y en el metabolismo. Por último, como algunas vitaminas (A, D, E, K) sólo son solubles en grasas, necesariamente dependen de los lípidos para ser absorbidas (Viola y Audisio, 1987; Pérez-Jiménez et al., 2005).

I.II.2.1. Efectos del aceite de oliva.

I.II.2.1.1. El aceite de oliva y el estómago.

Investigaciones realizadas sobre la tolerancia gástrica del aceite de oliva han puesto de relieve cierta jerarquía nutricional entre las diversas grasas alimentarias, según su composición en ácidos grasos. El aceite de oliva, cuyo componente principal es el ácido oleico aparece como el mejor tolerado.

El tonus de la válvula que separa el esófago del estómago, impidiendo el reflujo del material ácido en el esófago, y que normalmente se deprime con todas las grasas alimentarias, disminuye de forma netamente inferior y por un tiempo mucho más breve con el aceite de oliva que con otras grasas, mientras que el tiempo de semievacuación del estómago, no aparece reducido significativamente después de administrar aceite de oliva. Así mismo se comprueba que la mantequilla es la grasa menos tolerada y el girasol rico en poliinsaturado ha producido un efecto intermedio, más próximo al de la mantequilla que al del aceite de oliva.

Por otra parte, se han comprobado los efectos beneficiosos del aceite de oliva sobre las gastritis hiperclorhídricas y sobre la úlcera gastroduodenal.

I.II.2.1.2. Aceite de oliva e intestino.

El aceite de oliva tomado por la mañana en ayunas con una dosis de dos cucharadas soperas parece tener un efecto satisfactorio sobre el estreñimiento crónico no complicado. El mecanismo de acción se debería a la producción de colecistoquinina que tendría la doble aptitud de hacer que se contrajera la vesícula biliar y de activar el peristaltismo del intestino delgado.

I.II.2.1.3. Aceite de oliva y vías biliares.

Por su acción estimulante sobre la liberación de la colecistoquinina, el aceite de oliva actúa de forma favorable sobre la atonía de la vesícula biliar y sobre la disquinesia de las vías biliares ya que la colecistoquinina, aparte de provocar la contracción de la vesícula biliar, determina la apertura del esfínter de Oddi por un período más largo (8-10 min.) que la contracción de la vesícula (2-3 min.). La acción del aceite de oliva en este caso es eficaz pero al mismo tiempo suave, sin provocar contracciones violentas. Por este efecto benéfico, bien conocido por los médicos de la antigüedad, afirmaban que “el aceite de oliva es un medicamento empírico, del que la fisiología ha demostrado la acción colagoga indudable”

En el tratamiento de las disquinesias biliares, el aceite de oliva es el único colagogo completo (colerético y colecistocinético) siendo considerado como alimento-medicamento. Al mismo tiempo el aceite de oliva provoca una rápida depuración plasmática de la bromosulfonftaleina, demostrando así que aumenta el poder de desintoxicación del hígado.

I.II.2.1.4. El aceite de oliva y la infancia

El lactante recibe cerca del 50 % de las calorías de los lípidos, de éstos cerca del 10 %

está representado por los ácidos grasos poliinsaturados, el niño destetado requiere todavía una cantidad relativamente elevada de lípidos, aun cuando no todos los pediatras están de acuerdo con la cantidad exacta que, para algunos, no difiere mucho de la del adulto. Tampoco existe un acuerdo sobre la elección de las grasas alimentarias, y mientras algunos pediatras consideran útil que al menos dos tercios sean de origen vegetal. En este sentido es difícil que se produzcan situaciones de carencia de ácidos grasos esenciales en el niño, no obstante, una aportación escasa de ácido linoleico puede determinar retrasos en el crecimiento, alteraciones cutáneas, hepáticas y del metabolismo.

I.II.2.1.5. Aceite de oliva y senectud

En numerosas investigaciones se ha observado que el envejecimiento va acompañado invariablemente de una acumulación intracelular de liofuscina, un pigmento derivado de la polimerización de los ácidos grasos peroxidados. Dietas pobres en vitamina E aumentan la formación de peróxidos por el contrario la adición de antioxidantes disminuye la formación de radicales libres y favorece el alargamiento de la vida. Por ello, se prefiere el aceite de oliva en la dieta alimentaria por su contenido equilibrado de ácido linoleico, alfa-linolénico y sustancias antioxidantes (Viola y Audisio, 1987; *European Journal of Clinical Investigation*, 2005).

I.II.2.2. Aceite de oliva y arteriosclerosis

Numerosas investigaciones clínicas, epidemiológicas, realizadas en las últimas décadas, han puesto de manifiesto que la incidencia de la arteriosclerosis está estrechamente relacionada con las costumbres alimenticias de las poblaciones (Viola y Audisio, 1987; *European Journal of Clinical Investigation*, 2005). En efecto, se observa una mayor frecuencia de la enfermedad en las naciones con un desarrollo económico elevado en relación con las que están en vías de desarrollo. Se ha demostrado así, que una alimentación rica en grasas animales favorece el desorden del metabolismo lipídico, que está en la base de la patogénesis de la placa ateromatosa y que un aumento de los niveles de colesterol plasmático

constituye uno de los principales factores de riesgo de la enfermedad. La acción favorable de los monoinsaturados no se limita sólo al efecto de “sustitución” de los saturados y al aumento de los valores del colesterol HDL; estudios efectuados en diversas partes del mundo, han demostrado que los monoinsaturados presentan un efecto casi igual a los poliinsaturados sobre los niveles del colesterol total y un efecto protector sobre la mortalidad coronaria.

I.II.2.3. Aceite de oliva y frituras

Con el fin de hacer más agradables los alimentos, el hombre ha recurrido a su preparación culinaria mediante la ebullición, asado, ahumado o fritura. En la fritura se alcanzan temperaturas muy elevadas (Viola y Audisio, 1987), sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que durante la fritura la temperatura interior del alimento permanece prácticamente constante a 100 °C, hasta la evaporación total del agua del alimento. Para que la grasa caliente empiece a penetrar en el alimento es necesario que previamente se haya evaporado una gran parte o la totalidad de esta agua. Por ello, el tiempo real de actuación de la grasa caliente sobre los alimentos es muy corto y ésta es una de las causas que permite afirmar que el daño térmico de los alimentos en la fritura no es mayor, e incluso es menor en algunos casos. Por otro lado, al hablar de los cambios que ocurren en la grasa de la fritura, conviene diferenciar claramente los que suceden cuando se someten las grasas a temperaturas excesivas, de los que realmente ocurren en la fritura de los alimentos.

Las temperaturas elevadas, en presencia del oxígeno atmosférico, acentúan los fenómenos de autooxidación que sufren las grasas espontáneamente también a temperatura ambiente. Estos fenómenos son proporcionales al grado de saturación de la grasa y a la eventual concomitancia de sustancias pro-oxidantes, mientras que son contrarrestadas por la presencia de sustancias antioxidantes.

Las grasas animales, si bien poseen un grado bajo de insaturación, sufren rápidamente el proceso de autooxidación ya que están privadas de agentes antioxidantes; también los aceites de semillas sufren este proceso rápidamente ya que, si bien contienen una buena cantidad de agentes antioxidantes (en forma de tocoferoles), presentan un elevado grado de

instauración; en cambio el aceite de oliva se comporta de forma muy estable frente a los ataques de oxígeno del aire puesto que aparte de poseer un grado intermedio de insaturación, contiene numerosas sustancias antioxidantes (alfa-tocoferol y polifenoles).

La estabilidad del aceite de oliva se mantiene incluso a temperaturas elevadas de fritura, al contrario de lo que sucede con los aceites de semillas, no solo por la presencia de los antioxidantes sino también por su riqueza en ácido oleico. Los ácidos grasos poliinsaturados son los que sufren mayor grado los efectos perjudiciales de la termooxidación y esta susceptibilidad es proporcional al grado de instauración media del aceite, nº de enlaces dobles presentes en la cadena simple del ácido graso (Viola y Audisio, 1987).

I.III. Residuos en aceite de oliva

1.III.1. Introducción

Al abordar el problema de la contaminación de alimentos, debemos tener presente que para gran parte de la población del planeta hablar de seguridad alimentaria, no es solo un problema de calidad sino, y sobre todo, de “cantidad”. La pobreza es el determinante de morbi-mortalidad más importante del planeta. En los últimos años hemos visto como el crecimiento exponencial de la población sobre todo en los países en desarrollo, no ha sido acompañado de un crecimiento en la producción de alimentos (Iª Jornada de Salud y Medio Ambiente Cádiz, 2.002).

El crecimiento demográfico y los cambios en los hábitos alimenticios, ha dado como resultado la transformación de bosques para el uso agrícola, el desarrollo de una agricultura intensiva, con utilización de plaguicidas, alimentos genéticamente modificados, etc. La economía global produce alimentos suficientes para mantener a la población mundial si es que fueran mejor distribuidos, sin embargo, muchas personas no tienen acceso a alimentos suficientes para gozar de una vida sana.

En 64 de los 105 países en desarrollo estudiados por la FAO entre 1985 y 1995, la producción alimentaria quedó por detrás del crecimiento de la población. La producción de alimentos por persona descendió en 31 de 46 países africanos. Además, la escasez de agua está limitando el desarrollo en general y la producción de alimentos en particular. El acceso al agua potable será uno de los patrones oro de calidad vital en nuestro siglo. A la larga, una mayor producción de alimentos es requisito previo para la salud a nivel mundial. Esta intensificación de la actividad agrícola supondrá un aumento de los riesgos de exposición a agentes infecciosos provocados por las alteraciones en los ecosistemas, a productos como plaguicidas, metales, además de una pérdida de biodiversidad, fertilidad del suelo, etc. (Iª Jornada de Salud y Medio Ambiente Cádiz, 2.002).

La Cumbre Mundial sobre la Alimentación de 1996 centró la atención internacional en el concepto de seguridad alimentaria, “el acceso de todas las personas a alimentos nutritivos para mantener una vida sana y activa”, de acuerdo con la FAO. Para solucionar el

problema de los alimentos en el planeta es preciso programas de incremento de la producción agrícola, mejora de la distribución de alimentos, manejo de los recursos y provisión de servicios de planificación familiar.

Debido al riesgo que suponen para la salud del consumidor, es necesario controlar la presencia de estos agentes tóxicos en los alimentos. Por ello, desde el año 2000, las exigentes normas de la Unión Europea (UE) se han hecho aún más estrictas para garantizar que los alimentos de los ciudadanos europeos sean lo más seguros posible. Así, en el Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria (Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria, 1999) se indica que una de las prioridades de la Comisión de las Comunidades Europeas es velar por los más elevados niveles de seguridad alimentaria en la UE. El planteamiento de la seguridad alimentaria es ahora más integrado: se sigue cuidadosamente la pista de los alimentos y los piensos a través de toda la cadena alimentaria, desde la misma explotación hasta la mesa del consumidor (trazabilidad). Las autoridades de la UE evalúan meticulosamente el riesgo y consultan a los mejores expertos científicos antes de prohibir o permitir la inclusión de cualquier producto, ingrediente, aditivo u organismo genéticamente modificado, en cualquier pienso o alimento, venga de dentro o de fuera de la UE.

Las crisis alimentarias por las que ha pasado la sociedad en los últimos tiempos han creado, una alarma social en el consumidor que ha llevado a las autoridades europeas a la creación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (DOCE, 2002) y a la correspondientes Agencias Nacionales. Estos organismos ya están desarrollando un papel fundamental.

En el Reglamento (CE) nº 178/2002, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria con el fin de contribuir a lograr un nivel elevado de protección de la vida y salud de las personas. Dicha autoridad facilitará asesoramiento científico y apoyo científico técnico en términos de nutrición humana en relación con la legislación comunitaria. Además, este organismo europeo velará por que se apliquen los requerimientos necesarios para el diseño y comercialización de los alimentos.

Los objetivos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria son los siguientes:

- Proporcionar a las instituciones comunitarias y a los Estados miembros los mejores dictámenes científicos posibles en todos los casos previstos por la legislación comunitaria.
- Promover y coordinar la armonización de las metodologías de determinación del riesgo.
- Encargar los estudios científicos que sean necesarios para el cumplimiento de su misión.
- Buscar, recopilar, cotejar, analizar y resumir los datos científicos y técnicos.
- Empezar acciones para identificar y caracterizar los riesgos emergentes, con el fin de reducirlos o prevenirlos.
- Establecer un sistema de redes de organizaciones que actúen en los ámbitos comprendidos en su misión, de cuyo funcionamiento será responsable.
- Ser responsable del funcionamiento de alerta rápida para alimentos y piensos.
- Proporcionar asistencia científica y técnica, cuando así lo solicite la Comisión, en los procedimientos de gestión de crisis que ésta ponga en marcha en relación con la inocuidad de los alimentos y piensos.
- Proporcionar asistencia científica y técnica, cuando así lo solicite la Comisión, con el fin de mejorar la cooperación entre la Comunidad, los países candidatos a la adhesión, las organizaciones internacionales y los terceros países.
- Ayudar, cuando así lo solicite la Comisión, en la comunicación sobre cuestiones nutricionales relacionadas con la política sanitaria.
- Asegurarse de que el público y otras partes interesadas reciben una información, rápida, fiable, objetiva y comprensible.
- Manifestar sus propias conclusiones y orientaciones sobre temas comprendidos en su misión.
- Llevar a cabo cualquier otra tarea que le asigne la Comisión y esté comprendida en su misión.

El hueco marco normativo, por el que se establecen los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, de 28 de enero de 2002, ha abordado aspectos

esenciales del mercado único como son los requisitos de la seguridad alimentaria, la definición de alimento seguro y la delimitación de las responsabilidades de los diferentes agentes económicos (López, 2004).

El sistema de trazabilidad surge en Europa con el objetivo de garantizar a los consumidores la seguridad de los alimentos que llegan a su mesa.

La *trazabilidad* es la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución, de un alimento, un pienso o un ingrediente, reviste una importancia decisiva para la protección de los consumidores. En concreto, es una herramienta de gestión del riesgo que contribuye a facilitar la retirada de los alimentos en los que se haya detectado algún problema y permite que los consumidores reciban información específica y exacta sobre los productos en cuestión (DOCE, 2002).

Por otra parte, debido a la necesidad de integrar todos los elementos que promueven la seguridad de los productos y procesos alimentarios, el 5 de julio de 2001, se creó la Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Este organismo debe desempeñar un papel fundamental en el desarrollo, con el objetivo general de promover la seguridad alimentaria, como aspecto fundamental de la salud pública, y de ofrecer garantías e información objetiva a los consumidores, agentes económicos y agentes económicos el sector agroalimentario español.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) es un Organismo Autónomo adscrito al Ministerio de Sanidad y Consumo, que tiene como misión garantizar el más alto grado de seguridad y promover la salud de los ciudadanos, trabajando para:

- Reducir los riesgos de las enfermedades transmitidas o vehiculadas por los alimentos
- Garantizar la eficacia de los sistemas de control de los alimentos
- Promover el consumo de los alimentos sanos, favoreciendo su accesibilidad y la información sobre los mismos

- Planificar, coordinar y desarrollar estrategias y actuaciones que fomenten la información, educación y promoción de la salud en el ámbito de la nutrición y, en especial, en la prevención de la obesidad.

La Agencia se crea con el objetivo general de promover la seguridad alimentaria, como aspecto fundamental de la salud pública, y de ofrecer garantías e información objetiva a los consumidores y agentes económicos del sector agroalimentario español, desde el ámbito de actuación de las competencias de la Administración General del Estado y con la cooperación de las demás Administraciones públicas y sectores interesados

Las Funciones de AESAN son las siguientes:

- Coordinar las actuaciones relacionadas directa o indirectamente con la seguridad alimentaria.
- Instar actuaciones ejecutivas y normativas, de las autoridades competentes, especialmente en situaciones de crisis o emergencia.
- Coordinar el funcionamiento de las redes de alerta existentes en el ámbito de la seguridad alimentaria.
- Asesorar en la planificación y desarrollo de las políticas alimentarias. Elaborar, en coordinación con el Comité Científico, informes técnicos y difundirlo (AESAN).

En enero del año 2014 se crea AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición). Tanto la Agencia de Seguridad Alimentaria y Nutrición como el Instituto Nacional de Consumo compartían misión en cuanto a la protección de la salud y seguridad de los consumidores y usuarios y, aunque cada uno de ellos tenía áreas de actuación específicas, los dos trabajaban en el ámbito de los alimentos y los dos disponían de líneas de trabajo de carácter administrativo, analítico y de investigación que se podían complementar y, así, rentabilizar mejor el uso de los recursos públicos.

La Agencia nace, en definitiva, con una vocación integradora y de cooperación de todos los agentes involucrados en la garantía de la seguridad de los consumidores en su sentido más amplio.

La refundición de ambos organismos autónomos permite abordar la protección de los consumidores y usuarios desde un único órgano administrativo bajo una sola dirección que garantice la unidad de criterio, dificulte las disfunciones en el cumplimiento de las tareas y haga ganar en eficacia y eficiencia la gestión de la Administración General del Estado. Existirá, asimismo, una interlocución única para empresas, organizaciones de consumidores y administraciones.

Los objetivos fundamentales de la AECOSAN serán los siguientes:

- La promoción y el fomento de los derechos de los consumidores y usuarios.
- Promover la seguridad alimentaria, ofreciendo garantías e información objetiva.
- Planificar, coordinar y desarrolla estrategias y actuaciones que fomenten la información, educación y promoción de la salud en el ámbito de la nutrición, y en particular, en la prevención de la obesidad.

La Agencia también reforzará la presencia de España en todas las decisiones que tengan que ver con la seguridad alimentaria y el consumo en el ámbito de la Unión Europea. De ella dependerán, además, los tres laboratorios nacionales de referencia, el Centro Nacional de Alimentación (CNA), el Laboratorio de Referencia Europeo de Biotoxinas, en Vigo y el Laboratorio Arbitral de Consumo.

- El nuevo organismo autónomo surge de la fusión entre la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición y el Instituto Nacional de Consumo.
- La fusión refuerza el papel de la agencia, encargada de velar por la seguridad de los alimentos y de productos, también en la Unión Europea.

- La evaluación de riesgos por el comité científico que se hace en el ámbito de la nutrición se extiende al resto de productos de consumo.
- La agencia estará presidida por la secretaria general de Sanidad y Consumo.

La producción, recolección, manipulación y distribución de alimentos hoy día, en nuestro país, viene determinada por una dinámica economicista donde importa poco la calidad de lo que comemos, ni el contexto en el que son producidos los alimentos. Hoy lo que interesa es hacer un producto rentable. La contaminación implica la presencia de sustancias indeseables. En la inmensa mayoría de los casos, los alimentos no cambian su aspecto u otras de sus características por lo que la contaminación no puede reconocerse a simple vista y pasa inadvertida. Son numerosos los tipos de contaminación alimentaria (Ruíz, 2.003)

La contaminación de los alimentos es debido a la presencia de componentes tóxicos, siendo importante distinguir entre dos conceptos, contaminante alimentario y residuo, de manera que se definen:

- *Contaminante*: es toda sustancia que como consecuencia de las actividades humanas llega al Medio Ambiente y de forma directa o indirecta puede afectar a la salud de los seres humanos, al bienestar de los animales o incluso afectar a los recursos biológicos terrestres.
- *Residuo*: producto extraño (xenobiótico) que llega in vivo al organismo animal o vegetal y permaneciendo en sus tejidos forma parte de los productos alimenticios derivados de estos organismos, suponiendo un riesgo para la salud.

Se observa que el término contaminante es mucho más genérico que el de residuo, algunos de estos contaminantes son añadidos de forma voluntaria para eliminar plagas o infecciones.

Estos tóxicos pueden estar presentes en el organismo en una dosis alta (concentración perjudicial para el ser humano), o pueden estar en una dosis baja y acumularse en el organismo, ocasionando daños para la salud a medio o largo plazo. Estos tóxicos pueden

tener diversa procedencia:

- Constituyentes naturales de los alimentos. Ejemplos: aminos, inhibidores de enzimas, sustancias anticolinesterasas, cianógenos, antivitaminas, agentes quelantes como el ácido oxálico, estimulantes como el alcohol etílico, la cafeína, etc.
- Aditivos alimentarios. Los aditivos alimentarios llevan un código compuesto de una letra seguida de tres cifras. La primera cifra (centenas) hace referencia a la inclusión en grupos establecidos: 1- Colorantes, 2- Conservantes, 3- Antioxidantes y 4- Estabilizantes.
- Sustancias derivadas. Aparecen como consecuencia de reacciones de degradación de los alimentos. Ejemplos: peróxidos y radicales libres procedentes de la oxidación de lípidos, micotoxinas originadas por procesos metabólicos de mohos.
- Contaminantes químicos. Llegan al alimento durante las fases de producción, procesado, distribución y manipulación. Pueden ser: residuos de plaguicidas, compuestos derivados de procesos de calentamiento como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), contaminantes accidentales o ambientales, residuos de medicamentos veterinarios.

A continuación, se hace una descripción de los distintos tipos de contaminación en el desarrollo del individuo, en base a la etapa de su exposición.

2) Contaminación preconcepcional.

Incluso antes de nacer, el daño fetal puede ser resultado de la exposición previa a tóxicos de los progenitores. Estas exposiciones amenazan al feto de dos formas:

1. De forma directa provocan toxicidad sobre los órganos reproductivos de los cónyuges.
2. Pueden ser almacenados en el cuerpo y movilizarse durante el embarazo para

afectar el desarrollo fetal.

Ejemplos de este tipo de exposición por consumo de alimentos, son las intoxicaciones por el consumo de aceite de arroz contaminado de policlorobifenilos (PCBs) de mujeres ocurrido en Japón en 1968, donde los hijos de éstas, presentaban varios síntomas (signos dismórficos, manifestaciones cutáneas, disfunción hepática). Los PCBs pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo en el tejido adiposo y movilizarse durante el embarazo. Otro ejemplo, es el de mujeres que han sido tratadas de saturnismo durante la niñez. Durante el embarazo se moviliza el plomo que ha permanecido acumulado durante años en el hueso, pasando al feto provocando una intoxicación congénita (Iª Jornada de Salud y Medio Ambiente Cádiz, 2.002; Ruíz, 2.003).

2) Contaminación de la alimentación fetal

Las células fetales, tienen un rápido crecimiento lo que les hace especialmente vulnerables al efecto de multitud de tóxicos. La ruta de exposición alimentaria fetal es a través de la placenta. Son numerosas las sustancias que alcanzan al feto por esta vía: monóxido de carbono, hidrocarburos policíclicos aromáticos, etanol, plomo, mercurio, etc. La enfermedad congénita de Minamata es un ejemplo de la vulnerabilidad de la unidad fetoplacentaria por las exposiciones ambientales maternas a través del consumo de pescado contaminado por los vertidos de empresas. Y aunque las cantidades de mercurio no fueran suficientes para objetivar efectos tóxicos en las madres, en los descendientes de estas se apreció un aumento de las parálisis infantiles. Otras características incluyen: déficit visual, de atención, atrofia difusa cerebral, retraso mental y otros déficits cognitivos (Iª Jornada de Salud y Medio Ambiente Cádiz, 2.002; Ruíz, 2.003).

3) Contaminación de la alimentación del lactante

Por suerte, la alimentación de nuestros lactantes sigue siendo mucho más segura y

saludable, que las alternativas de alimentación con fórmulas artificiales que intentan sustituir lo insustituible. La contaminación por el desarrollo industrial insostenible, alcanza todos los ecosistemas del planeta, incluso a los más íntimos e inviolables, aquellos que nos vinculan con el resto de los mamíferos: la leche, tanto procedente de animales como materna. Los productos que podemos encontrar en la alimentación del lactante por sus características grasas son desde dioxinas, PCBs, disruptores endocrinos, hasta la presencia de metales.

4) Contaminación de la alimentación en la infancia y los adultos

La mayor fuente de exposición infantil a plaguicidas y otros contaminantes es a través de la dieta. Las repercusiones sobre la salud a través del consumo de alimentos contaminados pueden ser: agudas (aparecen inmediatamente después del contacto) ó crónicas (pueden aparecer años, incluso en generaciones posteriores). La exposición aguda aparece sobre todo en caso de intoxicaciones por contacto más o menos directo con las fuentes. Las consecuencias de salud pública para la humanidad pueden ser muy serias (Iª Jornada de Salud y Medio Ambiente Cádiz, 2.002):

- a) Susceptibilidad de la infancia: Los niños consumen más alimentos por Kg de peso que los adultos. Además tienen un ritmo de crecimiento más rápido lo que hace que alcancen concentraciones más elevadas de productos tóxicos. Su inmadurez anatómico-funcional contribuye a la disminución de la eliminación de estos productos. Además, muchos de estos productos son acumulativos lo que hace difícil su eliminación. Es necesario obtener estudios de consumo de contaminantes en la infancia y utilizar estándares basados en la salud de sectores poblacionales especialmente susceptibles como los niños.
- b) Efectos neurológicos: muchos insecticidas son neurotóxicos. Así los organofosforados y carbamatos son inhibidores de la acetilcolinesterasa. Otra familia de plaguicidas como piretroides, piretrinos y organoclorados también interfieren con la función nerviosa. Personas expuestas a dosis importantes de organofosforados,

padecen con el tiempo dolencias de tipo neurológico. Con estudios de animales, una dosis baja en las primeras etapas del desarrollo es capaz de provocar alteraciones permanentes en el número de receptores de neurotransmisores cerebrales e hiperactividad. Además el paso transplacentario, provoca disminución del peso del cerebro fetal. En niños con exposición crónica aparecen alteraciones de memoria, coordinación, polineuropatías, alteraciones de la visión.

- c) Efectos reproductivos: muchos plaguicidas, tienen una capacidad estrogénica, responsable de provocar alteraciones en el sistema reproductor masculino tanto postnatal (disminución del número de espermatozoides, disminución de la espermatogénesis, ...) como prenatal por exposición transplacentaria (disminución del peso testicular).
- d) Efectos inmunológicos. Provoca inhibición del sistema inmunológico, incrementando la susceptibilidad a agentes infecciosos, parásitos y a tumores.
- e) Efectos cancerígenos: los estudios epidemiológicos apuntan hacia una relación entre algunos plaguicidas organoclorados y el cáncer: leucemias, linfomas de Hodgkin, cáncer de pulmón, páncreas y mama.
- f) Contaminación por metales. Las vías de exposición a la población general en España, en grupos no profesionales, son las amalgamas dentales y sobre todo la exposición dietética a metilmercurio a través del pescado contaminado. La dosis tolerada por la Environment Protection Agency (EPA) de EEUU es de 0,1 μg /Kg de peso/ día de metilmercurio. Teniendo en cuenta que:
 - I. Los estándares están dirigidos a una población general fundamentalmente adulta.
 - II. El mayor consumo de los niños por Kg de peso.
 - III. El pescado es un elemento destacado de la dieta de nuestro país.
 - IV. La mayor vulnerabilidad infantil; creemos que muchos de

nuestros niños ingieren una cantidad superior a las recomendaciones de la EPA.

La exposición a plomo a través de la dieta se lleva a cabo fundamentalmente a través de los cereales. Representa el 38 % de la ingesta de plomo en Andalucía. En algunas regiones como Madrid es más elevado por los altos índices de contaminación atmosférica.

g) Compuestos orgánicos persistentes (COPs). Son los productos químicos más problemáticos a los que están expuestos los ecosistemas. Son extremadamente peligrosos por las siguientes características: toxicidad, persistencia, bioacumulación (en los tejidos grasos, con progresivo aumento y concentración en la cadena trófica de alimentos) y potencial de transporte a larga distancia (contaminando regiones lejanas de su punto de emisión). Son múltiples los COPs generados por la actividad sanitaria, aquí destacamos: dioxinas y furanos. La principal fuente de exposición es a través de la dieta. Constituyen un grupo de sustancias químicas producidas durante una variedad de procesos industriales. Las dioxinas y furanos son sustancias organocloradas, bioacumulativas y persistentes en el Medio Ambiente. Entre los efectos de las dioxinas y furanos destacan los cancerígenos, las alteraciones en el desarrollo fetal e infantil, las disrupciones hormonales y la disminución de la función reproductora. Los ciudadanos del Estado Español ingieren un promedio de dioxinas y furanos superior al recomendado por la OMS. Incluido en el grupo de los doce países socios del Convenio Internacional de Estocolmo sobre COPs, en donde se insta a su paulatina eliminación (Iª Jornada de Salud y Medio Ambiente Cádiz, 2.002).

1.III.2. Plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos y otros productos agrícolas (Mabres, 1999).

Bajo el término de plaguicidas se incluye una gran variedad de productos químicos que difieren considerablemente en cuanto a modo de acción, absorción por el organismo, metabolismo, eliminación y toxicidad para el ser humano.

La utilización de plaguicidas ofrece ventajas tan importantes para el rendimiento de los cultivos que hace que sea muy difícil prescindir de esta práctica tal y como está concebida hoy la agricultura. Sin embargo, no hay que olvidar que han de ser utilizadas adecuadamente para evitar su toxicidad tanto para los aplicadores de los productos en el campo, como para el Medio ambiente y los consumidores. Para que no representen riesgos para la salud deben utilizarse siguiendo los códigos de buenas prácticas agrícolas.

Con el objetivo de disminuir la presencia de residuos fitosanitarios en el olivar, surge el Reglamento Específico de Producción Integrada del Olivar, que regula las condiciones para la racionalización de los sistemas productivos oleícolas, basado en modelos sostenibles, que se fundamentan en la sustitución de agroquímicos contaminantes (fitosanitarios y fertilizantes), por tecnologías mucho más respetuosas con el Medio Ambiente. La producción debe basarse en la optimización del uso del medio productivo (suelo, disponibilidades del agua y radiación solar) y no en el empleo de factores externos de producción (P.I.O., 2002).

A su vez, la legislación vigente establece los Límites Máximos de Residuos (LMRs) permitidos para cada plaguicida en cada producto alimenticio. En España, el RD 280/1994 (y sus posteriores modificaciones) regula límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal, y en el caso de no existir para algunos plaguicidas en la UE, se legislan por la Comisión del Codex Alimentarius (BOE, 2.003).

Todo ello implica la creación de un laboratorio (o laboratorios) capaz de dar respuesta

a las exigencias legales para ofrecer productos con las máximas garantías sanitarias. Para realizar esta labor, se precisa agilidad y versatilidad en los equipos empleados en el análisis de las muestras recibidas, ya que se hace necesaria la conjunción de tiempo/resultados de modo óptimo, y dado que los valores límite de concentración y compuestos objeto de análisis están en continua revisión por parte de las administraciones, es preciso dotar a los laboratorios del personal y los equipos necesarios para abordar las distintas metodologías que aseguren la calidad de los resultados analíticos

1.III.2.1 Clasificación química de los plaguicidas.

Se ofrece a continuación, conforme se puede observar en la Tabla I.6, una de tantas posibles clasificaciones de plaguicidas, atendiendo a su uso y toxicidad (Ballesteros, 2007). En ella, lo que se ha pretendido es agrupar a los plaguicidas según sus características químicas y por tanto, los grupos de análisis que pueden establecerse en el momento de desarrollar los métodos analíticos (The British Crop Protection Council, 1.999).

Tabla I.6. Clasificación de los plaguicidas más importantes de acuerdo a su uso y su toxicidad

Grupo químico	Plaguicidas representativos	LD₅₀ (mg/kg)^a
Insecticidas		
Carbamatos	Aldicarb	0.9
	Aminocarb	< 51
	Bendiocarb	40 – 156
	Carbaril	500 – 850
	Carbofurano	8
	Metiocarb	135
	Oxamyl	5.4
	Pirimicarb	147
Propoxur	128	
Organoclorados	Aldrin	67
	Clordano	457 – 590
	Dieldrin	40 – 87
	DDT	113 – 118
	Dicofol	587 – 595
	Endosulfan	70
	Endosulfan sulfato	–
	Endrin	–
	Heptacloro	147 – 220
	Lindano (γ -HCH)	88 – 270
Metoxicloro	6,000	
Organofosforados	Azinfos-etil	12
	Azinfos-metil	9
	Clorpirifos	135 – 163
	Diazinon	300-400
	Diclorvos	50
	Dimetoato	290-325
	Fention	250
	Malation	1,375 – 2,800
	Paration etil	2
	Paration metil	6
	Forate	1.6 – 3.7
	Pirimifos-metil	2,050
Piretroideos sintéticos	Alletrina	585 – 1,100
	Bifentrina	54.5
	Bioalletrina	709 – 1,042
	Ciflurtrina	500
	L-Cihalotrina	114 – 166
	α -Cipermetrina	250 – 4,150
Fungicidas		
Benzimidazoles	Benomyl	> 10,000
	Carbendazim	> 15,000
	Tiabendazol	3,100
	Thiofanato-metil	6,640 – 7,500
Ditiocarbamatos	Mancozeb	> 5,000
	Maneb	6,750
	Metam-sodium	1,700 – 1,800
	Propineb	> 5,000
	Tiram	1,800
	Zineb	5,200
	Ziram	320
Organoclorados	Hexaclorobenzeno (HCB)	10,000

Tabla I.6. Continuación.

Grupo químico	Plaguicidas representativos	LD ₅₀ (mg/kg) ^a
Nematocidas		
Organofosforados	Fenamifos	6
	Fostiazato	–
Otros	1,2-Dibromoetano	146 – 420
	DCIP	503
Herbicidas		
Ácidos arilosialcanoicos	2,4-D	639 – 764
	2,4-DB	370 – 700
	MCPA	900 – 1,160
	MCPB	4,700
	Mecoprop (MCCP)	930 – 1,166
Benzonitrilos	Bromoxinil	190
	Diclobenil	4,460
Carbanilates and carbamates	Asulam	> 4,000
	Carbetamide	11,000
	Chlorpropham	5,000 – 7,500
	Propham	5,000
	Triallate	1,100
Fenilureas o ureas sustituidas	Clorotoluron	> 10,000
	Diuron	3,400
	Fenuron	6,400
	Isoproturon	1,826
	Linuron	1,500 – 4,000
	Siduron	> 7,500
Fosfonoaminoácidos	Glufosinato	1,620 – 2,000
	Glifosato	5,600
Tiocarbamatos	Butilato	> 3,500
	Cicloato	2,000 – 3,190
	EPTC	> 2,000
	Molinato	369 – 450
	Pebulato	1,120
Triazinas	Atrazina	1,869 – 3,080
	Desmetrina	1,390
	Metribuzina	2,000
	Propazine	> 7,000
	Simazina	> 5,000
	Terbutilazina	1,590 – >2,000
	Terbutrina	2,500
Reguladores del crecimiento de las plantas, desecantes y desfoliantes		
Azoles	Paclobutrazol	1,300 – 2,000
	Uniconazol	1,790 – 2,020
Derivados fenólicos	Pentaclorofenol (PCP)	210
Compuestos de amonio cuaternario	Cloromequat	807 – 966
	Diquat	231
	Paraquat	157

^a LD₅₀ para ratas (vía oral)

- Carbamatos (insecticidas, herbicidas)

Los carbamatos tienen un comportamiento toxicológico similar al de los compuestos organofosforados ya que también son inhibidores de colinesterasas, aunque en este caso la inhibición enzimática es reversible (Coldwell et al., 2003).

- N-metilcarbamatos: carbaril, promecarb.
Fenoxicarbamatos: fenoxicarb.

- Organoclorados (insecticidas, herbicidas, fungicidas)

El riesgo de la exposición a plaguicidas organoclorados se asocia fundamentalmente con la exposición a largo plazo, debido a su persistencia en el Medio Ambiente, acumulación en la grasa corporal (son liposolubles) y carcinogenicidad en animales de experimentación. Muchos de estos compuestos son potentes inhibidores de enzimas microsomales y pueden modificar el metabolismo de otras sustancias químicas (Dimitra et al., 2000).

Los procesos de biotransformación generan en muchos casos metabolitos tóxicos con capacidad de acumulación similar a la del compuesto original.

La legislación establece límites máximos de residuos para muchos plaguicidas organoclorados pero la gran mayoría de materias activas no están autorizadas por el estado para aplicaciones agrícolas (MAGRAMA), como son:

- Derivados del hexaclorociclopentadieno: aldrin, dieldrin, endrin, endosulfan.
- Derivados del 2,2-difeniletano: DDT, metoxiclor, dicofol
- Derivados del ciclohexano: lindano.
- Estructura química en forma de caja: declorane, clordecone

- Organofosforados (insecticidas)

Los plaguicidas organofosforados son los más utilizados en la agricultura debido a su escasa persistencia en el Medio Ambiente y a su gran actividad. Son potencialmente muy tóxicos para el hombre, pero los riesgos se asocian, sobre todo, con episodios de intoxicaciones agudas que cursan con la sintomatología colinérgica propia de la inhibición de colinesterasas. Algunos compuestos organofosforados producen además una neuropatía retardada por acción sobre la esterasa neurotóxica (Zambonin et al., 2002).

Por sus características fisicoquímicas se absorben en proporciones elevadas por todas las vías, incluida la oral. Se metabolizan ampliamente, generando compuestos activos que, a su vez, son biotransformados a metabolitos no tóxicos. Teniendo en cuenta su degradación medioambiental y sus aspectos cinéticos se comprende que la vigilancia de sus residuos sólo se lleve a cabo sobre productos de origen vegetal, como son:

- Ésteres fosfóricos: diclorvós, TEPP, glifosato, glufosinato.
- Ésteres tiofosfóricos: fenitrotión, metasistox, clorpirifos, dimetoato, diazinon, formotión, fenitrotión, fosmet, metidatión, metil-pirimifos, disulfotón.
- Ésteres ditiofosfóricos: malatión
- Amidas de ácido ortofosfórico: crutomato.
- Fosfonatos: triclorfón.

- Piretroides

En función de la posición del anillo de ciclopropano, se clasifican en:

- Conservan el anillo ciclopropano característico piretrinas naturales: permetrina, cipermetrina, deltametrina, fenpropatrin, lambda-cihalotrin.

- Han perdido el anillo ciclopropano: fenvalerato, fluvalinato, esfenvalerato.

Esta familia de compuesto se suele analizar por cromatografía de gases junto con los plaguicidas organoclorados y organofosforados mediante detectores selectivos o por MS (Ramesh, 1998). Pero también se pueden analizar mediante CLC/densitometría, o CLCMS (Irace-Guigand y Aaron, 2003).

- Fenoxiácidos (herbicidas). Los que son fuertemente ácidos reaccionan rápidamente con sustancias alcalinas y pueden perderse en el análisis. Por lo tanto, el material de vidrio, la lana de vidrio y el sulfato sódico deben acidificarse con sulfúrico previa a su utilización (Laganà et al., 2002). Entre ellos destacan el MCPA, y el Quizalofop.
- Derivados de la urea (herbicidas).

Se clasifican en: Diflubenzurón, clorfluazurón, flufenozurón, hexaflumurón, diurón, clortolurón, flazasulfurón (Ruberu et al., 2000).

- Triazinas (herbicidas): principalmente Simazina, terbutilazina, terbutrina; entre las cuales destaca la prohibición del uso de simazina y terbutilazina en el olivar (BOE, 1994, Carabias et al., 2000).
- Otros compuestos nitrogenados. Entre ellos seleccionamos:
 - Derivados de amonio cuaternario: Diquat y paracuat.
 - Compuestos piridínicos: Fluroxipir, tiazopir, diflufenican, norfluorazona, piriproxifen
 - Compuestos triazólicos: amitrol, difenoconazol.

I.III.3 Hidrocarburos policíclicos aromáticos

La familia de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) es un grupo de hidrocarburos que contienen en sus moléculas dos o más anillos aromáticos de 6 carbonos fusionados. La mayoría de los PAHs contienen habitualmente anillos de benceno fusionados, aunque hay que tener en cuenta la existencia de PAHs basados en estas estructuras que contienen grupos alquilo. Existen más de 100 grupos de PAHs diferentes. Los PAHs se consideran compuestos orgánicos persistentes (COPs), por lo que pueden permanecer en el Medio Ambiente durante largos periodos de tiempo sin alterar sus propiedades tóxicas. Las propiedades semivolátiles de los PAHs les otorga gran movilidad.

Como característica común presentan una baja solubilidad en agua, además de ser la mayoría de ellos lipofílicos. La solubilidad en agua decrece según aumenta su peso molecular y el tamaño de la molécula, con el consiguiente aumento del carácter lipofílico. La persistencia en el medio también aumenta con el tamaño (Tratado Greenpeace; Fetzer, 2.000).

Por su carácter lipofílico se pueden bioacumular y concentrar en sedimentos y suelos en una extensión que dependerá de su persistencia en cada medio. Está comprobado que la toxicidad aumenta al aumentar el peso molecular y el carácter lipofílico del compuesto.

I.III.2.1. Origen de los hidrocarburos policíclicos aromáticos

Existen una gran variedad de fuentes de estos hidrocarburos. Las principales fuentes antropogénicas de mayor contribución son los procesos industriales, la incineración y las plantas de generación eléctrica. Los combustibles fósiles también los contienen, se forman en la combustión incompleta del carbón, petróleo, gas y otras sustancias orgánicas (FAO).

El recorrido de los PAHs en el Medio Ambiente depende mucho de la forma y modo en que se incorporan. Pueden llegar a las aguas superficiales a través de la atmósfera y de

descargas o vertidos directos (Jeannot et al., 2000). También se detectan en aguas freáticas, como resultado de la migración directa de aguas superficiales contaminadas o como consecuencia de suelos contaminados. Los compuestos de mayor persistencia se acumulan en plantas, peces e invertebrados terrestres y acuáticos. Los mamíferos pueden absorber los PAHs por inhalación, contacto dérmico, o en menor frecuencia por ingestión. Las plantas pueden absorberlos a través de las raíces en suelos contaminados. Los PAHs de menor peso molecular se absorben más rápidamente que los de mayor peso molecular. En sistemas acuáticos, los PAHs crecen en toxicidad según incrementa su peso molecular. Además, la bioacumulación tiende a ser rápida. La adsorción de PAHs en suelo es directamente proporcional al contenido de materia orgánica y al mayor peso molecular del PAHs e inversamente proporcional al tamaño de las partículas del suelo. Los PAHs con menor peso molecular se volatilizan con mayor facilidad (Tratado Greenpeace; Fetzer, 2.000).

1.III.2.2. Toxicidad de los hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los principales impactos de los PAHs en la salud humana se centran en sus propiedades genotóxicas, es decir causan daños al material genético (teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas). Los más potentes carcinógenos son el benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno y el dibenzo(a,h)antraceno. Muchos PAHs son carcinógenos, producen tumores en el tejido epitelial en “prácticamente todos los animales testados” (Eisler, 1.987). Otros efectos en organismos terrestres están poco probados, pero pueden incluir efectos adversos en la reproducción, desarrollo e inmunidad. Según IARC (Agencia Internacional De Investigación Del Cancer), dependiente de la OMS (Organización Mundial de la Salud), que cataloga las sustancias según el conocimiento de su carcinogenicidad, el fuel oil residual está catalogado como posible carcinógeno humano (2B), así como los diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son clasificados en función de la probabilidad de producir cáncer en el hombre, tal y como se detalla en la Tabla I.7 (FAO):

Tabla I.7. Hidrocarburos policíclicos aromáticos y probabilidad de producir cáncer en el ser humano.

Hidrocarburos Policíclicos Aromático	TEFs ^a	Evaluación de Carcinogénesis	
		IARC ^b	U.S. EPA ^c
Benzo(a)pireno	1.0	2A	B2
Benzo(e)pireno	-	3	-
Benzo(a)antraceno	0.1	2A	B2
Benzo(b)fluoranteno	0.1	2B	B2
Benzo(j)fluoranteno	0.1	2B	-
Benzo(k)fluoranteno	0.1	2B	B2
Criseno	0.01	3	B2
Ciclopenta(c,d)pireno	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	1.0	2A	B2
Dibenzo(a,e)fluoranteno	-	-	-
Dibenzo(a,e)pireno	-	-	-
Dibenzo(a,h)pireno	1.0	2B	-
Dibenzo(a,i)pireno	0.1	2B	-
Dibenzo(a,l)pireno	-	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0.1	2B	B2
Benzo(g,h,i)perileno	-	3	D

^aExpresado como TEFs (toxicity equivalence factors) (McClure y Schoeny, 1995).

^bIARC: International Agency for Research on Cancer. Grupos de evaluación: 1: cancerígeno para los humanos; 2A: probablemente cancerígeno para los humanos; 2B: posiblemente cancerígeno para los humanos; 3: no clasificado como cancerígeno para los humanos; 4: probablemente no cancerígeno para los humanos (IARC, 1983; IARC, 1987).

^cU.S. EPA: United States Environmental Protection Agency. Grupos de evaluación: A: cancerígeno para los humanos; B1: probablemente cancerígeno para los humanos (basado en el límite de evidencia cancerígena en humanos y suficiente evidencia de cáncer en animales); B2: probablemente cancerígeno para los humanos; C: posiblemente cancerígeno para los humanos; D: no clasificado como cancerígeno para los humanos; E: evidencia de no cancerígeno para los seres humanos (IRIS, 1999).

Estos hidrocarburos, pueden encontrarse en el Medio Ambiente y depositarse en los alimentos. Además, pueden originarse como consecuencia de ciertos tratamientos a los que se somete a los alimentos, como por ejemplo el asado realizado en parrilla utilizando como combustible la madera o el carbón. Así, durante el asado por ejemplo de las carnes a la brasa, al quemarse la grasa que contienen, pueden producirse estos hidrocarburos, que son adsorbidos por la carne a partir del humo generado. La concentración de dichos hidrocarburos depende de (Talanta,51, 2000):

- El contenido en grasa del alimento
- El proceso de asado (contacto de la grasa con el foco calorífico)
- La fuente de calor (cantidad de humo que se forme). Debe evitarse que el humo entre en contacto directo con el alimento.

De todos ellos, benzo(a)pyreno (BP) es el más conocido de los PHAs carcinógenos, y ha sido usado como un indicador de la presencia de PHAs en agua y alimentos. PHAs se forman durante una combustión incompleta de material orgánico, de manera que la polución ambiental es una fuente de contaminación de las plantas. Así mismo los procesos tecnológicos y culinarios pueden causar elevados niveles de PHAs en los alimentos (Vázquez et al., 2000).

Se ha encontrado presencia de PHAs en diferentes grasas y aceites, que podrían estar contaminados a partir de la contaminación ambiental y/o procesos de refinado.

La alta producción y consumo de aceites en España y otros países Mediterráneos demanda un control de PHAs en este tipo de productos. El principal problema asociado con la determinación de PHAs en matrices complejas como son los aceites vegetales son los bajos niveles de analito y la presencia de muy diversos interferentes (Vázquez et al., 2000).

I.IV. Aspectos legales. Reglamentación

El Aceite de Oliva, debido a sus características de bondad y calidad como producto agroalimentario lo hacen a su vez un producto con diferentes y complicadas implicaciones tecnológicas, sociales, comerciales y económicas, de ahí que debamos dejar claro el marco legal en el cual se encuentra delimitado.

Por ello, para una buena información e identificación, las reglamentaciones regionales, nacionales e internacionales establecen diferentes requisitos que, en parte, se manifiestan en el etiquetado del producto, aunque de forma esquematizada y con expresiones que hay que tomar en un sentido muy estricto y con conocimiento de las normas (Civantos, 1998).

En cualquier caso, y dado el rápido avance de la tecnología productiva y analítica, el aumento de las exigencias de un mercado cada vez más competitivo, continuamente siguen apareciendo modificaciones a normas y reglamentos aplicables.

En un intento de resumir y organizar los aspectos legales que afectan al aceite de oliva en lo que a calidad, pureza y contaminantes se refiere, se procede a detallar las diferentes normas, reglamentos, leyes y recomendaciones que desde las distintas administraciones y organismos se han establecido tanto específicas como genéricas de los productos alimentarios (Madrid et al., 1997; MAGRAMA; DOUE, 2013).

I.V. Características físico-químicas del aceite de oliva

I.V.1. Criterios de Calidad

De las aceitunas sanas y maduras sometidas a un proceso correcto e inmediato a la recolección, de elaboración (molienda, batido y prensado o centrifugado), se obtiene el aceite contenido en el fruto, sin apenas variación ni modificación (Civantos et al., 2008).

El aceite contenido en el fruto es el prototipo de calidad. Cuando la aceituna se deteriora en el campo por plagas, enfermedades, recolección inadecuada, caída al suelo, o se almacena antes de la elaboración, este proceso se realiza sin la suficiente limpieza o se conduce de forma defectuosa, el aceite adquiere malos olores y sabores y pierde una fracción de la calidad.

En otro sentido, existen diversos tipos de Aceites de Oliva Vírgenes. El aceite contenido en aceitunas sanas y maduras de la variedad Picual se diferencia en el paladar del obtenido de la Carrasqueña, de la Morisca, de la Cornicabra, o de la Arbequina, etc. La variedad es determinante de unos criterios diferenciales de calidad: calidad intrínseca. Dentro de los aceites de una variedad se conocen parejas que dan diferentes tipos de aceites; ciertas zonas de sierra tienen fama de dar aceites de buen buqué. Es otro aspecto de la calidad intrínseca debido a características del suelo y del clima difíciles de valorar mediante parámetros prefijados. Así pueden gustar más los aceites de un tipo que de otro, pero ambos pueden ser excelentes si al extraerlos del fruto no se les ha alterado o comunicado alguna propiedad extraña.

Los criterios objetivos de calidad se miden por métodos de laboratorio y se refieren a la determinación de parámetros que ponen de manifiesto los deterioros habidos en el aceite o la existencia de causas próximas que los van a producir. Entre estos criterios que recogen la normativa de la Comisión Europea se encuentran: Acidez libre, Índice de peróxidos, Absorbancia a la radiación ultravioleta (K-232 y K-270), Disolventes halogenados, Humedad y materias volátiles, Impurezas insolubles en éter de petróleo. Caracteres organolépticos.

I.V.2. Criterios de Pureza

Se han establecido una serie de pruebas que permiten conocer si un aceite de oliva es virgen, de oliva, de orujo o contiene algún aceite de distinta clase o naturaleza. Entre los establecidos por las distintas normas destacan los siguientes:

I.V.2.1 Basados en los componentes de la fracción insaponificable

La fracción insaponificable es muy pequeña pero característica del aceite de oliva. El estudio de algunos componentes permite conocer posibles adulteraciones con otros aceites de distinta naturaleza.

En primer lugar, es preciso saponificar la materia grasa, a la que se añade un patrón interno con una solución etanólica de hidróxido potásico. Después se extrae el insaponificable con éter etílico. Entre estas determinaciones se encuentran: Contenido de ceras, Eritrodiol y Uvaol, Esteroles, Estigmastadienos.

I.V.2.2 Basados en componentes de la fracción saponificable

Los aceites vegetales ofrecen diferentes composiciones de ácidos grasos, pudiéndose identificar adiciones de aceites de otra naturaleza cuando los contenidos de estos quedan fuera de ciertos intervalos.

Los aceites de palmiste y de coco son ricos en ácido láurico. Destacan por el contenido de ácido palmítico, los de palma y los sebos animales, aunque algunos aceites de oliva de países de latitudes muy al sur (Túnez) pueden mostrar valores elevados. El ácido esteárico es elevado en las grasas animales. El ácido linoleico en los aceites de soja, girasol, maíz, cártamo, pepita de uva y sésamo. El ácido linoleico alcanza valores más altos en los aceites de lino, soja y colza. El ácido oleico se presenta con mayor contenido en los aceites de oliva, de orujo de aceituna, cacahuete y de sésamo.

Entre estas determinaciones destacan: composición de ácidos grasos, ácidos grasos saturados en posición beta de los triglicéridos, ECN 42, isómeros trans, trilinoleína.

En la Tabla I.8 se presentan los parámetros legislados vigentes en la Comisión Europea, de estas determinaciones de calidad y pureza de los aceites de oliva y orujo de aceituna.

Tabla I.8. Parámetros legislados vigentes en la Comisión Europea, de estas determinaciones de calidad y pureza de los aceites de oliva y orujo de aceituna.

1.12.2016

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

L 326/3

ANEXO

*ANEXO I

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

Características de calidad

Categoría	Acidez (%) (*)	Índice de peróxido mEq O ₂ /kg (*)	K ₅₃₂ (*)	K ₂₆₈ o K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica		Ésteres efílicos de los ácidos grasos mg/kg (*)
						Mediana del defecto (Md) (*)	Mediana del frutado (Mf) (*)	
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0	≤ 35
2. Aceite de oliva virgen	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0	—
3. Aceite de oliva lampante	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (!)	—	—
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	—	≤ 1,25	≤ 0,16	—	—	—
5. Aceite de oliva compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes	≤ 1,0	≤ 15	—	≤ 1,15	≤ 0,15	—	—	—
6. Aceite de orujo de oliva crudo	—	—	—	—	—	—	—	—
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—	—
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 1,0	≤ 15	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—	—

(!) La mediana del defecto puede ser inferior o igual a 3,5 cuando la mediana del frutado es igual a 0.

Características de pureza

Categoría	Contenido de ácidos grasos (1)						Total de isómeros translinoleicos + translinoléuticos (%)	Total de isómeros translinoleicos + translinoléuticos (%)	Estigmas-tadienos mg/kg (2)	Diferencia: ECN42 (HPLC) y ECN42 (cálculo teórico)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)
	Mirístico (%)	Linoléico (%)	Araquídico (%)	Eicosenoico (%)	Behénico (%)	Lignocérico (%)					
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico ≤ 14 % ≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico > 14 %
2. Aceite de oliva virgen	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico ≤ 14 % ≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico > 14 %
3. Aceite de oliva lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico ≤ 14 % ≤ 1,1 si el % total de ácido palmítico > 14 %
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,3	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico ≤ 14 % ≤ 1,1 si el % total de ácido palmítico > 14 %
5. Aceite de oliva compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,3	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico ≤ 14 % ≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico > 14 %
6. Aceite de orujo de oliva crudo	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,6	≤ 1,4
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,5	≤ 1,4
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,5	≤ 1,2

Categoría	Composición de los esteroides						Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodíol y uvaol (%) (**)	Ceras mg/kg (***)
	Coolesterol (%)	Brasicasterol (%)	Campesterol (%) ⁽¹⁾	Estigmasterol (%)	β -sitosterol aparente (%) ⁽¹⁾	Delta-7-estigmasterol (%) ⁽¹⁾			
1. Aceite de oliva virgen extra	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Aceite de oliva virgen	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Aceite de oliva lampante	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$ ⁽²⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ ⁽²⁾
4. Aceite de oliva refinado	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Aceite de oliva compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Aceite de orujo de oliva crudo	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 2\ 500$	$> 4,5$ ⁽⁶⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ ⁽⁶⁾
7. Aceite de orujo de oliva refinado	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 800$	$> 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Aceite de orujo de oliva	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 600$	$> 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

(1) Contenido de otros ácidos grasos (%): palmítico: 7,50-20,00; palmítico: 0,30-3,50; heptadecanoico: $\leq 0,40$; heptadecanoico: $\leq 0,60$; estearico: 0,50-5,00; oleico: 55,00-83,00; linoleico: 2,50-21,00.

(2) Total de isómeros que han podido (o no han podido) separarse con columna capilar.

(3) Véase el apéndice del presente anexo.

(4) β -sitosterol aparente: delta-5,23-estigmastadienol + cleroesterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

(5) Se considera que los aceites con un contenido de ceras entre 300 mg/kg y 350 mg/kg son aceites de oliva lampantes si el contenido total de alcoholes alifáticos es inferior o igual a 350 mg/kg o si el contenido de eritrodíol y uvaol es inferior o igual al 3,5 %.

(6) Los aceites con un contenido de ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva crudo si el contenido de alcoholes alifáticos totales es superior a 350 mg/kg y si el contenido de eritrodíol y uvaol es superior al 3,5 %.

Notas:

- Los resultados de los análisis deben expresarse indicando el mismo número de decimales que el previsto para cada característica. La última cifra expresada debe redondearse hacia arriba si la cifra siguiente es superior a 4.
- Es suficiente con que una sola de las características no se ajuste a los valores indicados para que el aceite cambie de categoría o se declare no conforme en cuanto a su pureza, a efectos del presente Reglamento.
- Las características indicadas con un asterisco (*), relativas a la calidad del aceite, implican lo siguiente: — en el caso del aceite de oliva lampante, pueden no respetarse simultáneamente los dos límites correspondientes; — en el caso de los aceites de oliva vírgenes, el incumplimiento de al menos uno de estos límites supondrá un cambio de categoría, aunque seguirán clasificándose en una de las categorías de los aceites de oliva vírgenes.
- Las características indicadas con dos asteriscos (**) implican que, en el caso de todos los aceites de orujo de oliva, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes.

I.V.3. Aspectos legales del aceite de oliva

- Real Decreto 3000/1979, de 7 de diciembre, sobre regulación de procesos industriales en el sector del aceite de oliva. (BOE nº 16 de 18 de enero de 1980).
- Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de aceites vegetales comestibles. (BOE nº 44 de 21 de febrero y corrección de errores en BOE nº 117 de 17 de mayo).
- Orden de 12 de diciembre de 1984 sobre entrega de aceite de oliva virgen por las almazaras a sus cosecheros para autoconsumo. (BOE nº 5 de 5 de enero de 1985).
- Real Decreto 259/1985, de 20 de febrero, por el que se complementa la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles, con la aplicación de la determinación de eritrodíol en los aceites de oliva. (BOE nº 56 de 6 de marzo).
- Orden de 13 de enero de 1986 por la que se aprueba la lista positiva de aditivos y coadyuvantes tecnológicos para uso en la elaboración de aceites vegetales comestibles (BOE núm. 19 de 22 de enero).
- Real Decreto 2551/1986, de 21 de noviembre, por el que se regula la elaboración de "aceite de orujo refinado y de oliva". (BOE nº. 302 de 18 de diciembre) Orden de 26 de enero de 1989 por la que se aprueba la Norma de Calidad para los Aceites y Grasas Calentados. (BOE nº 26 de 31 de enero).
- 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. (DOL nº 248 de 5 de septiembre).
- Reglamento (CEE 2081/92) sobre la protección de las indicaciones geográficas y las

denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios y posteriores modificaciones.

- Reglamento (CE) nº 2815/98 de la Comisión, de 22 de diciembre de 1998, relativo a las normas comerciales del aceite de oliva (DO L nº 349 de 24 de diciembre).
- Reglamento (CE) nº 379/1999 de la Comisión de 19 de febrero de 1999 por el que se modifica el Reglamento (CEE) no 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento (CE) nº 455/2001 de la Comisión de 6 de marzo de 2001 por el que se modifica el Reglamento (CEE) no 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento CE 1513/2001 del Consejo de 23 de Julio de 2.001 que modifica el Reglamento nº 136/66/CEE y el Reglamento CE nº 1638/98 en lo que respecta a la prolongación del régimen de ayuda y la estrategia de la calidad para el aceite de oliva.
- Reglamento 796/2002 que modifica el RCEE 2568/91 sobre el aceite de oliva y orujo de oliva y sus métodos de análisis.
- Reglamento (CE) nº 1019/2002 de la Comisión, de 13 de junio de 2002, sobre las normas de comercialización del aceite de oliva (DO L nº 15 de 14 de junio).
- Reglamento CE nº 1964/2002 por el que se modifica el reglamento nº 1019/2002 (RCE 1964/2002 de 4 de noviembre).
- Reglamento CE nº 692/2003 por el que se modifica el reglamento CE nº 2081/92 reglamento (CE) nº 1176/2003 de la Comisión de 1 de julio de 2003 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 1019/2002, sobre las normas de comercialización del aceite de oliva.

- Resolución de 27 de octubre de 2.003 de la Secretaría General de Agricultura y Pesca sobre buenas prácticas en el sector oleícola de Andalucía para mejorar la calidad de sus producciones.
- Reglamento CEE nº 1989/2003 de la Comisión de 6 de noviembre de 2.003 que modifica el Reglamento CEE nº 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Norma COI COI/T.15/NC nº3/Rev. 1 de 5 de diciembre de 2.003 Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva.
- Reglamento CEE nº 702/2007 de la Comisión de 21 de junio de 2.007 que modifica el Reglamento CEE nº 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento (CE) nº 1183/2008 de la Comisión de 28 de noviembre de 2008 que modifica el Reglamento (CE) nº 1019/2002 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva.
- Reglamento (CE) nº 640/2008 de la Comisión de 4 de julio de 2008 que modifica el Reglamento (CE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- 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 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento de ejecución (UE) nº 29/2012 de la Comisión de 13 de enero de 2012 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva.
- COI/T.15/NC nº 3/Rev. 7 de noviembre de 2012. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva.

- Real Decreto 176/2013, de 8 de marzo de 2013, por el que se derogan total o parcialmente determinadas reglamentaciones técnico-sanitarias y normas de calidad referidas a productos alimenticios.
- Reglamento de ejecución (UE) n° 299/2013 de la Comisión de 26 de marzo de 2013 que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento de ejecución (UE) n° 1335/2013 de la Comisión de 13 de diciembre de 2013 por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) n° 29/2012, sobre las normas de comercialización del aceite de oliva.
- Reglamento de ejecución (UE) n° 1348/2013 de la Comisión de 16 de diciembre de 2013 que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento (UE) n° 1308/2013 del Parlamento Europeo y de la Comisión de 17 de diciembre de 2013 por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n° 922/72, (CEE) n° 234/79, (CE) n° 1037/2001 y (CE) n° 1234/2007.
- Reglamento (UE) n° 696/2014 de la Comisión de 24 de junio de 2014 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006 en lo que respecta al contenido máximo de ácido erúico en aceites y grasas vegetales y en alimentos que contienen aceites y grasas vegetales.
- Real Decreto 640/2015, de 10 de julio, por el que se aprueba la lista de coadyuvantes tecnológicos autorizados para la elaboración de aceites vegetales comestibles y sus criterios de identidad y pureza, y por el que se modifica el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles.

- Reglamento Delegado (UE) 2015/1830 de la Comisión de 8 de julio de 2015 por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1833 de la Comisión, de 12 de octubre de 2015, que modifica el Reglamento (CEE) 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento Delegado (UE) 2016/1226 de la Comisión de 4 de mayo de 2016 que modifica el anexo IX del Reglamento (UE) n° 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que atañe a las menciones reservadas facultativas para el aceite de oliva.
- Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1227 de la Comisión de 27 de julio de 2016 que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1784 de la Comisión de 30 de septiembre de 2016 que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento Delegado (UE) 2016/2095 de la Comisión de 26 de septiembre de 2016 que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

I.V.4. Aspectos legales sobre contaminantes y residuos

- Directiva 90/642/CEE del consejo, de 27 de noviembre de 1990, relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos plaguicidas en determinados productos de origen vegetal, incluidas la frutas y hortalizas (DO L nº 350 de 14 de diciembre). Modificada por la Directiva (CE) 2000/24/CE (DO L nº 107 de 4 de mayo), por la Directiva 2000/42/CE (DO L nº 158 de 30 de junio), por la Directiva 2000/48/CE (D.O. L nº 197 de 3 de agosto, Directiva 2000/57/CE (DO L nº 244 de 29 de septiembre), por la Directiva 2000/58/CE (DO L nº 244 de 29 de septiembre) y por la Directiva 2000/82/CE (DO L nº 3 de 6 de enero de 2001).
- Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios (DO L nº 230, 1-32).
- Parte del producto a la que se aplican los límites máximos del codex para residuos y que se analiza. Cac/gl 41-1993.Codex Alimentarius.
- Real Decreto 280/1994 de 18 de febrero, por el que se establecen los límites máximos de residuos plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal (BOE nº 58 de 9 de marzo).
- Reglamento (CE) nº 645/2000 de la Comisión, de 28 de marzo de 2000, por el que se establecen las disposiciones necesarias para la correcta aplicación de determinadas disposiciones del artículo 7 de la Directiva 86/362/CEE del Consejo y del artículo 4 de la Directiva 90/642/CEE de Consejo relativas, respectivamente, a las disposiciones sobre el control de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los cereales y en los productos de origen vegetal, incluidas las frutas y hortalizas, respectivamente (DO L nº 107 de 4 de mayo).
- Reglamento CE nº 466/2001 de la Comisión de 8 de marzo de 2.001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

- Orden del 25 julio 2001 por la que se establecen los límites de determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos en aceite de orujo de oliva (BOE nº 178 del 26 de julio de 2001)
- Reglamento (CE) nº 2375/2001 del Consejo, de 29 de noviembre de 2001, que modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 de la Comisión por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.
- CE nº 63/2002 (métodos de muestreo en el control de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal).
- Directiva 2002/69/CE de la Comisión, de 26 de julio de 2002, por la que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial de las dioxinas y la determinación de PCB similares a las dioxinas en los productos alimenticios (DO L nº 209 de 06 de agosto de 2002).
- B.O.J.A: Reglamento específico de Producción integrada del olivar (nº 88, de 27.7.2002).
- CE nº 2076/2002 (retirada autorización de la comercialización de algunos productos fitosanitarios. Modifica a la anterior).
- Real Decreto 290/2003 (métodos de muestreo en el control de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal).
- Reglamento CE nº 2174/2003 de la Comisión de 12 de diciembre de 2003 que modifica el reglamento ce 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas.
- Orden Pre/3673/2004 de 11 de noviembre, por la que se modifican los Anexos II de los Reales Decretos 280/1994 y 569/1990 por los que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal y animal.

- Reglamento CE nº 208/2005 de la Comisión de 4 de febrero de 2005 por el que se modifica el Reglamento CE 466/2001 en lo relativo a los hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- Directiva 2005/10/CE de la Comisión de 4 de febrero de 2005 por la que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de benzo(a)pireno en los productos alimenticios.
- Recomendación de la Comisión de 4 de febrero de 2005 relativa a las investigaciones complementarias sobre los niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos en determinados alimentos.
- Reglamento CE nº 396/2005 del parlamento europeo y del consejo de 23 de Febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.
- Real Decreto 1089/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de benzo(a)pireno en los productos alimenticios.
- Reglamento (ce) nº 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.
- Norma general del codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos codex stan 193-1995 (rev.3-2007). CODEX ALIMENTARIUS. www.codexalimentarius.org
- Reglamento (CE) NO 834/2007 del Consejo de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) no

2092/91.

- Reglamento (UE) N o 835/2011 de la Comisión de 19 de agosto de 2011 que modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios.
- Reglamento (UE) No 696/2014 de la Comisión de 24 de junio de 2014 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006 en lo que respecta al contenido máximo de ácido erúxico en aceites y grasas vegetales y en alimentos que contienen aceites y grasas vegetales.

I.V.5. Otros aspectos legales de interés alimentario

I.V.5.1. Normas de higiene de los alimentos/manipulación/control oficial

- Real Decreto 1945/1983, de 22 de junio, por el que se regulan las infracciones y sanciones en materia de defensa del consumidor y de la producción agro-alimentaria. (BOE n° 168 de 15 de julio y correcciones de errores en BOE n° 197 de 18 de agosto, n° 250 de 10 de octubre y n° 259 de 20 de octubre).
- Directiva 85/591/CEE del Consejo, de 20 de diciembre de 1985, referente a la introducción de modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control de los productos destinados a la alimentación humana. (DO L n°. 372 de 31 de diciembre).
- Real Decreto 2483/1986, de 14 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria sobre condiciones generales de transporte terrestre de alimentos y productos alimentarios a temperatura regulada. (BOE n° 291 de 5 de diciembre).

- Directiva 89/397/CEE del Consejo, de 14 de junio de 1989, relativa al control oficial de los productos alimenticios. (DO L nº 186 de 30 de junio).
- Real Decreto 50/1993, de 15 de enero, por el que se regula el control oficial de los productos alimenticios. (BOE nº 36 de 11 de febrero).
- Orden de 12 de mayo de 1993 por la que se establece el certificado sanitario oficial para la exportación de productos alimenticios. (BOE nº 121 de 21 de mayo).
- Directiva 93/43/CEE del Consejo, de 14 de junio de 1993, relativa a la higiene de los productos alimenticios. (DO L nº 175 de 19 de julio y corrección de errores en DO L nº 176 de 20 de julio).
- Directiva 93/99/CEE del Consejo, de 29 de octubre de 1993, sobre medidas adicionales relativas al control oficial de los productos alimenticios. (DO L nº 290 de 24 de noviembre).
- Real Decreto 1397/1995, de 4 de agosto, por el que se aprueban medidas adicionales sobre el control oficial de productos alimenticios. (BOE nº 246 de 14 de octubre).
- Real Decreto 2207/1995, de 28 de diciembre, por el que se establece las normas de higiene relativas a los productos alimenticios. (BOE nº 50 de 27 de febrero).
- Real Decreto 1910/2000, de 24 de noviembre, por el que se crea la Comisión Interministerial de Seguridad Alimentaria. (BOE nº 283 de 25 de noviembre).
- Real Decreto 202/2000, de 11 de febrero, por el que se establece la norma relativa a los manipuladores de alimentos (BOE nº 48 de 25 de febrero de 2000).
- Real Decreto 189/2001, por el que se regulan los planes de formación de los

manipuladotes de alimentos.

- Real Decreto 348/2001, de 4 de abril, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes (BOE nº 82 de 5 de abril).
- LEY 11/2001, de 5 de julio, por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria. (BOE nº 161 de 6 de julio de 2001).
- Reglamento (CE) no 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria (DO L nº 31 de 1 de febrero 2002).
- Real decreto 709/2002, de 19 de julio, por el que se aprueba el Estatuto de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria. (BOE nº 178 de 26 de julio de 2002).
- Recomendación de 10 de enero de 2003 de la Comisión 2003/10/CE relativo a un programa coordinado de control oficial de productos alimenticios para el año 2.003.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- Real Decreto 865/2003 de 4 de Julio por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis.
- Reglamento (CE) No 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente.
- Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de

la producción y comercialización de los productos alimenticios.

- Ley 33/2011, de 4 de octubre, General de Salud Pública (BOE nº 240 del 5 de octubre de 2011).

I.V.5.2 Envasado

- Real Decreto 723/1988, de 24 de junio, por el que se aprueba la Norma General para el control del contenido efectivo de los productos alimenticios envasados. (BOE nº 163 de 8 de julio y corrección de errores en BOE nº. 191 de 10 de agosto).
- Real Decreto 888/1988, de 29 de julio, por el que se aprueba la norma general sobre recipientes que contengan productos alimenticios frescos, de carácter perecedero, no envasados o envueltos. (BOE nº 187 de 5 de agosto).
- Real Decreto 1472/1989, de 1 de diciembre, por el que se regula las gamas de cantidades nominales y de capacidades nominales para determinados productos envasados. (BOE nº. 297 de 12 de diciembre y corrección de errores en BOE nº 101 de 27 de abril de 1990).
- Real Decreto 782/1998, de 30 de abril, por el que se aprueba el Reglamento para el desarrollo y ejecución de la Ley 11/1997, de envases y residuos de envases (BOE nº 104 de 11 de mayo).
- Real Decreto 1801/2008, de 3 de noviembre, por el que se establecen normas relativas a las cantidades nominales para productos envasados y al control de su contenido efectivo.

I.V.5.3. Etiquetado

- Directiva 89/396/CEE del Consejo, de 14 de junio de 1989, relativa a las menciones o

marcas que permitan identificar el lote al que pertenece un producto alimenticio. (DOL nº 186 de 30 de junio).

- Reglamento (CEE) nº 2092/91 del Consejo, de 24 de junio de 1991, sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. (DO L nº 198 de 22 de julio).
- Real Decreto 1808/1991, de 13 de diciembre, por el que regula las menciones o marcas que permiten identificar el lote al que pertenece un producto alimenticio. (BOE nº 308 de 25 de diciembre)
- Real Decreto 930/1992, de 17 de julio, por el que se aprueba la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios. (BOE nº. 187 de 5 de agosto).
- Reglamento (CE) nº 1139/98 del Consejo, de 26 de mayo de 1998, relativo a la indicación obligatoria, en el etiquetado de determinados productos alimenticios fabricados a partir de organismos modificados genéticamente, de información distinta de la prevista en la Directiva 79/112/CEE. (DOL nº. 159 de 3 de junio). Modificado por el Reglamento (CE) nº 49/2000 de la Comisión (DOL 6, de 11 de enero).
- Reglamento (CE) nº 50/2000 de la Comisión, de 10 de enero de 2000 relativo al etiquetado de los productos alimenticios e ingredientes alimentarios que contienen aditivos y aromas modificados genéticamente o producidos a partir de organismos modificados genéticamente.
- Directiva 1999/10/CE de la Comisión, de 8 de marzo de 1999, por la que se establecen excepciones a las disposiciones del artículo 7 de la Directiva 79/112/CEE del Consejo en lo relativo al etiquetado de los productos alimenticios. (DO L nº 69 de 16 de marzo).
- Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de

etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. (BOE nº 202 de 24 de agosto).

- Directiva 2000/13/CE del parlamento europeo y del consejo, de 20 de marzo de 2000, relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios (DOL 109 de 6 de mayo).
- Reglamento CEE 1829/2003 de 22 de septiembre del Parlamento Europeo y de la Comisión sobre alimentos y piensos modificados genéticamente.
- Reglamento CE nº 1830/2003 del parlamento europeo y del consejo relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente.
- Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio.
- Reglamento (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.
- Real Decreto 1245/2008, de 18 de julio, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio.
- Reglamento (UE) N o 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 1924/2006 y (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) nº

608/2004 de la Comisión.

I.V.5.4. Material en contacto con los alimentos

- Real Decreto 1125/1982, de 30 de abril, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de materiales poliméricos en relación con los productos alimenticios y alimentarios. (BOE nº 133 de 4 de junio).
- Resolución de 4 de noviembre de 1982, de la Subsecretaría para la Sanidad, por la que se aprueban la lista positiva de sustancias para fabricación de compuestos macromoleculares, la lista de migraciones máximas en pruebas de cesión, las condiciones de pureza para las materias colorantes empleadas en los mismos productos, y la lista de los materiales poliméricos adecuados para la fabricación de envases y otros utensilios que puedan estar en contacto con los productos alimenticios. (BOE nº 282 de 24 de noviembre y corrección de errores en anexo núm. 311 de 28 de diciembre).
- Real Decreto 2814/1983, de 13 de octubre, por el que se prohíbe la utilización de materiales poliméricos recuperados o regenerados que hayan de estar en contacto con los alimentos. (BOE nº 270 de 11 de noviembre).
- Real Decreto 1425/1988, de 25 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de materiales plásticos destinados a estar en contacto con productos alimenticios y alimentarios. (BOE nº 288 de 1 de diciembre).
- Real Decreto 397/1990, de 16 de marzo, por el que se aprueban las condiciones generales de los materiales, para uso alimentario, distintos de los poliméricos. (BOE

nº 74 de 27 de marzo).

- Real Decreto 1043/1990, de 27 de julio, por el que se aprueba la Instrucción Técnico-Sanitaria sobre objetos de cerámica para uso alimentario. (BOE nº 191 de 10 de agosto y corrección de errores en BOE núm. 256 de 25 de octubre).
- Real Decreto 1413/1994, de 25 de junio, por el que se aprueban las Normas Técnico-Sanitarias sobre los materiales y objetos de película de celulosa regenerada para uso alimentario. (BOE nº. 190 de 10 de agosto).
- Real Decreto 2207/1994, de 16 de noviembre, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. (BOE nº 15 de 18 de enero de 1995).
- Real Decreto 118/2003, de 31 de enero, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo.
- Reglamento (CE) nº 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE.
- Real Decreto 1262/2005, de 21 de octubre, por el que se modifica el Real Decreto 118/2003, de 31 de enero, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo.
- Reglamento (UE) nº 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre Materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos.
- Reglamento (U.E.) nº 174/2015, de la Comisión de 5 de febrero de 2015, “por el que se modifica y corrige el Reglamento (U.E.) nº 10/2011, sobre materiales y objetos

plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos.

I.V.5.5. Establecimientos alimentarios / registro sanitario

- Real Decreto 381/1984, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria del comercio minorista de alimentación. (BOE nº. 49 de 27 de febrero y corrección de errores en BOE nº. 101 de 27 de abril).
- Real Decreto 1010/1985, de 5 de junio, por el que se regula el ejercicio de determinadas modalidades de venta fuera de un establecimiento comercial permanente. (BOE nº154 de 28 de junio).
- Real Decreto 706/1986, de 7 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria sobre Condiciones Generales de Almacenamiento (no frigorífico) de Alimentos y Productos Alimentarios (BOE nº. 90 de 15 de abril).
- Real Decreto 1712/1991, de 29 de noviembre, sobre Registro General Sanitario de Alimentos. (BOE nº 290 de 4 de diciembre de 1991 y corrección de errores de BOE núm. 20 de 23 de enero de 1992).
- REAL DECRETO 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. (BOE nº 11 de 12 de enero de 2001).
- Real Decreto 191/2011, de 18 de febrero, sobre Registro General Sanitario de Empresas Alimentarias y Alimentos.

I.V.5.6. Aditivos

- Real Decreto 3177/1983, de 16 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de aditivos alimentarios. (BOE nº 310 de 28 de diciembre de 1983 y corrección de errores en BOE nº 35 de 10 de febrero de 1984).

- Directiva 88/344/CEE del Consejo, de 13 de junio de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. (DO L nº 157 de 24 de junio).
- Directiva 88/388/CEE del Consejo, de 22 de junio de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en el ámbito de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción. (DO L nº 184 de 15 de julio y corrección de errores en DO L nº 345 de 14 de diciembre).
- Orden de 28 de julio de 1988 por la que se establecen los criterios de pureza de lecitinas, citratos de calcio y ácido ortofosfórico, utilizados como aditivos en la elaboración de productos alimenticios y del propilenglicol utilizado como diluyente de antioxidantes. (BOE nº 193 de 12 de agosto).
- Directiva 89/107/CEE del Consejo, de 21 de diciembre de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios destinados al consumo humano. (DO L nº 40 de 11 de febrero).
- Real Decreto 472/1990, de 6 de abril, por el que se regulan los disolventes de extracción utilizados en la elaboración de productos alimenticios y sus ingredientes. (BOE nº 88 de 12 de abril).
- Real Decreto 1477/1990, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción. (BOE nº 280 de 22 de noviembre y corrección de errores en BOE nº 10 de 11 de enero de 1991).
- Decisión; nº. 97/292/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de diciembre

de 1996, relativa al mantenimiento de las legislaciones nacionales que prohíben la utilización de determinados aditivos en la producción de ciertos productos alimenticios específicos. (DO L nº 48 de 19 de febrero).

- Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de febrero de 1995, relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. (DO L nº 61 de 18 de marzo).
- Directiva 96/77/CE de la Comisión de 2 de diciembre de 1996 por la que se establecen criterios específicos de pureza de los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. (DO serie L nº 339 de 30 de diciembre).
- Real Decreto 1917/1997, de 19 de diciembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los aditivos alimentarios distintos de colorantes y edulcorantes utilizados en los productos alimenticios. (BOE nº 17 de 20 de enero).
- Real Decreto 1359/1998, de 26 de junio, por el que se aprueba el procedimiento para incorporar a las listas positivas españolas aditivos autorizados en otros países miembros del Espacio Económico Europeo que no estén contemplados en las listas españolas, o lo están en dosis distintas a las permitidas en estas listas. (BOE nº. 161 de 7 de julio).
- Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. (BOE nº 44 de 20 de febrero de 2002).
- Reglamento (CE) No 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios.
- Reglamento (UE) N o 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento

Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión.

- Recomendación (UE) 2017/84 de la Comisión 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.

I.VI. Determinación de contaminantes en alimentos

La determinación de sustancias activas en muestras de alimentos complejas requiere de una serie de etapas (muestreo, pre-tratamiento de muestra, extracción, clean-up/pre-concentración, detección, cálculo y evaluación de resultados) que se esquematizan en la Figura I.6. En este apartado se estudiarán los aspectos más importantes de estas etapas.

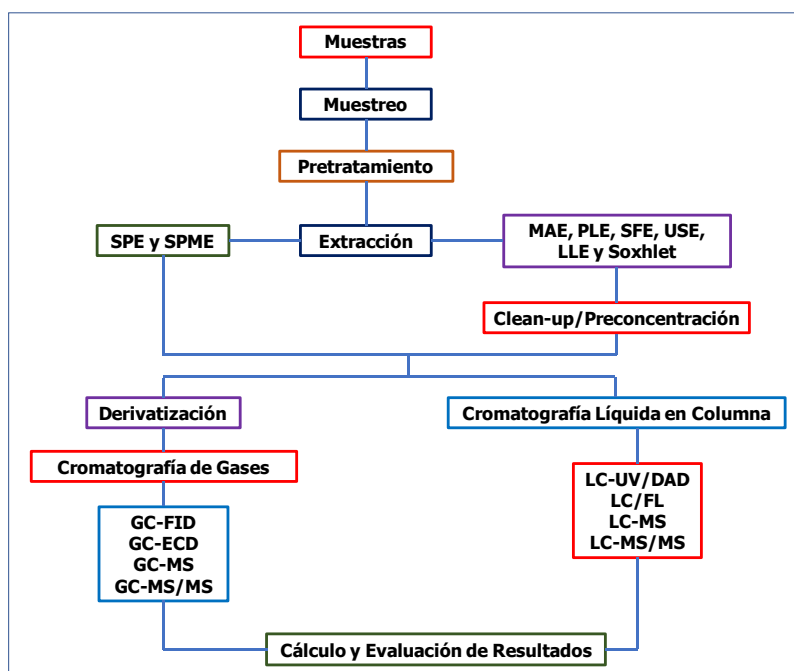


Fig. I.6: Las principales etapas del proceso analítico para la determinación de sustancias activas en muestras de alimentos complejas. DAD: detector de diodos en fila; ECD: detector de captura de electrones; FID: detector de ionización de llama; GC: cromatografía de gases; LC: cromatografía de líquidos; LLE: extracción líquido-líquido; MAE: extracción asistida por microondas; MS: espectrometría de masas; MS/MS: espectrometría de masas en tándem; PLE: extracción acelerada con disolventes; SFE: extracción con fluidos supercríticos; SPE: extracción en fase sólida; SPME: microextracción en fase sólida; USE: extracción asistida por ultrasonidos; UV: detector de ultravioleta.

El objetivo de la preparación de la muestra en cualquier determinación analítica es disponer del analito en el estado más puro posible. Por tanto, la primera etapa será aislar la sustancia a determinar separándola de la matriz (muestras sólidas y líquidas). Esta etapa es especialmente problemática ya que de ella va a depender de forma directa el resultado final

del análisis. Así, si el procedimiento de extracción ha sido demasiado suave, parte del analito seguirá unido a la matriz, lo que redundará en un error en la determinación final. Este es un aspecto particular de la determinación de compuestos orgánicos (especialmente en muestras sólidas), frente a la de elementos inorgánicos, ya que es difícil, si no imposible, saber si todo el analito ha sido extraído de la matriz. Existen dos formas principales de saber si la extracción del analito ha sido completa:

- Extracciones sucesivas: este método se lleva a cabo realizando extracciones sucesivas con un disolvente adecuado (o mezclas de ellos) y en cada uno de los extractos obtenidos se comprueba la presencia del analito. Este procedimiento nos dará la información de cuantas extracciones son necesarias para aislar el analito completamente. Sin embargo, si el analito se encuentra unido a la matriz de distintas formas (por ejemplo, en un suelo, puede estar adherido con diferente intensidad a la materia orgánica o la fracción mineral), este procedimiento no va a asegurar la extracción completa del analito.
- Muestras enriquecidas: mediante la adición de una cantidad conocida de analito a la muestra es posible evaluar la eficacia del procedimiento de extracción, comparando la cantidad de analito determinada con la añadida. Es importante indicar que el analito añadido debe encontrarse en el mismo estado que el analito original, y por tanto, se deben dejar los analitos añadidos en contacto con la matriz durante un tiempo suficientemente largo para que así se produzcan interacciones “analito añadido-matriz” idénticas a las interacciones “analito original-matriz”. Los resultados obtenidos mediante este procedimiento suelen ser satisfactorios aunque hay que tener en cuenta que es imposible asegurar que todo el analito añadido se ha puesto en contacto con la muestra, ya que procesos de evaporación, degradación, o absorción del analito a las paredes del material utilizado en el laboratorio están asociados a todo el proceso analítico (Harris, 1992; Björklund et al.,2000).

Una vez finalizada la extracción, se podría pensar que el analito está en las condiciones adecuadas para su determinación final. Sin embargo, en la mayoría de los casos,

las técnicas de extracción no son específicas, sino que el analito habrá sido extraído junto con otras sustancias que pueden dificultar (o impedir) su determinación. Por tanto, una vez finalizada la etapa de extracción, se debe someter al extracto obtenido a una etapa de limpieza con el objetivo de eliminar posibles sustancias interferentes constituyentes de la matriz. La situación ideal sería conseguir aislar completamente el analito: lógicamente esto es imposible, por lo que se debe asegurar la presencia de otras sustancias no afecte a la determinación final. Es importante indicar que una dedicación exagerada a esta etapa de limpieza puede ser una fuente de error importante al perder parte del analito durante la misma.

Finalmente en muchos casos, especialmente en la determinación de compuestos orgánicos en muestras medio ambientales a niveles de traza, es necesario concentrar el extracto antes de la etapa de limpieza o antes de la separación cromatográfica. Esta etapa puede ser crítica ya que se suele realizar mediante la eliminación de parte del disolvente. Muchos compuestos orgánicos, y especialmente los analizados por cromatografía de gases, son volátiles y, por tanto, la evaporación del disolvente puede producir pérdidas de analito. Como norma general esta evaporación por calentamiento (p.ej. rotavapor) no debe llegar a la sequedad total para evitar así la evaporación y/o descomposición de la sustancia a determinar. Si aún es necesario concentrar el extracto en mayor medida, esta concentración final debe realizarse sin calentamiento, burbujeando una suave corriente de nitrógeno o argón de alta pureza. Es importante recordar que el material utilizado debe estar perfectamente limpio, especialmente en sistemas de evaporación ya que éstos sueñen ser una de las fuentes principales de contaminación entre muestras (Hennion y Scribe, 1993).

El objetivo de la etapa de extracción es “arrancar el analito de la matriz a la que está unido. Para ello la muestra se ha de poner en contacto con un extractante (sólido, líquido o fluido supercrítico) en unas determinadas condiciones de tal forma que se debiliten completamente las interacciones “analito-matriz” a la vez que se incrementan las interacciones “analito-extractante”. En este sentido se puede utilizar la máxima similitud (similar disuelve a similar), es decir, si el analito es un compuesto apolar, se deberá en general emplear un extractante lo suficientemente apolar para que así el analito tienda a interactuar con éste con mayor intensidad que la que presente con la matriz. Siguiendo en esta línea, otros factores que puedan afectar a estas interacciones (p.ej., pH, fuerza iónica,

temperatura...) deberán ser tenidos en cuenta (Thurman y Mills, 1998).

En la mayoría de las técnicas analíticas existentes para la determinación de analitos orgánicos es necesario que los analitos se encuentren en disolución. Por tanto, en el caso de muestras sólidas, es necesario separar el analito de la muestra en sí empleando un líquido, sin embargo en muestras líquidas, los analitos ya están en disolución y por tanto los procesos de extracción van encaminados hacia la pre-concentración del analito, un simple cambio de analito o la limpieza de los extractos para eliminar los posibles interferentes.

I.VII. Bibliografía

I Jornada de Salud y Medio Ambiente Cádiz (2002). Contaminación Alimentaria Introducción.

Alba, J., Izquierdo, J.R. y Gutiérrez, F. (2008). Aceite de Oliva Virgen. Análisis sensorial. Editorial Agrícola Española, S.A. Madrid.

Ballesteros, E. (2007). Analysis of Pesticides in Water. "Handbook of Water Analysis". Ed. L.M.L. Nollet, 2ª Edición. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. Capítulo 18, Pág. 449-490

BOE, Boletín Oficial del Estado. (1994). Real Decreto 280/1994, del 18 de Febrero, por el que se establece los LMR's de determinados productos alimentarios. Madrid.

BOE, Boletín Oficial del Estado. (1999). Real Decreto 1334/1999, de 31 de Julio, por el que se aprueba la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. Madrid.

BOE, Boletín Oficial del Estado. (2003). Real Decreto 290/2003, de 7 de Marzo, por el que se establecen los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal. Madrid.

BOJA, Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. (2008). Orden de 15 de abril de 2008, por la que se aprueba el Reglamento Específico de Producción Integrada de Olivar. Sevilla.

Björklund, E., Nilson, T. y Bowadt, S. (2000). Trends Anal Chem. Chromatographic Analysis of the Environment, Third Edition.

Carabias, R., Rodríguez, E., Fernández, M. y Sánchez, F. (2000). Evaluation of surface- and ground-water pollution due to herbicides in agricultural areas of Zamora and Salamanca (Spain). J Chromatogr A. 869(1-2) 471-80.

Civantos, L. (1998). El Olivo, el aceite, la aceituna, la gastronomía. Editorial Consejo Oleícola Internacional. Madrid.

Civantos, L., Contreras, R. y Grana R. (2008). Obtención del Aceite de Oliva Virgen. Editorial Agrícola Española, S.A. Madrid.

Coldwell, M.R., Pengelly, I. y Rimmer, D.A. (2003). Determination of dithiocarbamate pesticides in occupational hygiene sampling devices using the isoctane method

and comparison with an automatic thermal desorption (ATD) method. *Journal of Chromatography A*, 984 (1) 81-88.

Dimitra, A. L., Ioannis K. K. y Triantafyllos, A. A. (2000). Determination of fungicides in natural waters using solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 893(1) 143–156

DOCE, Diario Oficial de la Unión Europea. (1991). Reglamento (CEE) 2568/1991 de la Comisión 11 de Julio de 1.991. Madrid.

DOCE, Diario Oficial de la Unión Europea. (2001). Reglamento (CEE) 1513/2001 del Consejo 23 de Julio de 2.001. Madrid.

DOCE, Diario Oficial de la Unión Europea. (2002). Reglamento (CEE) 1019/2002 del Consejo 13 de Junio de 2002. Madrid.

DOCE, Diario Oficial de la Unión Europea. (2002). Reglamento (CEE) 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002. Madrid

DOUE, Diario Oficial de la Unión Europea. (2011). Reglamento (CE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n o 1924/2006 y (CE) n o 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n o 608/2004 de la Comisión. Madrid

DOUE, Diario Oficial de la Unión Europea. (2013). Reglamento de Ejecución (UE) 1348/2013 de 16 de diciembre de 2013, por que modifica el Reglamento (CE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. Madrid.

Eisler, R., (1987). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. Fish and Wildlife Service, U.S. Department of the Interior, Volumen 85, Número 1 de Biological report Número 11 de Biological report (Washington, D.C.): Contaminant hazard reviews

European Journal of Clinical Investigation (2005). Edited By: John P.A.

Ioannidis. Volume 35.

- Fetzer, J.C. (2000). Large ($C \geq 24$) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Analysis. Wiley-Interscience. New York.
- Harris, D.C. (1992). Análisis Químico Cuantitativo. Grupo Editorial Iberoamericana. Mexico.
- Hennion, M.C. y Scribe, P. (1993). Sample handling strategies for the analysis of organic compounds from environmental water samples. Ed. Barceló Elsevier Science Publishers.
- Hermoso, M., González, J., Uceda, M., García-Ortíz, A., Morales, J., Frías, L., y Fernández, A. (1995). Elaboración de Aceites de Oliva de Calidad. Obtención por el Sistema de Dos Fases. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla.
- Humanes, J. y Civantos, M. (1993). Producción de Aceite de Oliva de Calidad: Influencia del Cultivo. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.
- IARC. 1983. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1. Chemicals, Environmental and Experimental Data, 32. IARC, Lyon.
- Irace-Guigand, S. y Aaron, J.J. (2003). The role of organic colloids in herbicide transfer to rivers: a quantitative study of triazine and phenylurea interactions with colloids. *Anal Bioanal Chem.* 376(4):431-5.
- IRIS. 1999. Integrated Risk Information System. US Environmental Protection Agency. Evidence of Human Carcinogenicity Weight of Evidence Characterization. IRIS, Washington. <http://www.epa.gov/iris/subst>.
- Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E. y Genin, E. (2000). Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters. *Journal of Chromatography A* 879 (1) 51-71.
- Laganà, A., Bacaloni, A., De Leva, A., Faberi, A., Fago, G. y Marino, A. (2002). Occurrence and determination of herbicides and their major transformation products in environmental waters. *Analytica Chimica Acta*, 462 (2) 187-198.
- Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria. COM (1999) Bruselas, 12-01-2000 Pág 719.

- López, J.M. (2004). *Nuevos Alimentos del siglo XXI*. Editorial Ciencia y Tecnología de los alimentos. Murcia (España).
- Mabres, M. (1999). *Pesticide Manual of The British Crop Protection Council*. Ediciones CEAC. Barcelona.
- Madrid, A., Cenzano, I. y Vicente, J.M. (1997). *Manual de Aceites y Grasas Comestibles*. AMV Ediciones. Madrid.
- MAGRAMA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. <http://www.magrama.gob.es>.
- McClure, P., y Schoeny, R. 1995. Evaluation of a component-based relative potency approach to cancer risk assessment for exposure to PAH. *Proceedings of 15th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds: Chemistry, Biology and Environment Impact*. Ispara, Joint Research Centre, European Commission, Belgirate, Italy, pp 161.
- Moret, S. y Conte, L. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *Journal of Chromatography A* 882 (1–2): 245–253. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00079-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00079-0)
- Perez-Jimenez, F., Alvarez de Cienfuegos, G., Badimon, L., Barja, G., Battino, M., Blanco, A., Bonanome, A., Colomer, R., Corella-Piquer, D., Covas, I., Chamorro-Quiros, J., Escrich, E., Gaforio, J.J., García Luna, P.P., Hidalgo, L., Kafatos, A., Kris-Etherton, P.M., Lairon, D., Lamuela-Raventos, R., Lopez-Miranda, J., Lopez-Segura, F., Martinez-Gonzalez, M.A., Mata, P., Mataix, J., Ordovas, J., Osada, J., Pacheco-Reyes, R., Perucho, M., Pineda-Priego, M., Quiles, J.L., Ramirez-Tortosa, M.C., Ruiz-Gutierrez, V., Sánchez-Rovira, P., Solfrizzi, V., Soriguer-Escofet, F., De la Torre-Fornell, R., Trichopoulos, A., Villalba-Montoro, J.M., Villar-Ortiz, J.R. y Visioli, F. (2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*. 35 (7) 421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2005.01516.x>
- P.I.O. (2002). *Reglamento de la Producción Integrada del Olivar*. nº 88.
- Ramesh, A. (1998). Rapid preconcentration method for the determination of pyrethroid insecticides in vegetable oils and butter fat and simultaneous determination by gas chromatography–electron capture detection and gas chromatography–mass spectrometry. *Analyst*, 123 (1) 1799-1802.

- Ruberu, S.R., Draper, W.M. y Perera, S.K. (2000). Multiresidue HPLC methods for phenyl urea herbicides in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(9) 4109-15. <https://doi.org/10.1021/jf000266p>
- Ruíz, J. (2003). *Internet, Trazabilidad y Seguridad Alimentaria*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España).
- The British Crop Protection Council. (1999). *Uso de plaguicidas*. Ediciones Ceac. Barcelona (España).
- Thurman, E.M. y Mills, M.S. (1998). *Solid-phase extraction*. Chemical Analysis Series, vol. 147. John Willey and Sons, Inc.
- Vazquez, S., García, M.S., González, S., Lage, M.A y Simal, J.(2000). Enrichment of benzo[a]pyrene in vegetable oils and determination by HPLC-FL. *Talanta*. 51 (1) 1069-1076. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00300-3](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00300-3)
- Viola, P. y Audisio, M. (1987). *El aceite de Oliva y la salud*. Editorial Consejo Oleícola Internacional. Madrid.
- Zambonin, C.G., Losito, I., Cilenti, A. y Palmisano, F. (2002). Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the study of soil adsorption coefficients of organophosphorus pesticides. *Journal of Environmental Monitoring* 4 (1) 477-81. <https://doi.org/10.1039/B201502C>



**II. TÉCNICAS INSTRUMENTALES
EMPLEADAS EN LA MEMORIA**



En este capítulo se incluye un estudio bibliográfico de las diferentes metodologías que se han utilizado para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y plaguicidas en aceites. Se describen las técnicas más importantes para llevar a cabo la extracción de estos analitos y las técnicas cromatográficas para su determinación. También se incluye una descripción de los métodos más usados en la bibliografía para la determinación del contenido graso y de humedad en matrices complejas como son las de los aceites.

II.I. Técnicas extractivas

Para la determinación de plaguicidas y PAHs en muestras de aceites son necesarias una etapa de extracción y otra de limpieza (*clean-up*) para poder extraer y eliminar de una manera completa o parcial de los componentes lipídicos que se pueden coextraer con los analitos. Normalmente los componentes coextraídos desde la matriz son lípidos y pigmentos (Agnastopoulos et al., 2013). Esta etapa es importante porque se evitan posibles problemas que se pudieran producir en las columnas cromatográficas (cromatografía de gases) debido a la presencia de pequeñas cantidades de aceite que provocan una disminución de la resolución cromatográfica y de la sensibilidad. Hay que tener en cuenta que la matriz está compuesta principalmente por triglicéridos (98–99 %), es muy difícil evitar la coextracción de material graso teniendo en cuenta que muchos de los plaguicidas y la totalidad de los PAHs son apolares y liposolubles (García Reyes et al., 2007). Por ello es necesario eliminar las grasas de alto peso molecular de las muestras para mantener el sistema cromatográfico en condiciones de trabajo,

Las técnicas de extracción y limpieza encontradas en bibliografía normalmente están basadas en transferencia de materia, podemos encontrar la extracción líquido-líquido, extracción líquida presurizada, extracción asistida por microondas, extracción por fluidos supercríticos, extracción por líquidos súper calientes, extracción en fase sólida, extracción asistida por ultrasonidos, microextracción en fase sólida, cromatografía en geles permeables, extracción Soxhlet. Actualmente se busca disminuir

el uso de disolventes orgánicos y la miniaturización de los métodos. Por ello una correcta combinación de las técnicas puede hacer que se obtengan unos buenos resultados además de un ahorro de materiales, con el consecuente ahorro y beneficio para el Medio Ambiente.

II.1.1 Extracción líquido-líquido

La naturaleza de esta técnica extractiva se basa en la solubilidad relativa de los analitos entre dos disolventes inmiscibles entre sí con diferente naturaleza polar, gracias al coeficiente de reparto los analitos se desplazarán de un disolvente a otro deseado. Cualquiera de las fases obtenidas puede ser objeto de análisis (Gilbert-López, 2010)

La extracción líquido-líquido (LLE) es ampliamente conocida por ser un procedimiento que puede extraer una amplia variedad de compuestos lipofílicos. Por lo general esta técnica se usa en combinación con una etapa de *clean-up* o limpieza debido a que junto al disolvente extractante se puede encontrar una porción de matriz lipídica. Algunos autores han aplicado directamente la extracción líquido-líquido y posteriormente han llevado a cabo la determinación con cromatografía de gases o líquidos, sin incluir una etapa de limpieza, pero se han encontrado con el problema de que se reduce la vida útil de las columnas cromatográficas. Por lo tanto, una etapa de limpieza es casi obligatoria cuando se trabaja con matrices complejas como son los aceites (García Reyes et al., 2007).

La muestra líquida se pone en contacto con un disolvente adecuado, tras un período de agitación se separan las fases, en este proceso el analito se reparte entre las fases hasta alcanzar un equilibrio, esto se conoce como coeficiente de partición. El interés está en llevar este coeficiente a un valor lo más elevado posible, esto quiere decir que el equilibrio está desplazado a la derecha y por tanto la extracción con el disolvente que se ha añadido es mayor.

Para obtener una mejor extracción hay que tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas del compuesto a extraer, la polaridad de los analitos suele ser uno de los factores determinantes a la hora de elegir el disolvente idóneo para este tipo de

extracción. Elegir un disolvente que tenga una alta afinidad por los analitos en cuestión y una baja solubilidad o ser inmiscible con la otra fase es primordial. A veces modificar el pH del medio ayuda a realizar una extracción satisfactoria.

Otro punto a tener en cuenta es la cinética del proceso, algunos procesos tienen una cinética lenta lo que da como resultado la pérdida de tiempo hasta que el sistema entra en equilibrio, un punto en contra de determinadas extracciones vía líquido-líquido.

Esta técnica es lenta y en algunos casos requiere de grandes volúmenes de disolventes orgánicos para poder realizar una extracción de manera exitosa, debido a esto se está sustituyendo por una combinación de esta técnica seguida de cromatografía por permeación en gel y por extracción en fase sólida, a su vez la extracción líquido-líquido tradicional se está viendo desplazada por la microextracción líquido-líquido, se basa en los mismos principios con un ahorro de disolventes que no se puede dar en la técnica tradicional, todo esto no se podría llevar a cabo si no se combina con alguna de las técnicas anteriormente mencionadas.

Algunos autores utilizan la LLE como técnica de extracción para insecticidas, fungicidas y herbicidas en muestras de aceites con recuperaciones entre el 70 y el 120 % (Agnastopoulos et al., 2003). Otros investigadores han aplicado la microextracción líquido-líquido para la cuantificación de piretroides en diferentes aceites vegetales con recuperaciones de entre el 85 y el 115 % (Farajzadeh et al., 2014), plaguicidas polares (Nortes-Méndez et al., 2010) o diferentes plaguicidas organoclorados, organofosforados y carbamatos en aceites (Guardia-Rubio et al., 2007).

II.1.2 Extracción líquida presurizada

La extracción líquida presurizada (PLE) es una técnica extractiva que utiliza una combinación de temperatura y presión elevadas y el uso de disolventes orgánicos para realizar una extracción de manera rápida y más eficiente de los analitos sobre matrices sólidas, la presión es aplicada sobre los disolventes orgánicos.

La PLE es una técnica eficiente utilizada para diferentes objetivos, entre ellos el de extraer plaguicidas de muestras de alimentos, es una buena técnica para determinar herbicidas en muestras de comida usando disolventes orgánicos (Rahmanian et al., 2015).

Las variables a tener en cuenta en este tipo de extracción es la naturaleza del disolvente, o mezcla de ellos, la presión y temperatura de extracción, así como la duración de los ciclos de extracción. La presión y temperatura son dos variables decisivas a la hora de llevarlo a cabo.

Haciendo una comparación con otras técnicas de extracción que se ayudan de la presión y/o calor para realizar su cometido tenemos la extracción a alta presión (HPE) que es más rápida y presenta menos interferencias en la matriz, esta extracción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, evitando así la degradación térmica de los analitos y muestra. La extracción por alta presión hidrostática (HPP) es otra técnica a tener en cuenta y con gran interés en ámbitos de alimentación, esta técnica requiere de menos tiempo de trabajo y el extracto obtenido posee pocas interferencias. En el caso de tener analitos que posean radicales libres y/o especies altamente reactivas con oxígeno se puede aplicar la extracción a alta presión (UPE).

II.1.3 Extracción asistida por microondas

La técnica de extracción asistida por microondas (MAE) se basa en el uso de la radiación electromagnética para aumentar la temperatura del o de los disolventes utilizados para la extracción. Al aplicar esta técnica se reduce el uso de disolventes orgánicos además de reducir el tiempo de tratamiento, a su vez da una gran eficiencia de extracción y una buena selectividad. En comparación con la extracción Soxhlet, con la técnica MAE se obtienen mejores recuperaciones.

La energía de microondas es absorbida por moléculas con momento dipolar permanente, produciendo su rotación, y siendo esta rotación la responsable del calentamiento de la muestra (Cámara et al., 2002). La elección del disolvente es una fase crítica la hora de poder obtener unos resultados óptimos, para su elección se debe

tener en cuenta su comportamiento frente a la radiación, a mayor momento dipolar del disolvente mayor será su capacidad de extracción.

En algunos casos se puede utilizar un disolvente que sea apolar, es decir, que no vaya a calentarse por efecto de las microondas pero que aprovechará el aumento de temperatura que va a proporcionarle la muestra si esta contiene sustancias con momento dipolar.

Los disolventes se suelen poner en contacto con la muestra en recipientes cerrados para este tipo de técnica de extracción, la ventaja o inconveniente, dependiendo de los analitos a tratar, es que deben usarse disolventes de naturaleza polar, ya que los disolventes apolares no son capaces de absorber este tipo de radiación electromagnética, a veces se usan mezclas de disolventes polares y apolares, ya que muchos analitos, plaguicidas y PAHs, son de naturaleza apolar.

Una de las ventajas de esta técnica es la simultaneidad, en los instrumentos actuales se pueden introducir un alto número de muestras en el reactor. La presencia de agua en la muestra puede afectar a la extracción por microondas provocando sobrecalentamiento, al absorber el agua presente parte de la radiación.

Alarcón et al. (2004) han llevado a cabo un estudio comparativo de la MAE y LLE para la extracción de 8 hidrocarburos policíclicos aromáticos en aceites de oliva y girasol, alcanzándose unos porcentajes de recuperación aceptables para aceites de oliva (62-84 %) y aceite de girasol (67-88 %).

II.1.4 Extracción por fluidos supercríticos

Un fluido está en estado supercrítico cuando su temperatura y presión están por encima de la temperatura y presión críticos, siendo considerado como un fluido híbrido entre gas y líquido. La extracción con fluidos supercríticos (SFE) está siendo cada vez más aplicadas con el fin de disminuir el uso de disolventes orgánicos. Uno de los compuestos recientemente utilizados como fluido supercrítico es el dióxido de carbono

(CO₂) por contener oxígeno libre y tener un efecto oxidativo limitado (Rahmanian, 2015).

La ventaja del uso de este tipo de fluidos es la baja viscosidad, menor tensión superficial y los altos coeficientes de difusión, proveyendo altas solubilidades y transferencias de masas con el cambio de temperatura y presión, una ventaja añadida es el hecho de que no altera a la muestra tratada.

La aplicación más importante de esta técnica es en el área de alimentos para la separación de compuestos poco volátiles y termolábiles, la extracción de compuestos apolares suele llevarse a cabo con una alta eficiencia y bajo coste energético. La SFE tiene como contrapartida la necesidad de ajustar un gran número de factores antes de cada ensayo.

Como se ha mencionado anteriormente, la extracción con fluidos supercríticos usando CO₂ es una técnica alternativa y atractiva frente a otras técnicas como puede ser la extracción tipo Soxhlet, este disolvente es seguro, no es tóxico, no inflamable, barato, sin olor, color y sabor, altamente selectivo y se elimina de manera eficiente. Su baja viscosidad permite penetrar en la matriz hasta llegar al material que se desea extraer y su bajo calor latente de evaporación y alta volatilidad nos dan facilidad para eliminarlo de la muestra sin dejar residuos. Se puede usar para la extracción de compuestos apolares de matrices grasas como son los PAHs y ciertos plaguicidas apolares (Rahmanian, 2015). Un problema asociado al uso de CO₂ radica en que debido a su baja polaridad solo extrae analitos que estén unidos débilmente a la muestra. Este problema puede ser superado mediante el uso de la adición de otro disolvente polar en pequeñas dosis, conocido como modificador. La presencia de este modificador puede aumentar la solubilidad de los compuestos más polares en el fluido supercrítico.

II.1.5 Extracción acelerada con disolventes

La extracción acelerada con disolventes (ASE) es una técnica que se basa en el uso de disolventes de origen orgánico u acuosos a alta temperatura y presión sin alcanzar el punto crítico para extraer analitos de la matriz que los contienen. El atractivo

principal de esta técnica es el hecho de que gracias a la temperatura y presión elevadas se obtiene un incremento de la solubilidad y transferencia de masa entre las fases, ya que las condiciones que se le proporcionan al sistema favorece la ruptura entre de las interacciones entre la matriz y el analito.

Al trabajar a una temperatura elevada se incrementa la capacidad del disolvente para solubilizar, a su vez la penetración del disolvente en la matriz se realiza con una mayor facilidad y la difusión en el medio es mayor al tener las moléculas mayor energía.

También, gracias al aumento de temperatura y presión se facilita la ruptura de las fuerzas que mantienen unidos a soluto y matriz, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones dipolares (Cela et al., 2010). Por efecto de la presión los disolventes son capaces de entrar a zonas en las que a presión ambiente sería imposible llegar, mejorando el movimiento de los fluidos a través del sistema, además de poder mantener los disolventes por encima de su punto de ebullición sin que estos pasen a estado gaseoso.

II.1.6 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) es una alternativa a la extracción líquido-líquido para la separación, purificación y preconcentración de las muestras, esta técnica puede ser una técnica extractiva por sí misma o utilizarse como paso intermedio de clean-up para la limpieza y eliminación de las interferencias de la matriz en los extractos de una extracción previa. Normalmente la SPE suele ir precedida de una extracción líquido-líquido.

La SPE es una técnica que se basa en la interacción fisicoquímica entre una fase sólida y una fase líquida, la propiedad básica que debe tener la fase sólida para que la técnica tenga sentido es poseer una mayor afinidad por los analitos que la fase líquida, como esta pasa a través del sólido los analitos quedarán retenidos en la superficie.

La técnica de SPE se puede incorporar en una metodología analítica de una manera simple y a un coste relativamente bajo, esta técnica tiene algunas ventajas sobre otras técnicas de extracción como son una alta sensibilidad y precisión, bajo consumo de disolventes orgánicos, eliminación de emulsiones y de interferencias provenientes de la matriz gracias a la alta selectividad que le confiere la equipación de una columna de sorbente que se adecúa a las características fisicoquímicas de los analitos a extraer.

Los objetivos principales de la aplicación de la SPE son el enriquecimiento de los analitos, partiendo de volúmenes relativamente grandes de muestra o extracto se llega a un eluido de un volumen en torno a 100-500 veces más reducido, la limpieza de la muestra, eliminando las interferencias de la matriz, separación y extracción de analitos que no son estables en un medio líquido o con alta volatilidad.

Las etapas de la extracción en fase sólida (Figura II.1) comprenden desde una activación del sorbente usando disolventes orgánicos y agua, paso del extracto por la columna de sorbente para la retención de los analitos y eliminación de la matriz que los contiene y por último una elución de los analitos desde la columna, por último, la columna se regenera siguiendo el primer paso del proceso.

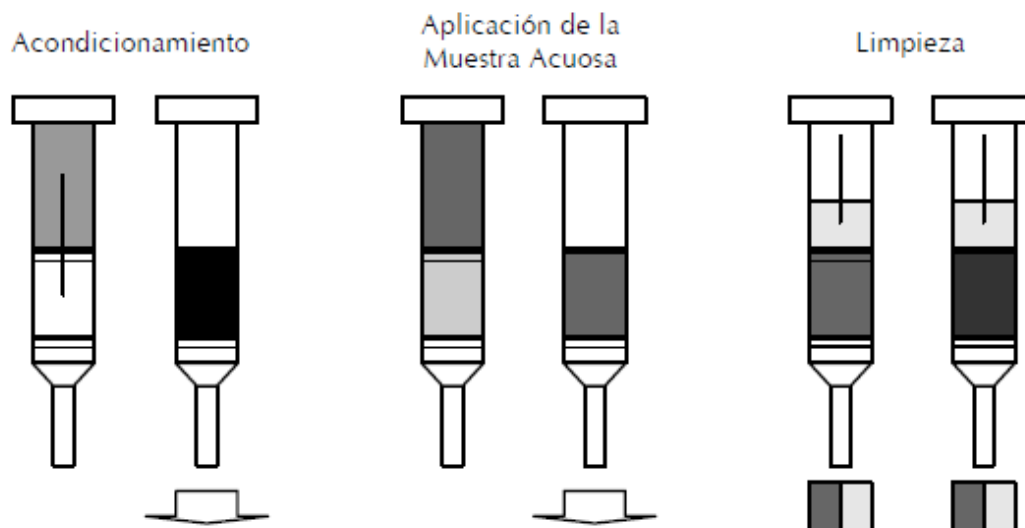


Fig. II.1. Etapas de la técnica de extracción en fase sólida (Santa et al., 2002).

El sorbente puede estar situado en una jeringa con un terminal Luer o discos y puede realizarse una extracción de manera manual o bien se puede empaquetar una columna junto a un sistema de válvulas y bomba peristáltica que permite la automatización y reducción de tiempos y volúmenes de solventes necesarios para llevar a cabo la extracción.

Los analitos interactúan con los sorbentes de una manera polar, apolar o iónica, para la determinación de plaguicidas y de PAHs en muestras de alimentos y aceites comestibles se usa Florisil y octadecil silano RP-C18 en su mayoría, también se ha descrito el uso de resinas poliméricas, fases reversas, octil silano RP-C8 y carbón activado (Purcaro, 2013). Las interacciones entre el analito y el sorbente pueden estar basadas en enlaces de hidrógeno, polaridad, intercambio de iones o discriminación por tamaño. Debemos conocer la naturaleza química de los analitos con lo que se trabaja para seleccionar el sorbente, o mezcla de ellos, que mejor se adapte a sus características fisicoquímicas.

Una de las grandes ventajas de este tipo de técnicas es la gran preconcentración que se puede alcanzar, dando lugar a unos límites de detección más bajos que sin este paso de preconcentración, a su vez la eliminación de interferencias provenientes de la matriz nos ayuda a esto también, además de evitar la contaminación y desgaste prematuro de las columnas y sistemas cromatográficos.

Una variación de la SPE es la dispersión en fase sólida (MSPD) es una técnica basada en el SPE original, pero en el que se realiza una dispersión de la matriz junto al material sorbente en un recipiente como puede ser un crisol o mortero.

El tipo de sorbente y de disolventes a utilizar depende de la naturaleza del analito y de la muestra a analizar, en este caso no sólo se lleva a cabo una extracción del analito, sino que también se realiza una limpieza del extracto.

Antes de aplicar MSPD se suele realizar una extracción líquido-líquido, el extracto después es mezclado con la fase sólida y empaquetados en una columna, de ahí se realiza la elución de los analitos con una cantidad mínima de disolventes orgánicos. Algunos autores acompañan de una segunda columna a continuación de la

anteriormente citada para mejorar la selectividad y la extracción de los analitos (García Reyes et al., 2007).

La técnica de SPE se ha utilizado para la extracción y limpieza en las metodologías para la determinación de PAHs y plaguicidas en muestras de aceites (Guardia-Rubio et al., 2007). Los PAHs han sido aislados mediante esta técnica en aceite de oliva (Bogusz et al., 2004; Luo et al., 2007) o en aceite de soja (Rojo Camargo et al., 2007).

II.1.7 Extracción asistida por ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) es una técnica de extracción suave que se produce al someter a la muestra junto a un disolvente a un proceso de agitación (Guardia Rubio et al., 2008). La radiación de ultrasonidos crea un gran número de fuerzas en los líquidos en ausencia de cavitaciones como la vibración, presión y agitación física. Esta gran energía aplicada mejora las propiedades mecánicas en muestras heterogéneas, pero también induce a nuevas reacciones dentro de la matriz. Con ello se produce un incremento en la eficacia de la extracción debido a que aumenta la transferencia de materia por ruptura de células por la formación de microcavidades, reduce el consumo de disolventes orgánicos, la degradación térmica y el consumo de agua.

Como alternativa a la UAE se encuentra la extracción por ultrasonidos dinámica (DUAE), esta variación de la técnica original permite la circulación de metanol a través de las muestras sólidas gracias a una sonda de ultrasonidos, con esto lo que se consigue es reducir la cantidad de muestra necesaria para el ensayo y evitar sobrepresiones en el recipiente, además, reduce el tiempo de ensayo respecto a la técnica original.

Algunos autores han utilizado la UAE como técnica auxiliar a la LLE para la extracción de PAHs en aceite de oliva (Alarcón et al., 2012).

II.1.8 Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica de preparación que se ha aplicado en múltiples matrices diferentes, tales como alimentos, muestras medioambientales y biológicas, previa a la determinación por técnicas cromatográficas, (Pérez Parada et al., 2015). Es una buena alternativa a otras técnicas de extracción al comprender en un mismo procedimiento el muestreo, extracción, preconcentración y la introducción de la muestra en el sistema cromatográfico sin necesidad de utilizar disolventes.

El SPME se basa en el uso de fibra de sílice fundida que ha sido recubierta con una fase polimérica estacionaria y empaquetado todo dentro de una jeringa de GC modificada (Figura II.2). Existen dos métodos de trabajo con esta técnica:

- Inmersión directa (DI-SPME), la extracción de los analitos se realiza con una inmersión de la fibra en el líquido de la muestra.
- Espacio de cabeza (HS-SPME), la muestra es sometida a calor y la fibra es expuesta a los vapores de la muestra en un vial cerrado.

Diversos factores influyen en la extracción de los analitos en esta técnica, con respecto a la fibra utilizada para la extracción hay que tener en cuenta el volumen y las características del recubrimiento para que se adapte lo mejor posible a los analitos objeto de estudio. Además, la temperatura, volumen y tiempo de extracción han de ser lo más estables posibles para poder obtener unos resultados precisos. El proceso de adsorción y desorción de los analitos en la fibra debe ser consistente en cuanto a tiempo y profundidad de inmersión y tiempo de exposición al sistema cromatográfico.

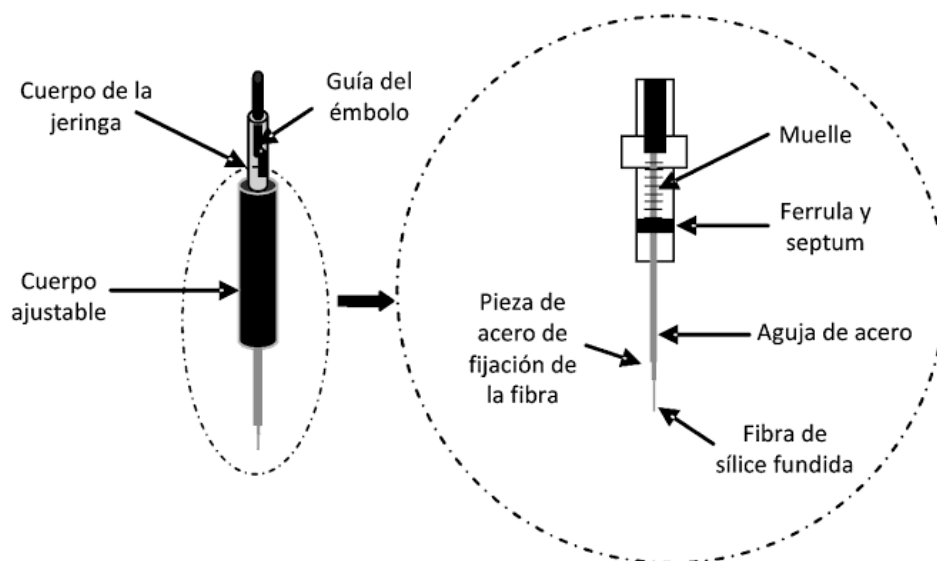


Fig. II.2. Dispositivo para SPME (Canosa, 2006).

La etapa de desorción se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes, dependiendo de si se utiliza un GC o un LC, para los GC se puede hacer de manera térmica y en el caso de LC se hace utilizando disolventes orgánicos. Esto también es un factor que va a verse influido por las características físicas de la fibra, conforme mayor espesor de fibra se use, mayor será el tiempo de desorción y el peligro de una adsorción irreversible de los analitos en la fibra es mayor. Durante el proceso de desorción los analitos difunden de la fase estacionaria al fluido portador, es necesario mantener un flujo alto para asegurar que el analito se desorba inmediatamente de la fase estacionaria de la fibra.

Los factores a tener en cuenta en la desorción de los analitos retenidos en la fibra es el tipo de inyector, este trabaja en modo sin división para transferir todos los analitos a la cabeza de la columna cromatográfica. La temperatura, es un parámetro a tener muy en cuenta, a una temperatura adecuada los analitos difundirán mejor y se evitará la no desorción de parte o la totalidad de los analitos, junto a este parámetro tenemos el tiempo de desorción, normalmente entre 1 o 2 minutos suele ser necesario para obtener la totalidad de los compuestos.

Esta técnica ha sido utilizada por algunos autores para la determinación de PAHs en diferentes muestras de aceites mediante el uso de espacio de cabeza (Purcaro et al., 2013).

II.1.9 Cromatografía en geles permeables

La cromatografía en geles permeables es una técnica que nos permite separar las moléculas según su tamaño, también conocida como cromatografía por exclusión de tamaño, es una técnica ampliamente aplicada en la etapa de *clean-up* sobre compuestos de alto peso molecular. Los rellenos de la cromatografía en geles permeables están formados por pequeñas partículas de naturaleza polimérica o de sílice, los cuales tienen una red de poros por donde deben difundir tanto las moléculas de soluto como las de disolvente, la elección del tamaño de poro debe ser adecuado al tamaño de las moléculas a separar.

Como se puede observar en la Figura II.3, las moléculas con un tamaño mayor a los poros quedarán libres en la columna, pasando más rápidamente a través de ella que las de tamaño igual o menor, que pasarán por el entramado de poros haciéndose su tiempo de elución mucho mayor que el de las moléculas de mayor tamaño, por tanto, las moléculas de mayor tamaño eluirán antes que las de menor tamaño, llevándose a cabo la separación.

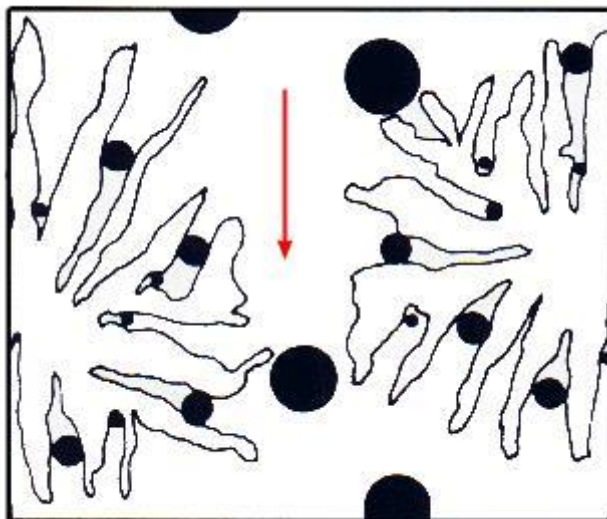


Fig. II.3. Mecanismo de acción de los poros del relleno de columna en GPC (Waters).

Como se ha mencionado anteriormente, los rellenos de estas columnas suelen tener una naturaleza polimérica o de sílice, el diámetro de partícula puede variar entre los 5 y los 10 μm (Guardia Rubio et al., 2008). Además, hay que tener en cuenta la

disposición geométrica de las moléculas, ya que esto tiene influencia en su tamaño efectivo y, por tanto, afectará al hecho de pasar a través de los poros del relleno.

En esta técnica la fase móvil no interviene en la discriminación de los solutos, su único fin es el de transportarlos por toda la columna, por lo que la elección de la fase móvil se debe ver influenciada por la solubilidad de los analitos en ella, su viscosidad y compatibilidad con el relleno para evitar sobrepresiones (Figura II.4). Algo a tener en cuenta es que la fase móvil puede tener efecto sobre las interacciones entre el soluto y el relleno, ya que se pueden encontrar fenómenos de adsorción, y otras de naturaleza iónica, etc.

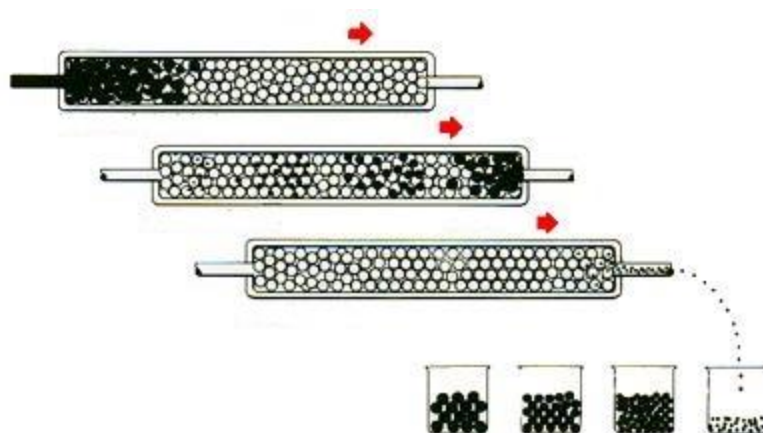


Fig. II.4. Proceso de separación de una muestra mediante GPC (Waters).

La GPC es una técnica que ha sido aplicada sobre multitud de muestras y analitos durante los últimos años. Entre estas aplicaciones, algunos autores la han utilizado junto a la extracción líquido-líquido previa para la separación y extracción de ftalatos en muestras de aceite de oliva (Cavaliere et al., 2008) y para mezclas de un número muy elevado de plaguicidas en aceites comestibles (Guardia-Rubio et al., 2007; Marinas et al., 2010).

II.1.10 Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet se utiliza en los casos en los que es necesario extraer un

compuesto orgánico que está altamente retenido en la matriz y que necesita de la aplicación de un aumento de la temperatura para poder ser extraído sin riesgo de perder el analito y/o el disolvente empleado en la extracción.

Este tipo de extracción requiere de repetidas destilaciones con disolventes a través de la muestra sólida para extraer los analitos de intereses. Esta técnica ha demostrado sus ventajas desde hace décadas. Ha sido modificada usando presión en el cartucho de extracción, automatizando la extracción y asistiendo la extracción con energías auxiliares.

Esta técnica tiene sus desventajas como el largo tiempo de extracción, posibles degradaciones de los analitos por sobrecalentamiento debido a que a medida que son extraídos se quedan en el matraz que está siendo calentado constantemente, en caso de tener analitos termolábiles puede dar lugar a procesos de degradación, todo esto acompañado de altos costes y poca versatilidad. Aunque estos problemas no son sólo de este tipo de extracción, por ejemplo, la extracción líquido-líquido también sufre de estos problemas.

Algunos intentos de automatización con el objetivo de reducir los tiempos de extracción se han llevado a cabo con un proceso en el cual la muestra es colocada dentro de una carcasa porosa, a su vez esta es introducida en el disolvente en ebullición durante 30-60 minutos y posteriormente es lavado con una extracción Soxhlet tradicional. Si fuera necesario, el uso de presión en la extracción Soxhlet debería reducir el tiempo de extracción.

II.II. Técnicas espectroscópicas

II.II.1 Introducción

Muchas de las propiedades de la radiación electromagnética se explican adecuadamente con un modelo clásico de onda sinusoidal, que utiliza parámetros como la longitud de onda, la frecuencia, la velocidad y la amplitud (Figura 13). A diferencia de otros fenómenos ondulatorios, como el sonido, la radiación electromagnética no necesita un medio de apoyo para transmitirse, por tanto, se propaga fácilmente a través

del vacío (Skoog et al., 2001). El modelo ondulatorio falla al intentar explicar fenómenos asociados con la absorción o la emisión de energía radiante. Para comprender estos procesos, hay que acudir a un modelo corpuscular en el que, como un flujo de partículas discretas o paquetes ondulatorios, de energía denominados fotones, en los que la energía de un fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación. Este doble punto de vista de la radiación como partícula y como onda no es mutuamente excluyente, sino complementario. De hecho, la dualidad onda – corpúsculo se aplica al comportamiento de haces de electrones, protones y de otras partículas elementales y se racionaliza completamente por medio de la mecánica ondulatoria. Por tanto, la naturaleza de la radiación electromagnética, se puede considerar de dos formas distintas, tal y como se observa en la Figura II.5, que son ambas ciertas simultáneamente:

- Constituida por “paquetes” de energía (“cuantos de radiación electromagnética”) de carga y masa nulos llamados fotones. La intensidad del haz luminoso depende del número de fotones.
- Constituida por un campo magnético y un campo eléctrico perpendiculares entre sí que oscilan sinusoidalmente a medida que se propagan en el espacio.

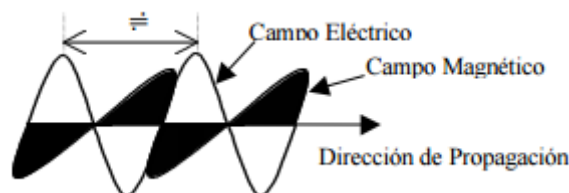


Fig. II.5. Representación de una onda electromagnética (Ministerio Industria, 2014).

Considerándola como una onda, tal y como se observa en la Figura II.6, podemos definir:

- Longitud de onda (λ , lambda): Distancia entre dos puntos consecutivos en el mismo estado de oscilación (metros).
- Frecuencia (ν , nu): Número de oscilaciones por segundo (hertzios). 1 hertzio = 1 oscilación por segundo.
- Velocidad de desplazamiento (c): En el vacío $c = 2,9979 \times 10^8$ m/s. Máxima

velocidad alcanzable en el universo. En otros medios la velocidad (c') es menor.

Estas tres magnitudes están relacionadas entre sí:

$$v = c / \lambda$$

La energía de un fotón viene dada por:

$$E = h \cdot n$$

Donde:

- E = energía de un fotón.
- h = constante de Planck = $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s} \cdot \text{partícula}^{-1}$
- n = frecuencia de la radiación.

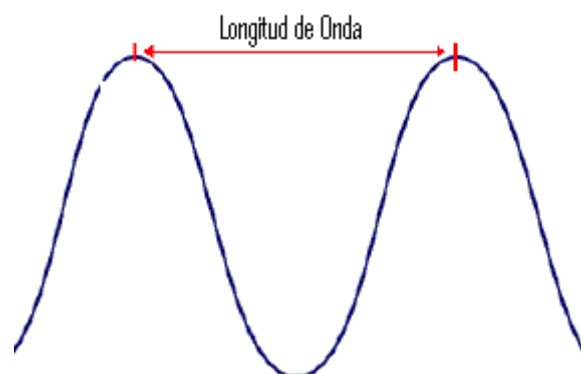


Fig. II.6. Representación bidimensional del vector eléctrico (Skoog et al., 2001).

En la Figura II.7 se observa una representación del Espectro electromagnético.

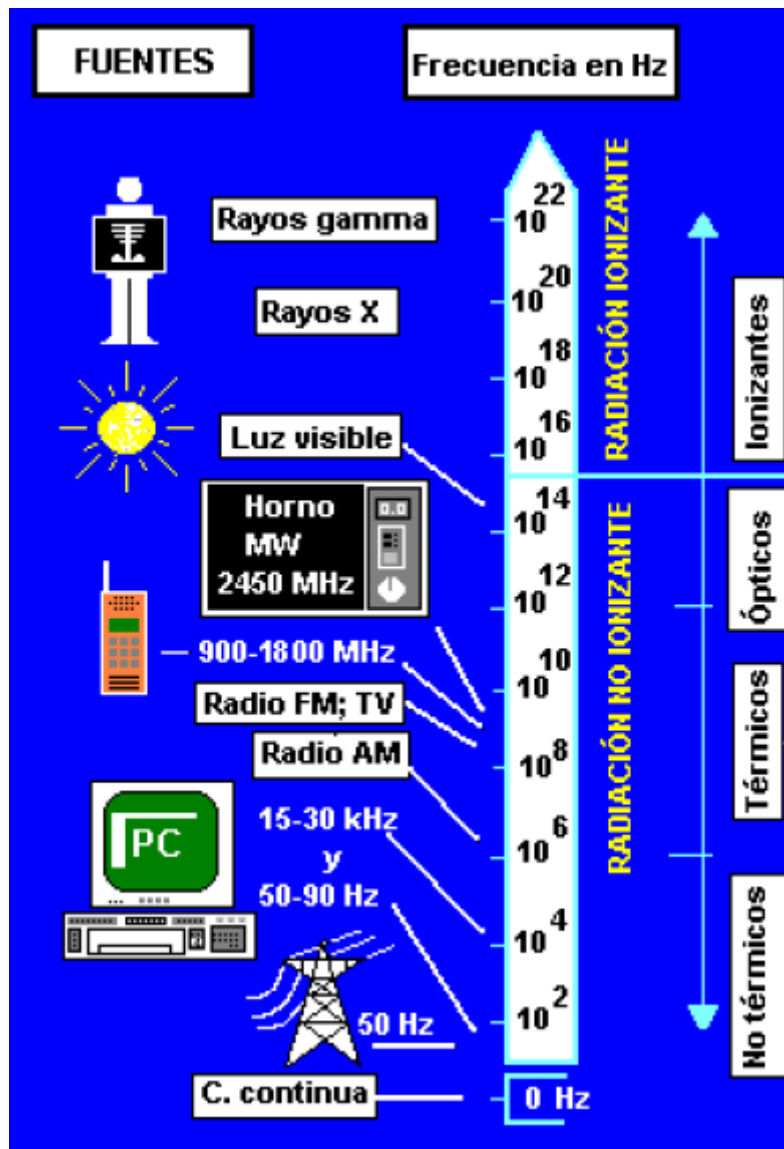


Fig. II.7. Espectro Electromagnético (Ministerio Industria, 2014).

II.II.1.1 Interacción de la radiación con la materia

Un sistema posee energía debido a diversos factores. Esta energía está cuantizada, solo puede variar (ser absorbida o emitida) en paquetes discretos que permitan pasar de un estado cuántico a otro.

Cuando un fotón choca con una partícula será absorbido siempre que su energía tenga una magnitud tal que pueda ser utilizada para pasar a un estado de mayor energía.

Por tanto, fotones de diferentes λ (y por tanto de diferente energía) no son absorbidos con igual probabilidad por una partícula (Skoog et al., 2001).

II.II.1.2 Espectros de absorción (espectroscopia UV-visible)

Si representamos la luz absorbida por una partícula frente a la longitud de onda de la luz incidente obtendremos la representación de la Figura II.8:

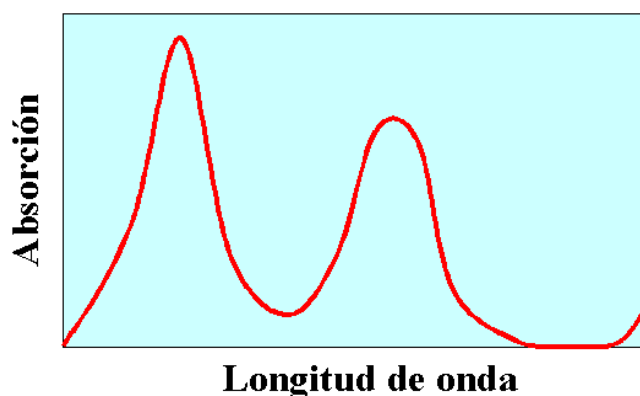


Fig. II.8. Espectro de absorción frente a longitud de onda.

Debido a que las diferencias de energía son diferentes entre cada especie, el estudio de las frecuencias de ración que absorben nos proporciona información sobre las sustancias que componen una muestra. El espectro de absorción de una muestra se ve influenciado por su estado físico, su naturaleza y el medio en el que se encuentre situado. Para cada longitud de onda la absorción será de intensidad diferente, el obtener una mayor o menor respuesta dependerá de los factores citados anteriormente, a mayor concentración de moléculas sensibles a determinada longitud de onda se obtendrá una respuesta mayor.

II.II.1.3 Instrumentación

El espectrofotómetro es un instrumento capaz de producir luz monocromada y

de detectarla tras hacer pasar el haz de luz a través de la muestra. Se componen de cinco bloques principales como se muestra la Figura II.9.

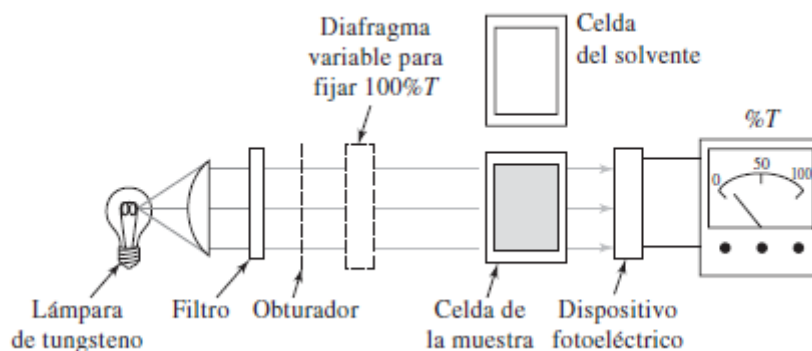


Fig. II.9. Esquema de un espectrofotómetro con lámpara de tungsteno (Skoog et al., 2001).

II.II.1.4.1 Fuente

La fuente de radiación es donde se produce la emisión de energía en forma de radiación electromagnética que llegará a la muestra en cuestión, de esta fuente se requiere que tenga una alta intensidad y baja área superficial, con un rango espectral amplio y estable en el tiempo.

Dentro de las fuentes encontramos dos tipos, el primero son las fuentes continuas, aquellas cuya radiación es continua, se les suele denominar lámparas y dependiendo de su material emiten en diferentes zonas del espectro UV-Vis, algunas de las más usadas son de tungsteno y sus haluros, hidrógeno, deuterio, xenón, etc. Las fuentes discontinuas son aquellas que sólo emiten radiación en una longitud de onda determinada, en este caso no sería necesario el uso de un monocromador, suelen ser útiles para realizar calibraciones, pero poco prácticas para la medida de absorbancia, son las menos usadas por su poca versatilidad.

II.II.1.4.2 Monocromador

Tras pasar por varios espejos en los que se selecciona entre la luz UV y la Vis y las lentes que concentran el haz de luz, es en primer lugar colimado al separar el rayo único en varios paralelos entre sí y después es seleccionado el haz de longitud de onda deseado por el monocromador.

El monocromador debe tener una mínima absorción del haz de luz incidente, ser preciso a la hora de seleccionar la longitud de onda y tener una alta pureza espectral en el rango de longitudes de onda.

Puede tratarse de un prisma, una red de difracción o ambos a la vez.

II.II.1.3.2.1 Prisma

Los prismas son fragmentos que tienen forma de cuña, pueden estar hechos de diferentes materiales como son el vidrio, cuarzo, cloruro sódico o cualquier otro que permita que la luz pase a través de él.

La dispersión de la radiación incidente es debido al proceso físico de la refracción, lo cual provee una buena separación entre las diferentes longitudes de onda, la desviación de las longitudes de onda más cortas es más pronunciada y no se produce una dispersión lineal, además, son sensibles a las variaciones de temperatura por dilatación y contracción de los materiales, dos desventajas del uso de los prismas a tener muy en cuenta.

II.II.1.3.2.2 Redes de difracción

Las redes de difracción están constituidas por una superficie especular con un gran número de ranuras paralelas e iguales entre sí sobre una superficie de vidrio o metal, aproximadamente unas 6000 por centímetro. Al incidir la luz sobre ellas, cada hendidura actúa como si fuera un prisma, creando interferencias positivas y negativas de las longitudes de onda, resultando una propagación de una determinada longitud de onda.

Gracias a ello se obtiene un espectro de alta pureza, por lo tanto tendrá una mayor resolución.

II.II.1.4.3 Cubeta

La función principal de la cubeta es la de contener la muestra durante el análisis, el principal requisito es el ser transparente a la radiación que se requiera. Tienen forma y volumen variable, desde los 3 hasta los 50 ml. Los materiales de los que están hechas las cubetas varían en función a la muestra y el análisis a realizar, vidrio y plástico son aptas para el uso del espectro visible mientras que las de cuarzo son necesarias para un uso en el espectro ultravioleta. Las cubetas tienen dos caras pulidas y otras dos translúcidas por las cuales no se debe hacer pasar el haz de luz.

II.II.1.4.4 Detector

El detector es el encargado de amplificar y transformar la energía que no ha sido absorbida por la muestra y transformarla en una medida eléctrica y medible, dentro de los detectores tenemos dos grupos dependiendo del fundamento físico en el que se basan para realizar su cometido, detectores de fotoemisión o de diodos.

II.II.1.3.2.1 Detectores de fotoemisión

- Célula fotovoltaica: está formada por unas láminas de cobre en las que se deposita un material semiconductor, esta lámina también se recubre con un metal transparente que actúa como electrodo colector, al iluminarse el electrodo se produce una corriente de electrones medible.
- Fototubos: compuestos por un fotocátodo cóncavo de níquel recubierto de plata encargado de absorber los fotones, al realizar esto se desprenden una serie de electrones que viajan hacia un ánodo gracias a la existencia de una diferencia de potencial entre ánodo y cátodo.
- Fotomultiplicadores: son dispositivos que se encargan de amplificar la señal inicial con un funcionamiento similar al de los fototubos, en este

caso el fotomultiplicador posee un conjunto de electrodos (dínodos) en los que se aplica una diferencia de potencial, lo que hace que los electrones que se extraen sean acelerados. Esta aceleración provoca que un electrón sea capaz de arrancar más electrones del primer dínodo, y así sucesivamente con el resto de dínodos hasta llegar a niveles de 10^7 cifras significativas, con una alta sensibilidad y rapidez.

II.II.1.3.2.2 Detectores de diodo

Los fotodiodos operan de manera diferente a los detectores de fotoemisión, en este caso se realiza una unión semiconductor que posee una polarización inversa, no hay flujo de corriente, en este caso cuando un fotón llega al diodo los electrones se llevan hasta una banda de conducción y ahí actuar como portador de carga, la corriente que se genera es proporcional a la potencia de la radiación incidente.

Este tipo de detector funciona bien en el rango visible e infrarrojo cercano, pero son mucho menos sensibles que los tubos fotomultiplicadores.

II.II.1.4 Medida de la absorción

Se mide siempre comparando la intensidad de la luz que alcanza el receptor en ausencia de muestra (I_0) con la intensidad en presencia de muestra (I). Para ello nos servimos de dos magnitudes, la transmitancia y la absorbancia.

La transmitancia se puede definir como la cantidad de energía que atraviesa un cuerpo en un determinado tiempo, normalmente se expresa en tanto por ciento.

$$\%T = \left(\frac{I}{I_0}\right) \cdot 100 \quad \left(T = \frac{I}{I_0}\right)$$

Donde I es la cantidad de energía transmitida por la muestra e I_0 la aplicada sobre la misma.

La absorbancia es la magnitud usada para determinar la cantidad de energía que es absorbida por una muestra.

$$Abs = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad Abs = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$

En los espectrofotómetros de doble haz I_0 e I son respectivamente las intensidades de luz que atraviesan la cubeta de referencia y la cubeta de la muestra.

II.II.1.4.1 Ley de Lambert-Beer

La ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia de una muestra está directamente relacionada con las propiedades del analito, de la concentración a la que se encuentre en una disolución y de la trayectoria del haz de energía que se le hace pasar a través.

La ley de Lambert-Beer se expresa con la siguiente ecuación:

$$Abs = \epsilon \cdot c \cdot b$$

Donde:

- ϵ = coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Está relacionado con la probabilidad que la sustancia sufra una transición espectroscópica con luz de una longitud de onda dada. Es por tanto diferente para cada longitud de onda.
- c = concentración de la sustancia (M)
- l = ancho de la cubeta (cm.)

La ley de Lambert-Beer permite determinar la concentración de una sustancia a partir de la absorbancia a una determinada longitud de onda.

Al representar Abs frente a concentración tal y como se observa en la Figura II.10.

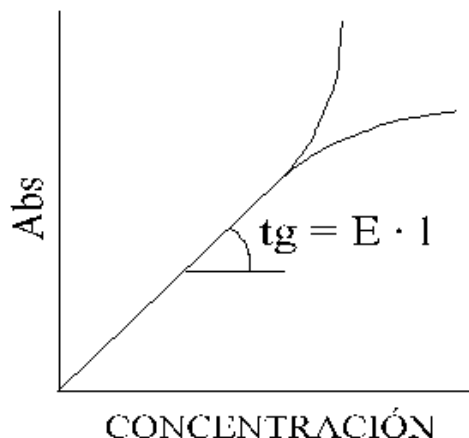


Fig. II.10. Representación gráfica de Abs/Concentración.

Como se puede ver, hay una desviación de la ley de Lambert-Beer para concentraciones altas, no hay linealidad en todo el rango de concentraciones.

Esta desviación puede obedecer a tres razones:

- Reales: A medida que aumenta la concentración aumenta también el índice de refracción.
- Químicas: La estructura de la sustancia cambia con la concentración afectando a ϵ . Por ejemplo, equilibrios de asociación - disociación, reacciones auto catalíticas, polimerización - despolimerización, etc.
- Instrumentales: A medida que aumenta el ancho de banda (disminuye la pureza espectral) se produce una desviación negativa de la linealidad.

La incidencia de luz difusa sobre el detector produce desviación negativa de la linealidad. La luz difusa pone un límite máximo a la Abs que se puede medir con el aparato.

II.II.1.5 Espectros de absorción

Un espectro de absorción es una representación gráfica de la cantidad de luz absorbida por el analito frente a diferentes valores de longitud de onda, ϵ frente a λ . Para realizar el espectro de absorción se prepara una disolución del analito en una

concentración dentro del rango lineal y un blanco que contenga el resto de componentes que acompañan al analito, se selecciona siempre el valor de λ en la que el analito presenta una máxima absorbancia.

A la hora de realizar los cálculos el uso de un espectrofotómetro de haz simple es diferente a de doble haz. En espectrofotómetros de haz simple hay que calcular absorbancia para cada λ en presencia y en ausencia de muestra y restar ambas. En los de doble haz el aparato resta continuamente a la Abs de la cubeta de la muestra la Abs de la cubeta de referencia.

Cada banda de absorción corresponde generalmente a una transición de un orbital molecular a otro de mayor energía. A partir de los espectros se puede determinar la λ para la cual la Abs es máxima (λ_{\max}), que es normalmente para la que se calcula con exactitud e y la que se usa para determinar la concentración de ese compuesto (Skoog et al., 2001).

II.II.2 Infrarrojo cercano

II.II.2.1 Fundamentos

En la década de los 60 surge un nuevo concepto de análisis de productos agroalimentarios basado en la absorción en la región del infrarrojo cercano (780-2.500 nm). Desde entonces dicho concepto ha evolucionado enormemente hasta desembocar hoy día en la denominada tecnología de espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS), esta técnica es ampliamente reconocida por su capacidad para el análisis cualitativo y cuantitativo en la industria agroalimentaria, farmacéutica, química y en determinadas aplicaciones en medicina, Medio Ambiente, etc. (Williams, 1996).

Entre las razones que han provocado el enorme desarrollo e implantación de la tecnología NIRS se encuentran la de ser una técnica no destructiva, no requerir preparación de la muestra o poca manipulación de la misma, como la molienda u homogeneización del material en algunos casos, velocidad de respuesta inmediata (1-2 minutos), posibilidad de ser utilizada a nivel de línea de producción (in line, on line), o

cerca de la misma (at line), ser una técnica no contaminante al no utilizar reactivos ni producir residuos, y finalmente la de ser una técnica analítica multiproducto y multiconstituyente, esto es, que permite que el mismo instrumento con una única medida de muestra, produzca de forma instantánea, información simultánea de diferentes atributos de calidad y para productos muy diversos (Garrido et al., 1996).

Resulta difícil resumir el enorme trabajo desarrollado en el terreno del análisis NIRS de productos agroalimentarios, resaltando que la mayoría de los trabajos publicados hacen referencia a la predicción NIRS de los constituyentes mayoritarios y/o de mayor relevancia en el control de calidad de dichos productos (humedad, proteína, grasa, fibra, etc.), si bien cada vez son más frecuentes los trabajos referentes a la predicción de indicadores de calidad (cuantitativos o cualitativos) específicos de un determinado producto, tales como digestibilidad en productos animales, color, dureza de la calidad harinera en trigos, adulteraciones de productos lácteos, índice de yodo, ácidos grasos en aceites, etc. Así como una enorme lista de aplicaciones en la industria alimentaria que se incrementa cada año.

Los instrumentos NIRS más frecuentemente utilizados cubren la región 1.100-2.500 nm, aunque existen algunos fabricantes que suministran equipos monocromadores que cubren el rango visible y NIR, realizando medidas entre 400-2.500 nm (Osborne et al., 1993; Shenk et al., 1995).

Las bandas de absorción principales que ocurren en la región NIRS son segundos o terceros sobretonos de absorciones fundamentales de los enlaces O-H, C-H y N-H del Infrarrojo medio. La complejidad del espectro NIRS proporcionado por los instrumentos VIS+NIRS se debe a que por una parte el mismo posee cierta información solapada proveniente del visible a las longitudes de onda más bajas (780-1.100 nm) y contiene información de absorciones fundamentales de la región del infrarrojo medio a las longitudes de onda más altas (2.300-2.500 nm) lo que explica la dificultad del análisis interpretativo y la necesidad de utilizar métodos quimiométricos para extraer la información relevante (Shenk et al., 1995).

II.II.2.1.1 Métodos de medida

Aunque la forma tradicional de análisis NIRS ha sido y continúa siendo el análisis por reflectancia, la instrumentación NIRS que actualmente se comercializa permite diferentes formas de interacción radiación-muestra tales como reflectancia, transmitancia, “folded” transmisión o doble transmitancia (también denominada transflectancia), de gran interés en productos líquidos y pastosos y asimismo las denominadas interactancia-reflectancia realizada mediante el uso de diferentes sondas de fibra óptica o la denominada luz directa, de más reciente desarrollo. Estas dos últimas permiten el uso de la tecnología como sensor on line e in line a nivel industrial (Shenk et al., 1995).

La reflectancia es el efecto que se produce cuando un haz de luz incide sobre una superficie y es devuelto al medio en una proporción mayor o menor, dependiendo del material con el que interactúe el haz de luz (Figura II.11). El paso óptico es indeterminado ya que no se sabe hasta que profundidad va a llegar la radiación a través de la muestra, esta puede ser opaca, estar pulverizada o tener un espesor mayor a 1 cm.

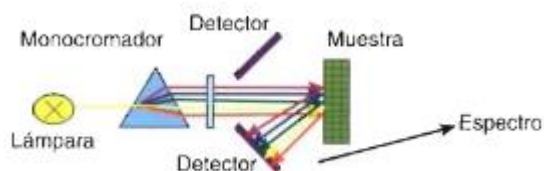


Fig. II.11. Esquema de un NIR por reflectancia (Bergera et al., 2006).

La transmitancia se produce cuando un haz de luz monocromática, con una sola longitud de onda, incide sobre un cuerpo, parte de ese haz pasará a través de la muestra y el resto será absorbido. Esta parte del haz que no es absorbido por la muestra se llama transmitancia, se puede usar en muestras homogéneas sólidas y líquidas.

La transflectancia es el efecto resultante de combinar la transmitancia y la reflectancia, en este caso parte de la luz incidente se refleja en la muestra y otra parte la

atraviesa, la parte del haz que atraviesa la muestra es reflejado por un material colocado tras la muestra y enviado al detector (Bergera et al., 2006).

Independientemente de las características de cada tipo de método de medida todos tienen en común los siguientes componentes:

- Una fuente de energía radiante (usualmente una lámpara de tungsteno).
- Una rendija para limitar la radiación a una banda estrecha.
- Una lente para enfocar la radiación.
- Un dispositivo de dispersión de la longitud de onda (en los equipos más extendidos en la agroindustria es lo que se denomina grating o red de difracción).
- Una segunda lente.
- Una rendija de salida del haz de luz.
- Un compartimento de presentación de muestra (cápsulas de ventana de cuarzo)
- Detectores (reflexión situados delante de la muestra y transmisión situados detrás).

La mayoría de trabajos de aplicación de la tecnología NIRS al análisis de aceites han sido realizados utilizando transmisión, conteniendo la muestra en cubetas. En otros trabajos se ha utilizado el método de doble transmitancia, lo que facilita la operación de llenado y posterior limpieza de cápsulas tras el análisis de cada muestra, en este modo de análisis se usa una cápsula circular con un paso óptico estrecho (0,1 a 0,4 mm), de forma que el valor de $\log 1/R$ permanezca inferior a 1,5 asegurando la linealidad de $\log 1/R$ en relación a la concentración (ley de Lambert-Beer). El haz de luz, tras atravesar la ventana de cuarzo de la cápsula atraviesa la muestra (líquida o pastosa) y alcanza el fondo de la cápsula, el cual está constituido por un material reflectante (aluminio u oro). Dicho material refleja la energía la cual vuelve a atravesar de nuevo el líquido o pasta, para finalmente alcanzar los detectores de reflectancia (Shenk et al., 1995).

El uso de NIR se ha extendido y aplicado a la determinación de múltiples propiedades y a la detección de la presencia de determinadas sustancias en muestras de aceites comestibles, como los aceites de oliva virgen, virgen extra y aceitunas. Algunos autores han aplicado las técnicas de NIR-Vis para la determinación de aceites (Cayuela et al., 2017), para determinar la madurez, firmeza, clorofilas y carotenoides (Cirilli et al., 2016). Otros utilizan espectroscopía de impedancia (EIS) para la determinación de peróxidos en muestras de aceite (Grossi et al., 2014). La determinación de roturas internas en los tejidos de la aceituna es otro de los usos de esta técnica, ya que la rotura de las células provoca la pérdida de agua y el enranciamiento de la misma (Moschetti et al., 2015) y para la determinación de humedad, grasa y acidez residual de diferentes AOVE (Salguero-Chaparro et al., 2013).

Algunos autores han combinado esta técnica con el uso de nariz y lenguas artificiales, a pesar de que esto añade datos complementarios resulta una técnica menos práctica debido a que hay que realizar más tratamiento de datos sin obtener un resultado mejor y con el añadido del aumento de costes (Forina et al., 2017).

El análisis cuantitativo y cualitativo NIRS se basa fundamentalmente en la obtención de espectros de absorción ($\log 1/R$ o $\log 1/T$) de un grupo de muestras de características cuantitativas (proteína, grasa, ácidos grasos) o cualitativas (variedad, color, tipo de procesamiento tecnológico, pureza, procedencia geográfica, etc.) conocidas, para posteriormente obtener un modelo quimiométrico (ecuación de calibración en análisis cuantitativo o un modelo de clasificación en análisis cualitativo), que relaciona la información espectral con las características de las muestras. Una vez que el modelo quimiométrico ha sido convenientemente validado, servirá para predecir características de muestra desconocidas, tras la obtención de sus espectros NIRS.

II.II.2.2 Métodos quimiométricos

Existen diferentes métodos quimiométricos (regresión en componentes principales, regresión en mínimos cuadrados parciales, redes neuronales, etc.) utilizados para la obtención de los modelos de predicción cuantitativos (Chen et al., 1995; De Pedro et al., 1997).

La información científica disponible indica, que independientemente del método de calibración, entre los aspectos más críticos para la obtención de modelos quimiométricos NIRS de alta precisión se encuentran, la selección del grupo de muestras de referencia y la calidad de los datos de referencia. En el caso particular del análisis cualitativo es necesario contar con muestras perfectamente conocidas, para la construcción del modelo predictivo y el éxito de su aplicación.

Por otro lado, la precisión de estos modelos, depende en gran medida de las características del grupo de calibración (colectivo de muestras) utilizado para generar los modelos quimiométricos (relación matemática entre valores espectroscópicos y valores analíticos y/o cuantitativos). Dichas características hacen referencia entre otras al número y distribución de los parámetros analíticos y/o cualitativos, a la representatividad de la población futura sobre la que aplicar el modelo.

La importancia del colectivo de calibración ha sido ampliamente reconocida por la comunidad científica NIRS, y en general se acepta la existencia de diversas estrategias diferentes para la obtención de modelos de calibración o de obtención de librerías espectrales para el análisis cualitativo. La primera de ellas consiste en la construcción de los denominados modelos específicos para su aplicación a una población cerrada de muestras. Otra estrategia sería la obtención de los denominados modelos globales o universales (Shenk et al., 1996). Estos se podrían aplicar por el contrario a poblaciones más amplias que agrupasen muestras provenientes de diferentes localizaciones geográficas, áreas climáticas, procesos tecnológicos, etc. Sin embargo, la obtención de estos modelos globales y robustos para un determinado producto y aplicación conlleva un elevado coste analítico y temporal pudiendo necesitarse varios años para su generación (Shenk et al., 1996).

II.III.2.2.1 Análisis cualitativo

Los métodos de reconocimiento de pautas son un conjunto de técnicas quimiométricas que permiten realizar análisis cualitativos de manera rápida y simple. Estos métodos están basados en la comparación de la muestra objeto de estudio con una

muestra tomada como referencia según criterio de correlación. Estos métodos discriminan entre si los objetos pertenecen o no a una misma o distinta categoría, en muchos casos se desconoce si la muestra pertenece a un mismo tipo que otra o deliberadamente se pueden poner muestras de distinto tipo en el análisis.

Uno de los métodos de clasificación de muestras más aplicados es el análisis por componentes principales (PCA), este método no aplica diferencia entre muestras, aunque permite realizar una reducción de las variables a tratar hasta llegar a un espacio de dos o tres dimensiones para determinar el grado de similitud entre diferentes muestras (Perguero, 2010).

II.III.2.2.2 Análisis cuantitativo

Durante el proceso de calibración de la espectroscopía NIR se deben tener en cuenta una gran cantidad de variables, estas variables no se pueden asignar a un analito en concreto, por tanto, es necesario realizar una serie de métodos de calibración que asignen determinadas variables a una propiedad de la muestra y los analitos que contiene. Las más aplicadas son los métodos de regresión lineal múltiple (MLR) y la regresión por mínimos cuadrados (PLS).

II.III.2.2.2.1 Regresión lineal múltiple

Para el análisis cuantitativo mediante regresión lineal múltiple (MLR) es necesario realizar una selección previa de las variables que se van a aplicar a la hora de realizar la ecuación de regresión, este tipo de regresión establece una relación lineal entre la señal que emite la muestra y la propiedad analítica a determinar mediante un ajuste de mínimos cuadrados. Para llevar a cabo este tipo de metodología hay que tener seleccionar con cuidado las longitudes de onda con las que va a tratarse la muestra, muchas veces esto es complicado debido a la complejidad de la muestra y por existir diferentes variables que puedan dan información a una misma longitud de onda.

Se establece una relación entre absorbancia y concentración que es inversamente proporcional a la ley de Lambert-Beer que hemos tratado con anterioridad, la concentración determinada será una función de absorbancia a determinada longitud de onda, es decir, para la determinación de la concentración en la muestra se multiplicará el valor de absorbancia determinado por el coeficiente de proporcionalidad que se haya obtenido.

II.III.2.2.2.2 Regresión por mínimos cuadrados

La regresión por mínimos cuadrados (PLS) realiza una descomposición de los datos obtenidos en factores, usa la información de la concentración para la descomposición de la matriz de respuestas.

Si se realiza el cálculo de una sola propiedad se denomina PLS1, y se considera una simplificación del método estándar, PLS2, el cual se usa para la determinación de múltiples variables de manera simultánea.

II.II.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) fue desarrollada a finales de los años cuarenta para estudiar los núcleos atómicos. En 1951, los químicos descubrieron que la espectroscopia de resonancia magnética nuclear podía ser utilizada para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de H-1, C-13, F-19 y P-31. Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar, sin embargo, cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se muestra en la Figura II.12, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín alfa,

mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β (beta) (Skoog et al., 2010).

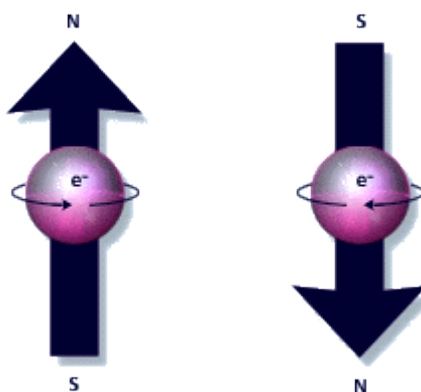


Fig. II.12. Estados de spin.

Existen más núcleos en el estado de espín alfa que en el β pero aunque la diferencia de población no es enorme sí que es suficiente para establecer las bases de la espectroscopia de RMN.

La diferencia de energía entre los dos estados de espín alfa y β , depende de la fuerza del campo magnético aplicado (H_0). Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín. En la Figura II.13 se representa el aumento de la diferencia energética entre los estados de espín con el aumento de la fuerza del campo magnético.

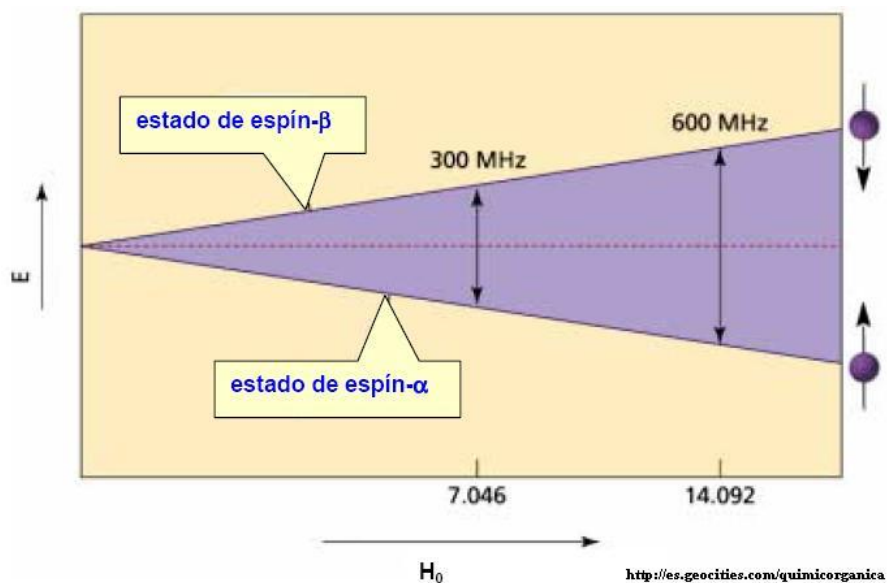


Fig. II.13. Diferencia energética estados de spin con el campo magnético.

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β . Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias (rf) del espectro electromagnético por eso se le denomina radiación rf. Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN. El término resonancia magnética nuclear procede del hecho de que los núcleos están en resonancia con la radiofrecuencia o la radiación rf. Es decir, los núcleos pasan de un estado de espín a otro como respuesta a la radiación rf a la que son sometidos. La siguiente ecuación muestra la dependencia entre la frecuencia de la señal y la fuerza del campo magnético H_0 (medida en Teslas, T) (Skoog et al., 2010).

$$\Delta E = h \nu = h \frac{\gamma}{2\pi} H_0 \quad \text{donde } \gamma = \text{radio giromagnético}$$

El valor del radio giromagnético depende del tipo de núcleo que se está irradiando; en el caso del H-1 es de $2.675 \times 10^8 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Si espectrómetro de RMN

posee un imán potente, éste debe trabajar a una mayor frecuencia puesto que el campo magnético es proporcional a dicha frecuencia. Así, por ejemplo, un campo magnético de 14.092 T requiere una frecuencia de trabajo de 600 MHz.

Hoy en día los espectrómetros de RMN trabajan a 200, 300, 400, 500 y 600 MHz. En alta resolución y en torno a 10 MHz en baja resolución (Castañeira, 1989).

II.II.3.1 El espectrómetro de resonancia magnética nuclear

A continuación, en la Figura II.14 se muestra de forma esquemática los principales componentes de un equipo para medidas de resonancia magnética nuclear.

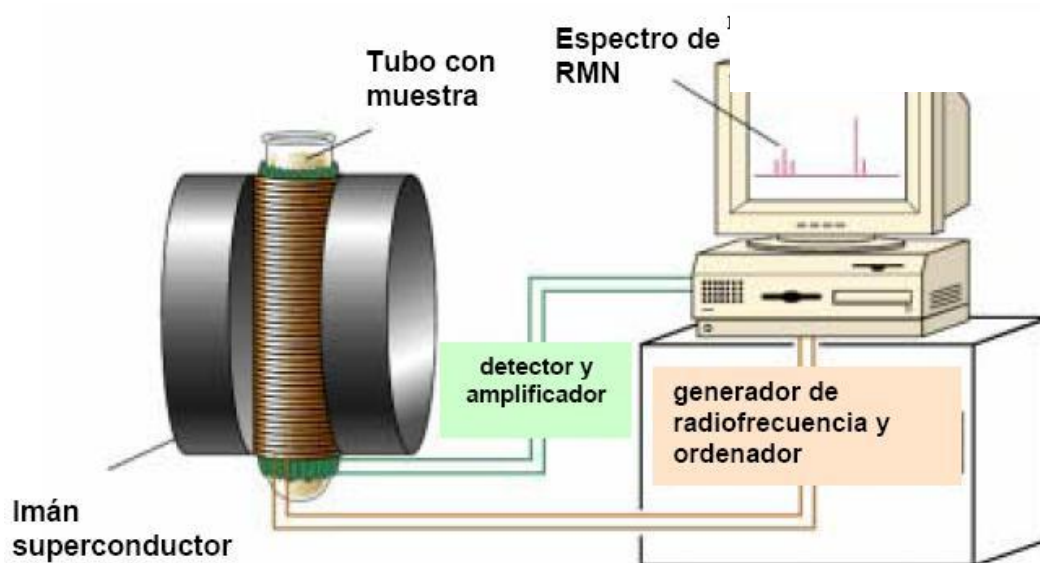


Fig. II.14. Componentes de un equipo de RMN.

El espectrómetro de resonancia magnética nuclear consta de cuatro partes:

- Un imán estable con un controlador que produce un campo magnético preciso.
- Un transmisor de radiofrecuencias capaz de emitir frecuencias precisas.

- Un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra.
- Un ordenador y un registrador para realizar las gráficas que constituyen el espectro de RMN.

Para la obtención de un espectro RMN se mezcla la muestra con una pequeña cantidad de disolvente y se introduce en un tubo de vidrio que encaja dentro de la bobina que crea el campo magnético del aparato y se le hace girar sobre su eje vertical

El campo magnético se mantiene constante, a su vez breves pulsos de radiación rf excitan a todos los núcleos de manera simultánea. El pulso de radiofrecuencia cubre un rango elevado de frecuencias y los protones absorben aquella radiación que mejor se adapte a ellos para entrar en resonancia y cambiar su estado de espín. Al volver estos núcleos a su posición inicial se emite una radiación de frecuencia igual al incremento de energía entre sus diferentes estados de espín, la intensidad de la frecuencia disminuye conforme al tiempo en el que todos los núcleos vuelven a su estado inicial.

Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN). Un espectro FT-RMN puede registrarse en 2 segundos (Skoog et al., 2001).

La resonancia magnética nuclear es una herramienta importante en el estudio de alimentos lipídicos, grasas y aceites. La RMN de baja resolución ha sido usada durante mucho tiempo para determinar el contenido graso en muestras sólidas; así mismo la RMN de alta resolución ^1H se ha usado en el estudio de alimentos lipídicos, fundamentalmente por la gran información que los altos campos magnéticos pueden proveer en un corto periodo de tiempo (Fennema, 1971).

II.II.3.2 Resonancia magnética nuclear ^1H

Los núcleos, o los carbonos en moléculas orgánicas, no están aislados, sino que están rodeados de electrones que tienen efecto sobre el campo que se le aplica a la

muestra y sobre la molécula, estos electrones generan un campo magnético inducido contrario al aplicado en RMN.

La nube electrónica que existe alrededor de cada núcleo actúa como corriente eléctrica que por el movimiento inducido por el campo magnético generará un campo magnético inducido opuesto a este. Esto nos da como resultado que el campo magnético que aplicamos no llega totalmente al núcleo de los analitos, sino que se ve apantallado por los electrones que hay a su alrededor.

El efecto de apantallamiento es algo importante a tener en cuenta ya que el campo magnético efectivo (H_{ef}) que va a sentir un protón en la molécula va a ser siempre menor al campo aplicado y para que el núcleo entre en resonancia el campo externo debe ser mayor.

$$H_{ef} = H_o - H_{loc}$$

Si todos los protones (1H) de una molécula estuvieran apantallados de la misma forma todos entrarían en resonancia con la misma combinación de frecuencia i campo magnético, pero teniendo en cuenta la estructura de las moléculas, la presencia de radicales, etc. Esto no se da lugar, por tanto, el apantallamiento nunca será de igual forma en todos los protones de una misma molécula, provocando diferentes frecuencias de emisión. Esto nos da como resultado un espectro de frecuencias de cada conjunto de núcleos, por lo que el RMN es una gráfica de intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los núcleos de los analitos.

Las diferencias en las frecuencias de absorción en RMN debido a los apantallamientos se les conoce como desplazamientos químicos, es difícil cuantificar el campo magnético que un protón es capaz de absorber para poder discernir entre diferentes protones, ya que las absorciones pueden variar solo unas milésimas. Para ello se usa un compuesto de referencia, patrón interno, la diferencia de la intensidad del campo magnético que se necesita para la resonancia de los protones de la muestra y de los del patrón interno se puede medir con mayor exactitud

Para la interpretación de los espectros de resonancia magnética nuclear de protones hay que tener en cuenta una serie de consideraciones, en primer lugar hay que

tener en cuenta el número de insaturaciones del analito, la presencia de anillos, dobles o triples enlaces, etc. y relacionar las áreas de integración de los picos con el número de protones totales que hay en la estructura y así obtener el número de protones que representa cada pico. La presencia de grupos -NH y -OH puede dar lugar a picos más anchos. La presencia de aldehídos, anillos aromáticos y terminales alquinos pueden modificar la señal de salida (Cardá et al., 2011).

II.II.3.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear ^{13}C

La RMN de ^{13}C es complementaria a la ^1H , la espectroscopia de ^{13}C se encarga de determinar el entorno magnético de los átomos de carbono, mientras que la ^1H se encarga de obtener la estructura del esqueleto carbonado a través de los átomos de hidrógeno.

Aproximadamente el 99 % de los átomos de carbono en una muestra natural es de ^{12}C (Cardá et al., 2011). El isótopo tiene un par de protones y número par de neutrones, por tanto, no tiene espín magnético y no puede dar señal de resonancia magnética nuclear. El isótopo ^{13}C es poco abundante, pero tiene un número impar de neutrones, esto le confiere un espín nuclear magnético de 1/2. La espectroscopia de resonancia magnética nuclear ^{13}C es menos sensible que la ^1H debido a la poca presencia de este isótopo de carbono y a que la frecuencia de resonancia es la cuarta parte que la que se puede dar en RMC de ^1H .

Los desplazamientos químicos del carbono son de 15 a 20 veces mayores que los de hidrógeno, esto es debido a que el carbono está unido a átomos que pueden ser apantallantes o desapantallantes, a eso hay que sumarle que la señal del espectro del ^{13}C son líneas verticales, no hay desdoblamiento de espín-espín, ya que como se ha dicho antes hay muy poca presencia de este isótopo (menos o igual al 1 %), hay poca probabilidad de que dos átomos ^{13}C sean adyacentes.

II.II.3.4 Aplicaciones de la RMN en la industria oleícola

La aplicabilidad de la resonancia magnética nuclear de baja resolución, con saturación de radiofrecuencias a la determinación de riqueza grasa en aceitunas, fue estudiada a principios de los 80 y posteriormente desarrollada y aplicada a la industria oleícola hasta tal punto que en la actualidad se sigue utilizando; fundamentalmente por las ventajas que presenta esta técnica por ser no destructiva y por hacer posible la determinación simultánea de riqueza grasa y de humedad con unos tiempos de análisis en torno a 10-20 segundos.

Si bien es cierto que los problemas de interferentes ocasionadas por la respuesta que ocasiona ante las radiofrecuencias el agua contenida en las aceitunas. En este sentido se consideran que existen varios tipos de agua ligada; se la puede definir como aquella porción del agua presente que tiene un menor punto de fusión, mayor punto de ebullición, menor tensión de vapor, etc., que el agua pura en estado libre. Así cuando se aumenta el nivel de radiofrecuencias, la respuesta del agua pura libre se hace cero al alcanzarse un cierto valor de aquél, mientras que la del agua ligada no se modifica (Fennema, 1976).

Por otro lado, la técnica de resonancia magnética nuclear de alta resolución es una poderosa herramienta capaz de generar una contribución relevante en el análisis de alimentos. Así existen métodos espectrales de asignación del espectro (técnicas selectivas 2D y 1D); aplicaciones al análisis cuantitativo y cualitativo de alimentos, en particular para el aceite de oliva existen aplicaciones para la caracterización de los aceites de oliva, la determinación de componentes menores como el escualeno, cicloartenol y clorofilas; aplicaciones al análisis sensorial y su relación con los datos de RMN incluso su caracterización geográfica (Mannina et al., 2002; Guillén et al., 2001; Silva, 2003).

Algunos autores han usado esta técnica para el análisis de componentes minoritarios de los aceites de oliva (Ruiz-Aracama et al., 2017), la medida de color de los diferentes aceites, y la presencia y concentración de tocoferoles y polifenoles (Borges et al., 2017; Piscopo et al., 2016).

En la Tabla II.1 se incluyen algunas de las metodologías más resaltables en las que se utilizan las técnicas NIR y NRM para el análisis de derivados oleícolas.

Tabla II.1. Métodos basados en NIR Y NRM en aceites y otros productos oleícolas

Analitos y muestras	Muestra	Determinación^a	Características analíticas^b	Referencia
Aceite de oliva virgen extra	Almacenamiento de muestras a 4 °C previo análisis. 3 g de muestra se calienta a 120 °C	Colorímetro Rancimat	ANOVA y PCA para el estudio estadístico	Borges et al., 2017
Aceite de oliva virgen extra	20 mL a 30 °C de muestra en cubeta	NIRS NIR-Vis NIR-AOTF		Cayuela y García, 2017
Aceites comestibles	Extracción sólido-líquido (SLE), 10 gramos de muestra se extraen con metanol (80 ml)	NIR HPLC-FLD (DAD)	RSD: 7,37 %	Cirilli et al., 2016
Aceite de oliva virgen extra	Muestra centrifugada a 3000 rpm previo análisis a 35 °C	NIR-Nariz Artificial-UV-VIS	Fiabilidad: 92-100 %	Forina et al., 2017.
Aceite de oliva virgen extra	50 ml de muestra a 20 °C	Espectroscopia de Impedancia (EIS).	20 Hz- 2MHz	Grossi et al., 2014.
Aceite de oliva virgen extra	Muestras se miden a condiciones ambientales.	MIR FT-NIR	r: 0.9 Límite de detección para aceite adulterado: 5 y 10 % dependiendo	Gurdeniz y Ozen, 2009

		del tipo de aceite Límite de Error: 1.04-1.32		
Aceite de oliva virgen extra	Muestras se calientan a 110 °C 96 h se retira submuestra cada 5 horas y analiza	Espectroscopia de fluorescencia	r:0.924	Guzman et al., 2014
Aceite de oliva virgen	Muestras se analizan a 20 °C	FT-NIR	Correlación de las propiedades estudiadas: r _{ácidos grasos} : 0.84-0.96 r _{hidroxytyrosol} : 0.86-0.88 r _{fruity} : 0.87 r _{amargor} : 0.85	Inarejos-García et al., 2013.
Aceite de oliva virgen extra y otros aceites	0,1 g de muestra se extrae con MeONa y 10% metanol en TBME. Se añade 8 mL de n-hexano y se extrae	HPLC-CAD (Corona Charged Aerosol Detector)	Modelo estadístico basado en PLS. R ² : 0,99 RSD: 5 %	Jiménez-Carvelo et al., 2017.
Aceitunas	Muestras se mantienen a 25 °C y con un 65 % de humedad relativa previo a análisis	NIR-Vis	r: 0,87-0,9	Jiménez-Jiménez et al., 2012
Aceite de oliva virgen extra	0,1 g de muestra se le añade 0,3 mL de MeOH NaOH 2N, se centrifuga y extrae previo análisis cromatográfico	GC-FID UV-Vis ICP-AES IRMS	LOD: 0,01-558 µg/kg Tasa de correcta clasificación: 83-95 %	Karabagias et al., 2013.

Aceite de oliva virgen	Análisis a 21 °C	NIR	Análisis por PCA y SIMCA.	Laroussi-Mezghani et al., 2015.
Aceituna y aceitunas	Separación de aceitunas con roturas visibles.	NIR NIR-AOTF	0.0 % falsos negativos 12.5 % falsos positivos 6.25 % error total	Moscetti et al., 2015.
Aceite de oliva virgen	Almacenamiento de muestras a 4 °C previo análisis.	UV-Vis ICP-AES IRMS	Media tocoferoles 260 mg/kg Media polifenoles 300 mg/kg	Piscopo et al., 2016
Aceite de oliva virgen extra	Muestras centrifugadas a 11.000 rpm durante 10 min a 20 °C previo a análisis	UV-Vis ICP-AES IRMS	100% acierto en la localización de aceites.	Pizarro et al., 2013.
Aceite de oliva virgen extra	Filtrado previo a análisis	THz-TDS	Capacitancia: 500-512 kHz Contenido agua: 178-1321 mg/kg r: 0,959	Ragni et al., 2013.
Aceitunas	No pretratamiento, se almacenan a 5 °C y 90 % humedad previo a análisis	NIR-Vis	RPD: humedad 2.76% grasa 2.37% acidez residual 1.6%	Salguero-Chaparro et al., 2013.
Aceites	No pretratamiento de muestra	FT-NIR	Tasa de predicción: 72-100 %	Sinelli et al., 2010.

Aceite de oliva virgen extra	Muestras (200 µl) se depositan junto a 400 µl de cloroformo deuterado 0,03 % TMS	NRM-1H	Ruiz-Aracama et al., 2017
-------------------------------------	--	--------	---------------------------

^aSIMCA: Modelado de analogías de clases, PCA: Análisis de componentes principales, ICP-AES: Espectroscopía de emisión atómica, IRMS: Espectroscopia de masas de relaciones isotópicas, RMS: Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

^bANOVA: análisis de la varianza, LOD: límite de detección, r: coeficiente de correlación, RSD: desviación estándar relativa.

II.III. Métodos basados en la determinación cromatográfica

II.III.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica de las más versátiles y potentes para la determinación de sustancias volátiles y estables térmicamente en un laboratorio con una alta resolución y sensibilidad.

La mayor limitación de esta técnica es la temperatura de trabajo, algunas de las columnas cromatográficas son capaces de alcanzar el rango de 350-400 °C de máxima, por tanto, los compuestos de alto peso molecular se verán con dificultades o imposibilidad de ser determinados mediante este método. Para solucionar este problema se recurre a la derivatización de estos compuestos para bajar su punto de ebullición o hacerlos estables térmicamente, siendo así posible su determinación mediante cromatografía de gases.

El principio de separación de la cromatografía de gases se basa en la interacción de los analitos entre una fase estacionaria, normalmente es un sólido o un líquido fijado a las paredes de la columna cromatográfica, y una fase móvil gaseosa (gas portador). Este gas se comporta de manera inerte frente a los analitos y su única función es la de su transporte, mientras que la interacción con la fase estacionaria es la que producirá la separación de los analitos. Los gases portadores más empleados son el helio, nitrógeno e hidrógeno. En la Figura II.14 se incluye un esquema de un cromatógrafo de gases.

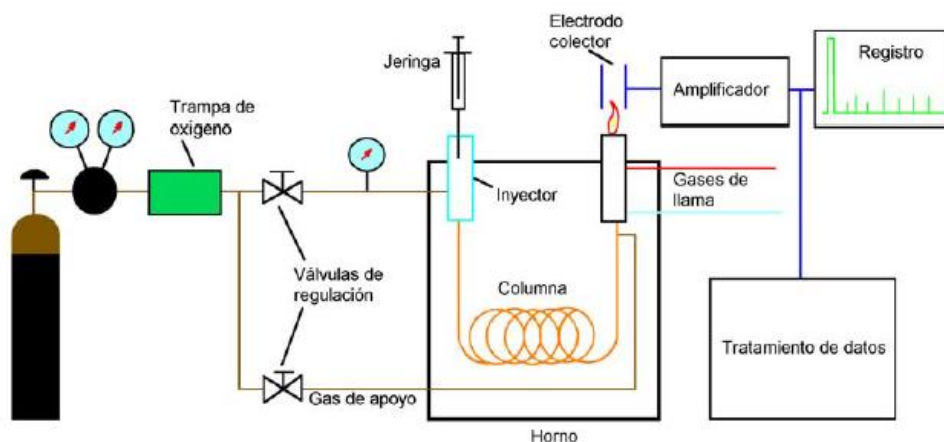


Fig. II.14. Esquema de un cromatógrafo de gases (Fleurence et al., 2016).

II.III.1.1 *Columna cromatográfica*

La separación de los analitos se realiza normalmente por diferencias de selectividad entre la fase estacionaria y ellos, en el mercado hay infinidad de material de empaquetamiento en función de las necesidades requeridas por los analitos.

II.III.1.1.1 Columnas empaquetadas.

Estas se construyen usando tubos de diferentes materiales los cuales van rellenos de con un soporte sólido en el que se encuentra la fase estacionaria, tradicionalmente se han utilizado para este tipo de columnas materiales como el cobre, acero inoxidable, aluminio y vidrio con un diámetro interno que puede ir desde los 2 a los 5 milímetros y con una longitud que va desde los 30 centímetros hasta los 5 metros (Cela et al., 2010).

El mayor problema de este tipo de columnas es el que la impregnación del soporte con la fase líquida sea de manera homogénea. Su llenado se lleva a cabo en seco, disponiendo el tubo metálico recto y enrollando tras rellenarse, el problema fundamental es la dificultad que existe para crear un lecho uniforme, sin fracturas, etc.

II.III.1.1.2 Columnas capilares.

Estas columnas están fabricadas con materiales como la sílice fundida o vidrio de borosilicato, las más usadas son las de sílice fundida. Actualmente se encuentran tres tipos de columna, columnas capilares de paredes impregnadas (WCOT), columnas capilares con soporte impregnado (SCOT) o de capa porosa (PLOT) y columnas capilares de sílice fundida (FSOT).

Las columnas de tipo WCOT y FSOT se fabrican a partir de sílice pura en la que se ha eliminado cualquier resto metálico que pudiera haber en la sílice, debido a que la columna en sí es realmente frágil, normalmente se recubren con una capa de poliimida, lo cual le confiere la propiedad de poder ser enrollada sin ser dañada, gracias a su poca reactividad, gran flexibilidad y resistencia son las más usadas en la actualidad.

En las columnas cromatográficas para cromatografía de gases se busca que la fase estacionaria que está fijada en ella tenga una baja volatilidad, tenga una gran estabilidad térmica e inercia química.

Algunos de los materiales más usados como fase estacionaria son el polidimetilsiloxano, para compuestos de poca polaridad, poli(fenilmetildifenil)siloxano, para ésteres metílicos de ácidos grasos y compuestos halogenados, poli(fenilmetil)siloxano, para pesticidas, glicoles y compuestos esteroideos y polietilenglicol para compuestos polares, alcoholes y aceites esenciales.

El lecho de la columna se presenta de manera entrelazada para evitar que el interior de la columna se pierda durante los análisis cromatográficos y los procesos de elución y limpieza.

Además de la correcta elección de la columna cromatográfica y del detector a emplear, tema que se tratará más adelante, el método de inyección de la muestra es algo a tener en consideración. El método de inyección, el liner empleado, la temperatura del portal de inyección, en modo con o sin división, y el volumen inyectado deben ser elegidos en función del tipo de analito a determinar

II.III.1.2 *Control de la temperatura en la columna*

La temperatura de la columna se supone coincidente con la del horno cromatográfico (Dabrio et al., 2000), la temperatura en el horno se controla y mide con exactitud. Si el gas portador de la columna se controla mediante regulación de presión, el flujo a través de la columna va a ser variable ya que cambiará su viscosidad, aunque el mayor efecto de la temperatura sobre la retención viene dado por el volumen de retención de la columna.

Si la columna elegida tiene una buena selectividad frente a los analitos deseados, estos serán separados y eluidos por orden en función de su temperatura de ebullición, en cromatografía de gases se puede trabajar en elución a temperatura constante o mediante una rampa de temperaturas programada.

Para la elución de compuestos con una temperatura constante se requiere que la muestra no contenga un gran número de analitos y que a su vez estos no sean muy diversos y presenten una temperatura de ebullición similar, este tipo de elución presenta unos tiempos de análisis demasiado altos y normalmente se recurre a una rampa de temperaturas programada.

La temperatura programada consiste en la variación de temperaturas a lo largo del análisis cromatográfico, un incremento de temperatura en función de un tiempo determinado. La variación de la temperatura hace que el factor de retención del compuesto o compuestos en la columna varíe. El uso de este tipo de programa afecta a la anchura de los picos, estos picos suelen ser más estrechos y altos que si hiciéramos el mismo análisis de forma isoterma. Con respecto al tiempo y al volumen de retención se observa que el tiempo de análisis se reduce de manera significativa, haciéndolo más eficiente, aunque a diferencia de si usamos un programa isoterma, no se podrá saber el volumen de retención al estar la temperatura en variación.

II.III.1.3 Detectores

El detector es el encargado de proporcionar información sobre la presencia de los analitos en una muestra, estos pueden clasificarse mediante su fundamento físico en varios grupos: conductividad térmica, ionización, electroquímicos y espectroscópicos (Dabrio et al., 2000).

Los detectores de conductividad térmica se basan en el uso de filamentos para la detección de analitos, respondiendo ante el cambio de disipación de calor de la cámara cuando un analito pasa a través de él, en la actualidad están en desuso por su baja sensibilidad y selectividad.

Los detectores de ionización se basan en la capacidad para ionizar los solutos usando energía térmica, química, electromagnética o radioactiva (Dabrio et al., 2000). La respuesta de este tipo de detectores se basa en la capacidad de ionizar los analitos y de la detección de los mismos. Existen diferentes tipos de detectores basados en este fenómeno:

- Detector de ionización en llama (FID).
- Detector termoiónico (TID, NPD).
- Detector de captura de electrones (ECD).
- Detector de fotoionización (PID).

Para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos y de plaguicidas se han utilizado fundamentalmente los detectores FID y ECD, los cuales se describen a continuación.

- Detector de ionización en llama (FID).

En el caso del detector FID la respuesta ante la presencia de los analitos se produce por combustión de los compuestos orgánicos en una llama en presencia de aire y oxígeno, la llama está bajo una diferencia de potencial de entre 100 y 300 V. Ante la presencia de los analitos en la llama se produce un incremento en la cantidad de corriente, que es detectado por el detector situado sobre la llama y nos dará una respuesta en función de la composición de los compuestos, a mayor número de enlaces C-H y la presencia de O mayor será la respuesta de este detector. En la Figura II.15 se incluye un esquema de un detector FID.

El FID es un detector muy fácilmente calibrable, con una alta estabilidad y sensibilidad.

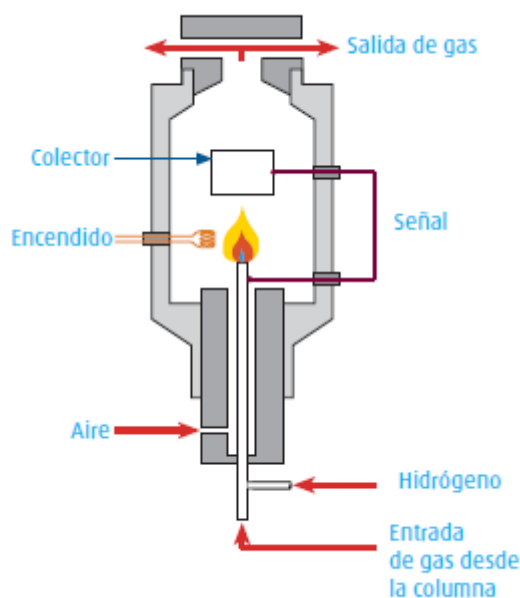


Fig. II.15. Esquema detector FID (Abelló Linde, 2017).

- Detector termoiónico (TID, NPD).

Derivado del detector FID es el sistema de detección de nitrógeno-fósforo (NPD), que permite la cuantificación de heteroátomos que incluyan nitrógeno y fósforo debido a que la ionización de estos grupos se cataliza con la presencia de una perla de rubidio (Figura II.16).

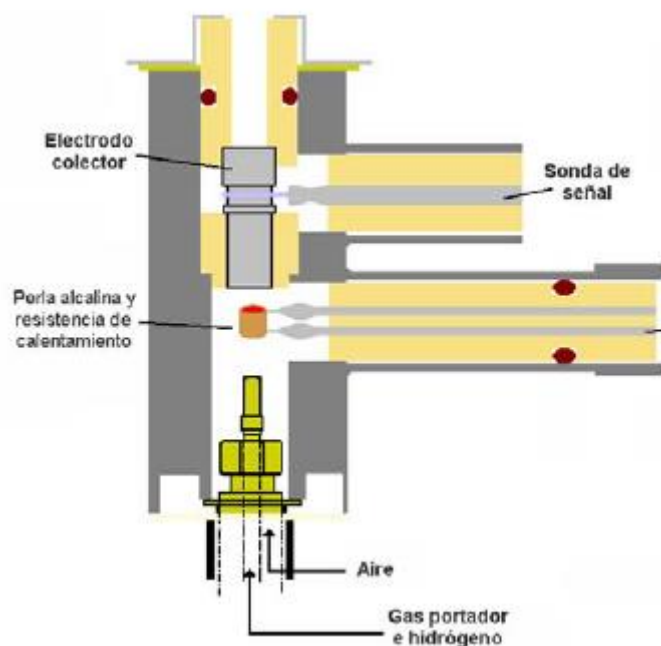


Fig. II.16. Detector NPD (Fleurence et al., 2016).

- Detector de captura de electrones (ECD).

Es uno de los detectores que más se han aplicado en el análisis de muestras medioambientales, gracias a que tiene una alta sensibilidad y selectividad con compuestos con grupos electronegativos. La detección de plaguicidas que contienen halógenos ha sido una de las aplicaciones de este tipo de detector. En él se produce la ionización del gas portador, nitrógeno o mezcla argón-metano son los más usados, junto a una corriente lenta de electrones, los compuestos electronegativos al llegar a esta corriente de plasma de electrones capturan algunos, formando iones negativos pesados, estos al ser más lentos que los electrones provocará que la corriente disminuya.

La respuesta final no sólo corresponde a la naturaleza de la muestra introducida sino al tipo de fuente, diferencia de potencial aplicado, temperatura y al flujo del gas portador. Aunque este tipo de detector es altamente sensible se va a ver limitado su respuesta lineal al entorno de dos órdenes de magnitud.

La aplicación de la cromatografía de gases se ha llevado a cabo por algunos autores para la separación de diferentes plaguicidas piretroides en muestras de aceite de oliva usando un detector FID, reportando límites de detección (LODs) de entre 0,02 y 0,16 $\mu\text{g/Kg}$ y una desviación estándar relativa (RSD) de entre 2 y 13 % (Farajzadeh et al., 2014). Otros autores han aplicado detectores ECD y TSD en combinación con LLE y GPC para la detección de mezclas de plaguicidas en aceites, con recuperaciones entre 70 y 121 % y 71 y 114 %, respectivamente (Guardia-Rubio et al., 2007). Los mismos autores han realizado en combinación con la técnica extractiva SPE obteniendo unos LODs entre 1 y 4 ng/L y recuperaciones entre 79 y 129 %.

En la Tabla II.2 se recogen los métodos basados en la determinación mediante cromatografía de gases para la determinación de los analitos en muestras de aceites y orujos.

Tabla II.2. Métodos basados en GC para la determinación de plaguicidas y PAHs en aceites y otros productos oleícolas.

Analitos y muestras	Extracción y limpieza de muestra	Determinación	Características analíticas^a	Referencia
Mezcla de plaguicidas en aceite de oliva y aceitunas	Extracción líquido-líquido (LLE) de 5 g de muestra con 10 mL ACN y filtrado del extracto previo a determinación	HPLC-MS/MS GC-MS/MS	LOQ: 10 µg/Kg R: 70-120 % RSD: 20-25 %	Agnastopoulos et al., 2013
Benzo(a)pireno en aceite de oliva	Extracción en fase sólida (SPE) presurizada, 0,5 gramos de muestra se hacen pasar por sorbente de Florisil y RP-C18, se eluye con 10 mL de ACN	GC-MS HPLC-FLD	LOD: GC-MS: 1 ng/g HPLC- FLD: 0.5 ng/g R > 80 %	Bogusz et al., 2004
Phtalatos en aceite de oliva	Cromatografía en geles permeables (GPC), 1 g de muestra se diluye en fase móvil y una alícuota de 5 mL se pasa a través.	GC-MS/MS (Trampa iónica)	R: 71.1-112 % RSD: 9.7 % LOD: 0.1-148 µg/Kg	Cavaliere et al., 2008
Plaguicidas piretroides en aceite de maíz, colza y oliva	Extracción líquido-líquido (LLE) 0,5 mL de muestra se extrae con 4,5 mL de n-hexano y 1 mL de DMF, el extracto se pasa a microextracción líquido-líquido.	GC-MS GC-FID	RSD: 2-13 % R: 85-109 % LOD: 0.02-0.16 mg/Kg	Farajzadeh et al., 2014

Mezcla de plaguicidas en aceite de oliva y aceitunas	Dispersión en fase sólida (MSPD), 1 g de muestra se mezcla con aminopropil, se pasa a una columna con 2 g de Florisil y se eluye con 10 mL ACN.	GC-MS HPLC-MS/MS	R:85-115 % RSD<10 % LOD: LC-MS < 5 µg/kg GC-MS 10-60 µg/kg	Ferrer et al., 2005
Mezcla de plaguicidas en aceite de oliva	Extracción líquido-líquido (LLE), 2 g de muestra se diluye en 10 mL de ACN/n-hexano, el extracto se diluye en fase móvil y se aplica cromatografía en geles permeables (GPC)	GC-ECD GC-TSD GC-MS/MS	RSD <16 % R: GC-ECD 70-121 % GC-TSD 71-114 % GC-MS/MS 82-134 %	Guardia-Rubio et al., 2007
Mezcla de plaguicidas en aguas de cooperativas oleícolas	Extracción en fase sólida (SPE), la muestra se pasa por RP-C18 y se eluye en 1mL de diclorometano, se seca y residuelve en n-hexano	GC-TSD GC-ECD	RSD < 20 % LOD 1-4ng/L R: 79-129 %	Guardia-Rubio et al., 2007
Mezcla de plaguicidas en aceite de oliva virgen ecológico	Extracción en fase sólida (SPE), 3mL de muestra se pasa por el cartucho de nanotubos de carbono, se eluye en 0,5 mL de acetato de etilo.	GC-MS	LOD:1.5-3.0 µg/L RSD: 3.4-8.8 % R: 79-105 %	López-Feria et al., 2009.

Mezcla de plaguicidas en aceites comestibles	Cromatografía en geles permeables (GPC), 2 g de muestra se añade 2 mL n-hexano y 10 mL de ACN, el extracto se seca y se reconstituye con fase móvil de GPC, 2 mL se pasan por la columna	GC-MS/MS (QqQ)	RL: 0.01-0.25 mg/Kg R:70-130 %	Marinas et al., 2010
PAHs en aceites de oliva virgen y virgen extra	Microextracción en fase sólida (SPME), 0,5 g de muestra se extrae con 3 mL de ACN, el resultado se extrae con 4 mL de n-hexano y se expone a la fibra.	GC-MS	LOQ: 0.17-0.37 µg/kg R: 0.3-14 % RL: 0.1-7.92 µg/kg	Purcaro et al., 2013
Volátiles en aceite de oliva	Microextracción en fase sólida (SPME), 10 g de muestra a 40 °C se deja junto a la fibra durante 30 min.	GC-MS	RSD: < 10 % LOD: 0.13-1.63 mg/kg	Romero et al., 2015
Mezcla de plaguicidas en aceite de oliva	Inyección directa a GC-MS, tras diluir la muestra en metanol:agua	GC-MS	LOD 0.1-0.3 mg/L R:19-92 % RSD: 6-9 %	Sánchez et al., 2004
PAHs en aceite de oliva	Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME), 2 g de muestra se expone 30 minutos a la fibra, la elución es directa en el	GC-MS	R: 74-128 % RSD <10 % LODs: 1 µg/kg	Vichi et al., 2005

	inyector			
PAHs en aceites de oliva virgen extra	Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME), 2 g de muestra se expone 30 minutos a la fibra, la elución es directa en el inyector	GC-MS	RSD: 2.9-15.8 % LOD: 0.2-1.0 µg/kg	Vichi et al., 2007
PAHs en aceites de oliva, cacahuete y aceites fritos	Extracción líquido-líquido (LLE) combinado con extracción en fase sólida (SPE), 1 g de muestra se eluye en 4 mL de n-hexano y 8 mL de DMF por duplicado, el extracto se seca y recompone con n-hexano y se pasa por el cartucho SPE.	GC-MS	RSD: 3.34-8.89 %	Wu et al., 2012

^a LOD: límite de detección, LOQ: límite de cuantificación, r: coeficiente de correlación, RSD: desviación estándar relativa, R: recuperación

II.III.2 Cromatografía líquida en columna

La cromatografía líquida en columna (cromatografía líquida de alta resolución, HPLC) comprende todas las técnicas cromatográficas en las que la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria se encuentra en una columna (Dabrio et al., 2000). La gran diferencia entre la cromatografía de gases y la cromatografía líquida en columna reside en el estado de la fase móvil, gases y líquidos respectivamente. La fase móvil tiene un papel importante en la cromatografía de líquido y la interacción con el soluto, la facilidad para cambiar la fase móvil y la amplitud de posibilidades hace posible que sea una técnica versátil y con una alta selectividad.

La fase estacionaria, por su parte, no es tan amplia como la de fases móviles, se agrupan en fase inversa, intercambio iónico, pares iónicos y exclusión molecular dependiendo de la forma de interactuar con los analitos durante la separación cromatográfica.

II.III.3.1 Fase inversa

El término fase inversa hace referencia a la polaridad de la fase estacionaria que hay en la columna cromatográfica, mientras que la fase normal se utiliza para nombrar a la fase estacionaria con polaridad mayor que la fase móvil, la fase inversa es todo lo contrario, esta tendrá una fase estacionaria apolar con una fase móvil más polar que ella.

Este tipo de fase es de las más usadas en la actualidad, debido en su gran parte a que este tipo de fases estacionarias son estables, reproducibles y de pequeño tamaño de partícula, esto permite tener una elevada velocidad de transferencia de materia. Las fases estacionarias más comunes en este tipo de fase inversa son las basadas en sílice con funcionalidad alquilo. También hay disponibles algunas más complejas formadas por polímeros, fases poliméricas u oligoméricas.

II.III.3.2 Intercambio iónico

Este tipo de cromatografía o de fase estacionaria es utilizada en el caso de que los analitos a determinar tienen carga eléctrica, en este caso se usan fases estacionarias

que tienen grupos funcionales con carga, de naturaleza polimérica o de sílice.

La fase móvil contiene un tampón que controla la carga de los solutos y una sal, que compite con los solutos en su interacción con las cargas de la fase estacionaria (Dabrio et al., 2000). Las cargas que están en el soporte cromatográfico están compensadas con contraiones, iones libres de carga opuesta, el paso de los analitos por la columna puede provocar el desplazamiento de estos contraiones y ser retenidos en su posición.

La selectividad de este tipo de columnas depende de la concentración de iones aplicada en la fase móvil y del pH, la variación en la fase móvil de los iones puede hacer que aumente o disminuya la retención de los analitos por parte de la fase estacionaria, el pH por su parte se encarga de la ionización de la muestra, teniendo también efecto sobre la retención.

Las fases estacionarias de intercambio iónico pueden ser de origen aniónico y catiónico, y dentro de cada grupo se diferencian entre fuertes y débiles. Los intercambiadores catiónicos fuertes suelen contener grupos sulfónicos mientras que los catiónicos débiles contienen carboxilatos. Por su parte en los intercambiadores aniónicos fuertes están formados por sales de amonio cuaternarias y aminas primarias en caso de los intercambiadores aniónicos débiles.

II.III.3.3 Pares iónicos

Este tipo de cromatografía separa los analitos que se encuentran ionizados, las separaciones se pueden llevar a cabo en las mismas columnas que las usadas en fase inversa. En este caso la fase móvil consiste en un tampón acuoso con un modificador que contiene un contraión de carga opuesta a la de los analitos.

La retención va a estar controlada por parámetros como son la naturaleza y concentración del contraión, la fuerza iónica de la fase móvil y el pH de esta. La influencia de estos factores sobre la retención y formación del par iónico será en relación a si se produce en la fase móvil o en la fase estacionaria.

Cuando la formación del par iónico se produce en la fase móvil la retención va a depender de la superficie de la parte hidrófoba del contraíón y de la carga del soluto, pero no de su tamaño. El aumento de la fuerza iónica gracias a la sal añadida hará que aumente la retención al entrar en competencia entre el analito y la sal por unirse al contraíón y por el aumento de la tensión superficial por la mayor concentración de sales. Por último, el pH de la fase móvil influye en la retención de los analitos a través de su efecto en su ionización, a mayor ionización mayor formación de par iónico y retención en la fase estacionaria.

II.III.3.4 *Exclusión molecular*

La cromatografía de exclusión (SEC) se basa en la exclusión en el tamaño de las moléculas a separar, como se ha mencionado con anterioridad, esta técnica se había aplicado con anterioridad como cromatografía en geles permeables.

La fase estacionaria va a actuar como tamiz molecular eluyendo primero las moléculas de mayor tamaño que el de la fase estacionaria, dando un tiempo de retención mayor para las moléculas de tamaño igual o inferior al del poro de esta.

Las columnas pueden estar formadas por matrices poliméricas o de sílice, el hecho de elegir una u otra dependerá de la naturaleza de la muestra a separar, normalmente se estudian diferentes sorbentes y tras obtener las curvas de calibrado se efectúa la elección. Además del peso molecular es importante la geometría de la molécula, ya que esto tiene un efecto determinante sobre su tamaño efectivo.

La diferencia entre este tipo de cromatografía y el resto es que en este caso no se realiza la selección de determinados analitos y el resto se desechan, sino que el único fin que tiene el uso de estas columnas es las de separar por tamaño molecular, no la de discriminar a los diferentes solutos.

II.III.3.5 *Detectores*

La función del detector no es otra que la de darnos información sobre los analitos que han sido separados, la elección del detector debe variar en función de las

necesidades y de la naturaleza de estos analitos.

A la hora de seleccionar un detector hay que tener en cuenta las características que afectan a la respuesta del mismo: ruido, deriva, zona lineal, selectividad, sensibilidad, etc. Los detectores más aplicados en HPLC son los de absorbancia ultravioleta-visible (UV-Vis) y fluorescencia (FD).

- Detector ultravioleta-visible

En este tipo de detector se hace incidir un haz de luz sobre la muestra con una o varias longitudes de onda y se mide la absorbancia de los analitos. La luz emitida por la lámpara se hace pasar por un monocromador o por un filtro, ahí se realiza la elección de la longitud de onda deseada y finalmente llega a la célula del detector por donde pasan los analitos.

En disoluciones diluidas la relación entre la luz incidente y la transmitida por la muestra sigue la ley de Beer-Lambert, siendo la concentración proporcional a la luz transmitida, o la diferencia de ambas. Lo más común es encontrar este tipo de detectores funcionando con una lámpara que emite una longitud de onda fija, las más aplicadas son las de mercurio, zinc y cadmio, es necesario el uso de filtros debido a que estas lámparas a las longitudes de onda de trabajo no emiten de modo monocromático.

La luz que procede de la lámpara es direccionada hacia la muestra por un sistema de lentes haciéndose pasar también por una célula referencia en el que se mide la absorbancia del resto de componentes que forman la fase móvil y así eliminar interferencias.

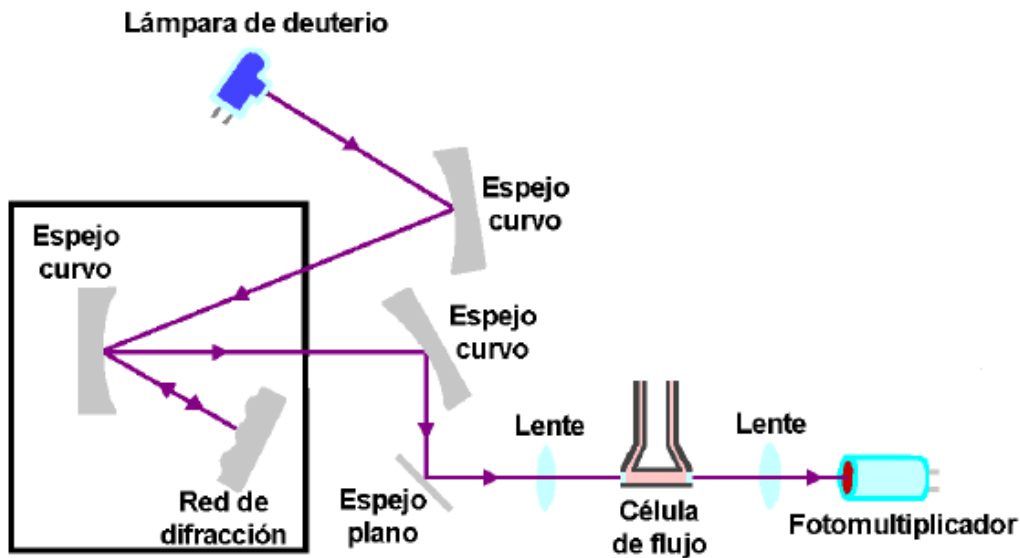


Fig. II.16. Detector UV-Vis de onda variable (Hernández, 2017).

Si se dispone de un sistema de longitud de onda variable se puede seleccionar la longitud de onda a la que los analitos presentan una mayor absorbancia, incluso seleccionando una longitud de onda en la que solo el analito en cuestión presente respuesta ante el haz de luz (Figura II.16).

Una variante es la matriz de diodos (*diodes array*), la cual puede registrar información de la muestra aplicando varias longitudes de onda de manera simultánea y dando información sobre tres parámetros diferentes: tiempo, absorbancia y longitud de onda. Este detector utiliza un policromador para dispersar el espectro de luz tras atravesar el detector, lo que permite monitorizar todas las longitudes de onda. La resolución depende del número de diodos y longitudes de onda cubiertas (Dabrio et al., 2000).

- Detector de fluorescencia

El principio de este detector es el de utilizar una propiedad de algunas moléculas de emitir radiación cuando son excitadas con luz UV-Vis, este tipo de detector presenta más sensibilidad que el UV-Vis pero en un rango lineal menor. Otro punto en contra es el hecho de que no todas las moléculas presentan esta propiedad, aunque en algunas

ocasiones se pueden formar derivados que si presentan esta propiedad. Aunque presenta la ventaja de poder detectar la presencia de determinados analitos que pueden coeluir con otros compuestos que no presenten esta propiedad.

Como se puede observar en la Figura II.17, este tipo de detector tiene una fuente de luz y un sistema de filtros, para excitación y para emisión, normalmente los detectores disponen del haz de luz fluorescente de manera perpendicular al de excitación para evitar así el ruido de fondo proveniente de la luz que incide.

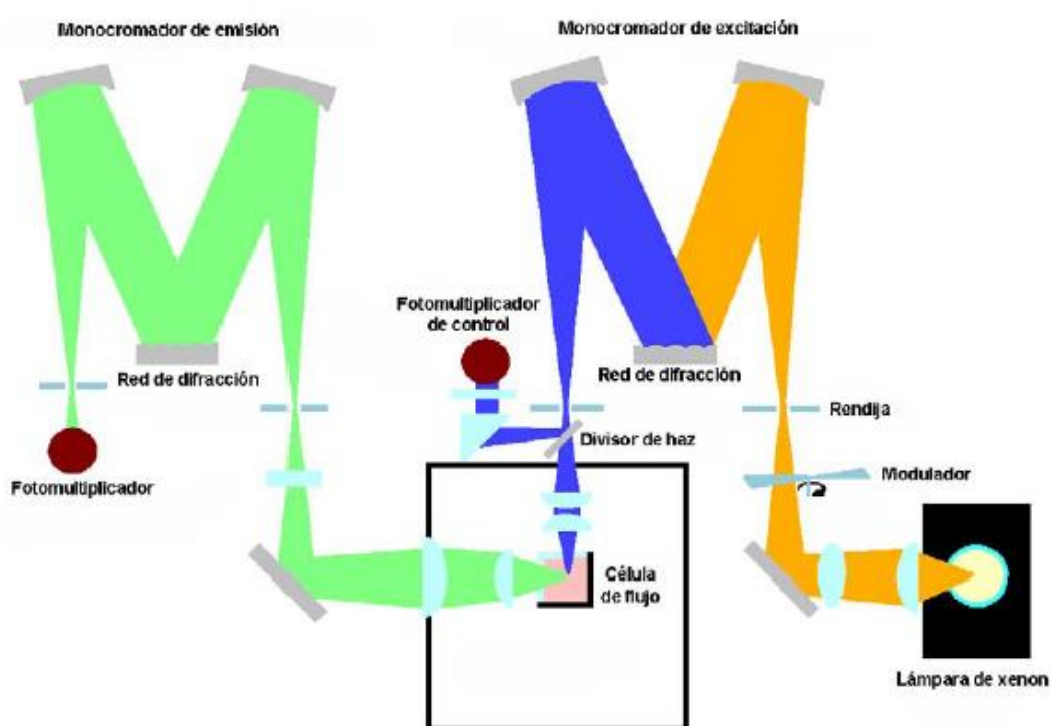


Fig. II.17. Detector de fluorescencia (Hernández, 2017).

Varios grupos de investigación han desarrollado metodologías para la determinación de PAHs mediante HPLC con detector de fluorescencia gracias a que algunos de estos compuestos poseen la capacidad de emitir fluorescencia (Alarcón et al., 2012; Luo et al., 2007). Otros autores han combinado la HPLC-FL con la SPE para la extracción y detección de PAHs en aceites de soja, obteniéndose LODs entre 0,11 y 1,01 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ con RSD del 10% (Rojo Camargo et al., 2012). El grupo de Gharbil et al. (2017) han cuantificado mezclas de PAHs y plaguicidas mediante esta técnica

obteniendo unos límites de detección muy bajos (0,2-2,3 $\mu\text{g/Kg}$) y una desviación estándar relativa menor de 13%.

En la Tabla II.3 se recogen los métodos aplicados en la bibliografía basados en la cromatografía líquida en columna para la determinación de plaguicidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Tabla II.3. Métodos basados en la HPLC para la determinación de plaguicidas y PAHs en aceites y otros productos oleícolas

Analitos y muestras	Extracción y limpieza de muestra	Determinación	Características analíticas ^a	Referencia
PAHs en aceite de oliva y girasol	Microondas, 1 g de muestra en 30 mL de ACN, se aplica 150 W por 19 min, se lleva a sequedad. Extracción líquido-líquido (LLE), 1 g de muestra con 10 mL de ACN, se extrae y se lleva sequedad. Ambos casos pasan el extracto final por un cartucho de gel de sílice (SPE)	HPLC-FD	LOD:0.8-7 µg/Kg r: 0.9953-0.9977 RSD < 5.6% R (MAE SPE): 62-84% R (LLE SPE): 67-88%	Alarcon et al., 2012
Mezcla de plaguicidas en aceite de oliva y aceitunas	Extracción líquido-líquido (LLE) de 5 g de muestra con 10 mL ACN y filtrado del extracto previo a determinación	HPLC-MS/MS GC-MS/MS	LOQ: 10 µg/Kg R: 70-120% RSD: 20-25% r>0.99	Agnastopoulos et al., 2013
Mezcla de plaguicidas en aceite de oliva, girasol y soja	QuEChERS, 15 g de aceite de oliva con 15 ml de ACN, 6 mg Mg ₂ SO ₄ , 1.5 g citrato sódico y 0.75 g de disolución citrato, se extrae con ACN y se pasa a determinación	HPLC-MS/MS	R: 70-120% RSD <20%	Dias et al., 2016

PAHs en aceite de oliva, maíz y girasol	Extracción líquido-líquido (LLE), 50 mL de muestra se saponifica con NaOH en MeOH, se extrae con 20 mL de tolueno y se elimina el disolvente y restituye con 2 mL de ACN	HPLC- UV-VIS	R: 80-104% RSD: 0.17 - 7.4 % LOD: 0.26-1.15 µg / L	Dost et al., 2012
Mezcla de PAHs y plaguicidas en aceite de oliva virgen extra	Dispersión en fase sólida (MSPD), 2,5 g de muestra se diluye en 10 mL de n-hexano, y se mezcla con gel de sílice. Se eluye con disolución 70:30 n-hexano:diclorometano, se elimina el eluyente y se redisuelve en ACN.	HPLC-FID	RSD < 13%	Gharbi et al., 2017
Mezcla de plaguicidas en aceite de oliva	Extracción líquido-líquido (LLE) con extracción en fase sólida (SPE), a 3 g de muestra se añade 7 g de agua y 10 ml de ACN, 3 ml del extracto se lleva a sequedad y se redisuelven en 1 mL de metanol agua al 20%. Dispersión en fase sólida (MSPD): 3 g de muestra se realiza LLE con ACN saturado de éter de petróleo,	HPLC-MS (TOF)	R: 70-130% LOD: <10µl/Kg	Gilbert-López, 2010

	el extracto se pasa por una columna de aminopropil y co-columna de Florisil			
Mezcla de PAHs en aceites comestibles	Inyección directa de 1 g de muestra diluida en iPrOH.	HPLC-DA-APPI-MS/MS	RSD < 5% LOD 0.3 µg/Kg	Hollosi et al., 2011.
BaP en aceite comestible	SPE (gel de sílice)	HPLC-FID	R: 78.8-102.7 % RSD: 1.3-9.3% LOD 0.06 µg/Kg	Luo et al., 2007
Mezcla de plaguicidas en aceite de oliva virgen extra y aceitunas	Aceite: Extracción líquido-líquido (LLE), 10 g de muestra se añade 10 ml de MeOH con 1% de HCOOH y 10 mL agua, 1 mL del sobrenadante se diluye en 4 ml de ACN. Aceitunas: Extracción sólido líquido (SLE), 10 g de muestra se le añade 5 mL de agua y 10 mL de MeOH con 1% HCOOH, 1 ml de sobrenadante se le añade 4 mL de ACN	HPLC-MS/MS (QqQ) HPLC-MS (TOF)	R: 70-120% RSD <10% LOQ: AOVE TOF:0.3-57 QQQ:0.1-10 µg/Kg Aceite TOF: 3-600 QQQ: 1-40 µg/Kg	Nortes Méndez et al., 2016.
Mezcla de PAHs en aceites de soja	Extracción en fase sólida (SPE), 0.5 g de muestra se disuelve en 5 mL de hexano y se extrae con DMF/H ₂ O 5	HPLC-FID	LOD: 0.11-1.01 µg/Kg R:70-120% RSD: 10%	Rojo Camargo et al., 2012

ml, los extractos se diluyen en 8 ml de agua y se pasa por SPE Accubond. Se eluye con 10 mL de n-hexano, se lleva a sequedad y redisuelve en 0.5 mL de ACN.

^a LOD: límite de detección, LOQ: límite de cuantificación, r: coeficiente de correlación, RSD: desviación estándar relativa, R: recuperación

II.III.3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones a partir de moléculas de origen orgánico y en estado gaseoso, una vez se encuentran en forma de ion son separados en función de su masa y su carga (m/z). El espectrómetro de masas es el encargado de volatilizar e ionizar las sustancias que le son introducidos, posteriormente debe separarlos en función del parámetro m/z y por último detectar y registrar los datos de los iones obtenidos.

Un espectrómetro se divide en cuatro grandes partes: un sistema de introducción de muestras, una fuente de iones que da paso a un analizador o separador de iones y por último pasamos al detector.

II.III.3.1 Método de introducción de muestras

Su objetivo es introducir una pequeña cantidad de muestra en el espectrómetro de masas. A menudo el sistema contiene un medio que permite la volatilización de la muestras sólidas o líquidas. El método de introducción en un espectrómetro se puede realizar de manera indirecta, directa, o mediante un cromatógrafo de gases. Este último es el que más se utiliza actualmente y es el que se empleará en la investigación a desarrollar en esta Tesis Doctoral.

II.III.3.2 Fuente de ionización

Para la ionización de la muestra existen principalmente dos métodos para ionizar muestras en estado gaseoso, mediante impacto electrónico y mediante ionización química.

La ionización por impacto electrónico se basa en ionizar la muestra mediante un haz de electrones de alta energía procedentes de un filamento incandescente, acto seguido son acelerados mediante una diferencia de potencial de entre 5 y 70 V, la energía que poseerán los electrones finalmente será de entre 5 y 70 eV. Los electrones

se mantienen en una trayectoria determinada haciendo uso de campos magnéticos paralelos a la dirección en la que se mueven los electrones.

En este proceso las moléculas pueden perder un electrón, dos, captar un electrón o disociarse por efecto del haz de electrones. La energía que se suele suministrar a los electrones es de 70 eV, siendo superior al potencial de ionización de las moléculas, generando iones moleculares activados con una energía mayor que en su estado fundamental. Al trabajar a vacío se desecha la posibilidad de que haya reacciones entre los iones generados.

El problema de la ionización por impacto electrónico es la estabilidad de los iones generados, en algunos casos el ion molecular no va a verse descompuesto mientras que en otros casos apenas quedará ion molecular, ya que en ese caso la determinación en combinación con cromatografía de gases no permitiría identificar el compuesto.

En el caso del método de ionización química esta se realiza mediante la transferencia de cargas entre un ion y la molécula de la muestra mediante reacciones bimoleculares.

Para ello se introduce metano en la fuente iónica a presión de 1mmHg, en esas condiciones los electrones ionizan el metano, generando el ion metonio que será el ion que va a interactuar con las moléculas de la muestra. (Plascencia Villa, 2003)

II.III.3.3 *Analizador de iones*

Tras ser ionizada, la muestra es una mezcla de varios iones que hay que separar de manera correcta para poder detectar las diferentes especies, los más utilizados en la actualidad son el de sensor magnético (B), analizador cuadrupolar (Q), analizador de trampa de iones (TQ) y analizador de tiempo de vuelo (TOF).

a. Analizador de sector magnético

Este analizador se basa en aplicar un campo magnético perpendicular a la trayectoria de los iones, estos salen con una velocidad y trayectoria determinada desde la cámara de ionización, al verse afectados por este campo magnético perpendicular describirán una trayectoria circular de un radio determinado.

Aquellas especies que son de interés describirán un radio determinado, el cual les permitirá pasar por la rendija de salida y ser detectadas, aquellos iones que no son deseados van a describir una circunferencia de diferente radio, por tanto, no serán determinados.

Los espectrómetros de masas que equipan este tipo de analizador trabajan normalmente a máximo potencial de aceleración para así mejorar la sensibilidad y resolución (Plascencia Villa, 2003). Ante la necesidad de realizar barridos rápidos o frecuentes no es conveniente el uso de este analizador ya que la variación del campo magnético no va a seguir de manera correcta a la variación de corriente en el electroimán.

b. Analizador cuadrupolar

El analizador cuadrupolar está formado por cuatro barras de metal con sección circular o hiperbólica, dispuesta sobre una circunferencia, de tal manera que los iones que proceden de la cámara de ionización se dirijan al centro de esa circunferencia (Figura II.18).

Sobre las barras se aplica una diferencia de potencial constante sobre las barras por pares y un potencial alterno de radiofrecuencia. Estos campos eléctricos no tienen efecto sobre el movimiento longitudinal de los iones, pero en combinación se genera un movimiento lateral complejo.

El movimiento de los iones a través de los pares de barras se va a ver influenciado por su relación carga-masa (m/z), sólo en un pequeño rango de frecuencia la trayectoria del ion sería estable a través del cuadrupolo, el resto genera choques de los

iones contra las barras, el cuadrupolo selecciona las relaciones de m/z que permite pasar a través de él.

Los cuadrupolos trabajan solo con campos eléctricos y sin necesidad de rendijas para el haz, por lo que se obtiene una mayor sensibilidad. Una ventaja de este tipo de analizador es que la escala de masas es lineal frente al potencial utilizado. La principal desventaja es que este tipo de analizador no puede trabajar con relaciones de m/z mayores de 1000.

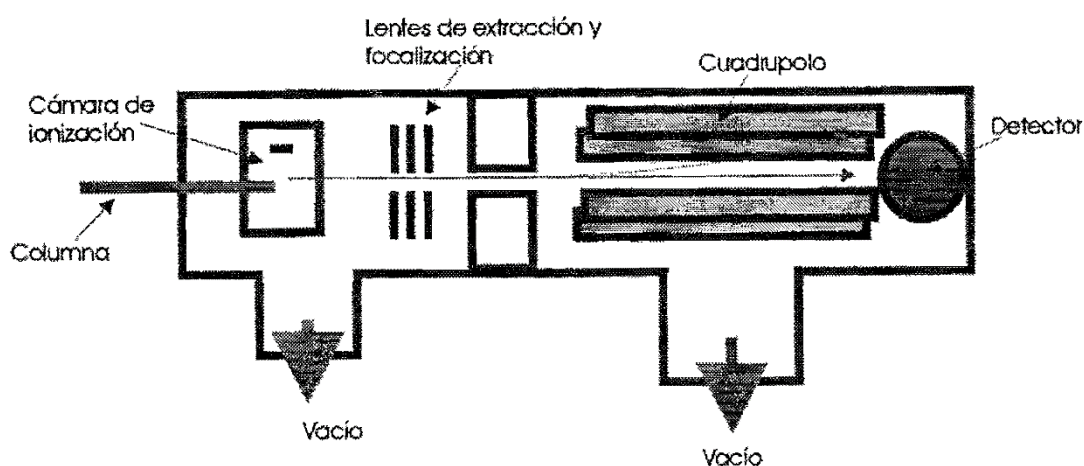


Fig. II.18. Esquema de un analizador con simple cuadrupolo (Cela et al., 2010).

c. Analizador de trampa de iones

Este tipo de analizador es una modificación del analizador cuadrupolar (Q), se basa en el uso de campos eléctricos que oscilan para que los iones se queden confinados en un espacio tridimensional, la trampa de iones los confina en un pequeño espacio entre tres electrodos, uno en forma de anillo y dos de forma hiperbólica.

Sobre los tres electrodos se aplican diferentes potenciales de radiofrecuencia, uno para el electrodo con forma de anillo y otro para los de forma hiperbólica, esto genera un campo electromagnético cuadrupolar tridimensional que atrapa a los iones con una trayectoria oscilante estable en función de su relación m/z y del voltaje aplicado.

Para su detección el analizador modifica los potenciales de los electrodos, modificando así la trayectoria de determinados iones en función de su m/z y que saldrán del espacio confinado por orden para ser determinados en el detector.

Este sistema presenta una alta sensibilidad, pero da poca capacidad en algunos análisis cuantitativos al poder surgir efectos y reacciones entre los iones que están conferidos en la cámara.

d. Analizador de tiempo de vuelo

En el analizador de tiempo de vuelo (TOF) todos los iones que se generan en la cámara de ionización son acelerados mediante una diferencia de potencial, en este caso todos los iones reciben la misma cantidad de energía, la velocidad que adquieren los iones será proporcional a su relación m/z .

La necesidad de este tipo de analizadores es la de ser acompañados de detectores sumamente rápidos, debido a la alta velocidad que alcanzan los iones si no se dispone de sistemas de detección rápidos y fiables será imposible una correcta determinación de los compuestos.

En la Figura II.19 se incluye un esquema de este tipo de analizador. En el cual la muestra en el analizador de tiempo de vuelo es vaporizada y sometida a un pulso de electrones, lo cual produce la ionización, acto seguido se le aplica una diferencia de potencial acelerando a todos los electrones de manera simultánea y se les hace pasar a través de una zona libre campo donde van a viajar a velocidad constante para acto seguido llegar al detector. La velocidad adquirida por los iones va a depender de su relación m/z y de la posición que ocupen en la fuente de ionización.

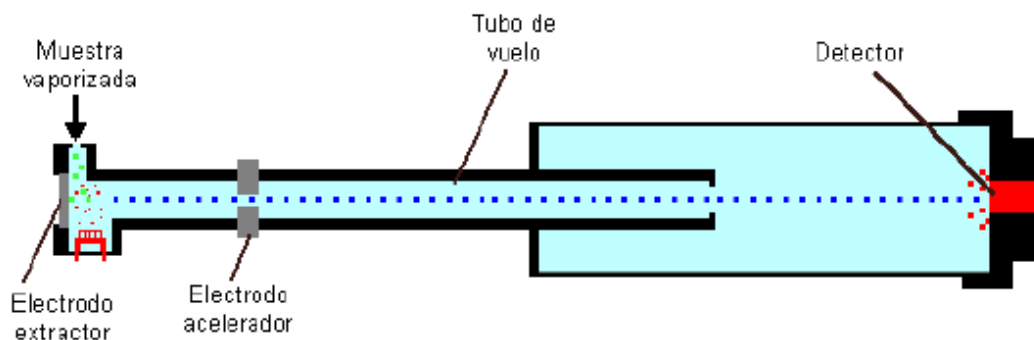


Fig. II.19. Analizador de tiempo de vuelo (Fleurence et al., 1999).

Este efecto de diferencias entre velocidades se compensa en un punto en el cual el detector puede aumentar la resolución, la desventaja de este tipo de analizadores es la poca distancia que hay entre él y el detector, para aumentar la resolución es necesario usar dispositivos secundarios como reflectrones.

La gran ventaja de este tipo de analizadores es el poco tiempo de análisis que conllevan y la inexistencia de limitación en cuanto a masas de los iones se refiere, por tanto, son analizadores adecuados para compuestos de alto peso molecular, aunque si se usa en combinación con GC esta ventaja desaparece debido a que estos compuestos no son volátiles para su separación mediante esta técnica.

II.III.3.4 Detectores

Cuando los electrones salen de los diferentes analizadores y llegan al detector se encuentran a bajas intensidades de corriente, esta baja intensidad requiere que los detectores sean muy rápidos y precisos, los principales detectores son la copa de Faraday, el fotomultiplicador de electrones y la placa fotográfica.

a. Copa de Faraday

La copa de Faraday consiste en una placa situada en una caja y que se dispone de manera ligeramente inclinada para evitar la reflexión de los iones, estos, al chocar contra la placa captan electrones para neutralizar su carga y se produce la medición de la corriente que se necesita para compensar la llegada de los iones a la placa. Junto a la variación de la corriente se produce una caída del voltaje, esta caída de voltaje es amplificada por un electrómetro.

La corriente medida y amplificada será proporcional al número de iones y de cargas neutralizadas de estos e independiente de masa o naturaleza de los iones. Este detector es barato, resistente y fiable, con una alta precisión y sensibilidad (Plascencia, 2003). La desventaja es el retraso de este detector debido a la simplicidad del sistema, por eso no se debe usar en determinaciones rápidas.

b. Fotomultiplicador de electrones

El fotomultiplicador de electrones usa la energía cinética de los iones que llegan desde el analizador. Los iones incidirán sobre una serie de placas que tienen la superficie cubierta por óxidos de tierras raras, al chocar contra las placas se produce la emisión de una serie de electrones que irán dirigidos a la siguiente placa, el proceso se repite hasta en 16 ocasiones.

Mediante esta técnica se consigue la amplificación de la corriente de iones que llega al detector en un efecto cascada, con un factor de multiplicación de 10^6 . Estos detectores son ampliamente usados en los sistemas cromatográficos que combinan la GC con la espectrometría de masas. Son robustos y baratos, aunque a veces pueda perderse algo de sensibilidad y de respuesta por la alta impedancia del amplificador.

c. Placa fotográfica

Este tipo de detector sólo se usa en casos muy específicos en los que se necesite una altísima sensibilidad o resolución, consiste en una placa donde queda grabada la

incidencia de los iones que llegan al detector, el procesado de datos se realiza mediante técnicas de fotografía y con un densitómetro (Plascencia Villa, 2003).

II.III.4 Acoplamiento de Técnicas Cromatográficas-Espectrometría de masas

II.III.4.1 Cromatografía de gases – espectrometría de masas

La ventaja principal del acoplamiento de un espectrómetro de masas a un cromatógrafo de gases consiste en la información adicional que se obtiene de la muestra, gracias al espectrómetro de masas es posible identificar los compuestos analizados. La cromatografía de gases nos permite la distinción entre homólogos con espectro similar y nos permite distinguir entre isómeros, mientras que la espectrometría de masas nos permite detectar sustancias con una estructura similar que no son separables por cromatografía de gases y por tanto estarían solapadas, que al tener diferente espectro de masas es posible la distinción entre ambos compuestos.

Gracias a las bibliotecas de espectros que se incluyen en los equipos GC-MS nos permite seleccionar una serie de valores m/z (relación masa/carga) en lugar de obtener todos los datos del espectro completo, por tanto, aumentamos la selectividad con respecto a los compuestos que posean esos valores determinados, junto al aumento de selectividad obtenemos un aumento por igual de la sensibilidad, disminuyendo así el ruido de fondo de la muestra objeto de análisis. Este modo de trabajo se conoce como SIM (registro selectivo de iones).

Gracias a estas ventajas, el acoplamiento GC-MS se ha convertido en uno de los métodos más utilizados para la determinación de mezclas complejas de productos volátiles como son los plaguicidas y los hidrocarburos policíclicos aromáticos. A continuación se describirán algunos aspectos importantes de la técnica de espectrometría de masas.

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas es uno de los métodos de separación y detección más utilizados para los analitos objeto de estudio, algunos autores lo aplican para la detección de mezclas de plaguicidas en muestras de aceite de oliva virgen, obteniendo unos LODs de 1,5 a 3,9 $\mu\text{g/L}$ (López Feria et al., 2009). Otros autores usan la GC-MS con inyección directa para la detección de plaguicidas con LODs entre 0,1 ay 0.3 mg/L (Sánchez et al., 2004). La GC-MS también ha sido utilizado para la determinación de PAHs en combinación con diferentes tratamientos de muestra, por ejemplo, HS-SPME con LODs entre 0,1 y 1 $\mu\text{g/Kg}$ (Vichi et al., 2006; Vichi et al., 2007), o LLE-SPE obteniéndose unos valores satisfactorios de RSD (de 3,34 – 8,89 %) (Wu et al., 2012).

II.III.4.2 *Acoplamiento de la cromatografía líquida en columna con la espectrometría de masas*

Cuando se requiere hacer una determinación mediante técnicas espectroscópicas o combinar la cromatografía líquida en columna con la espectrometría de masa (LC-MS) es necesario realizar una serie de acoplamientos o de modificaciones a la salida de la muestra que nos permitan la compatibilidad entre la HPLC y el resto de técnicas.

La cromatografía líquida en columna trabaja a alta presión, a un flujo de fase móvil alto y a temperatura ambiente o cercana a ella, por el contrario, la espectrometría de gases trabaja a vacío y con temperaturas elevadas, por eso es necesario realizar una serie de modificaciones en algunos parámetros para poder realizar el acople con éxito.

Hay que tener en cuenta a la hora de hacer un acoplamiento de este tipo que en la cromatografía líquida en columna podemos analizar moléculas pesadas con una baja volatilidad, alta polaridad y que se degraden por acción térmica, este tipo de moléculas van a presentar graves problemas para ser detectadas mediante espectrometría de masas, ya que se pueden descomponen con la simple vaporización de la muestra.

Además, la fase móvil debe estar libre de compuestos que no sean volátiles e inorgánicos, ya que estos no sería posible introducirlos en el espectrómetro de masas, por ejemplo.

El flujo de la fase móvil puede aumentar su caudal una vez convertido en vapor, este exceso de caudal debe ser eliminado por los sistemas de vacío, para solucionar este problema se han desarrollado diferentes interfases.

II.III.4.2.1 Interfases de introducción

Este tipo de interfase se encarga de eliminar la fase móvil, dejando la muestra en condiciones tales que se puede llevar a cabo la ionización de los analitos mediante impacto electrónico (EI).

Actualmente el procedimiento más utilizado es mediante un haz de partículas, lo que se obtiene mediante la aplicación de esta interfase es la de eliminar la fase móvil por difusión en dos etapas. La fase móvil es transformada en un spray mediante una corriente de helio, este aerosol que se ha formado al pasar a la zona de bajo vacío donde el disolvente libre será eliminado, el disolvente que va acompañando a los solutos pasará a una zona de mayor vacío donde será eliminada y así los analitos pasarán a la cámara de ionización libres de la fase móvil.

II.III.4.2.2 Interfases de introducción e ionización

Este tipo de interfases ioniza parcialmente la muestra sin eliminar en su totalidad la fase móvil, la cual se podrá utilizar en el proceso de ionización. A continuación se indican las interfases más importantes de este tipo.

a. Introducción directa de líquidos

Este método de introducción consiste en eliminar el exceso de fase móvil mediante un sistema de vacío y un divisor de flujo, al eliminar la fase móvil de este modo el soluto se ioniza, la sensibilidad es reducida al utilizar este sistema ya que con la fase móvil se elimina también parte de los analitos.

b. Bombardeo por átomos rápidos en régimen continuo

En la interfase de bombardeo por átomos rápidos en régimen continuo (FAB) el flujo que sale del HPLC se hace pasar por un capilar y se introduce en el capilar un aditivo, este aditivo forma una película uniforme junto a la muestra que recibe el impacto de los átomos de gas inerte formando los iones.

c. Ionización química a presión atmosférica

En la interfase mediante ionización química a presión atmosférica (APCI) el eluyente de la fase móvil se lleva mediante el uso de una corriente de helio hacia un conducto caliente y allí es eliminado, una descarga de corona genera los electrones necesarios para realizar la ionización de la muestra a presión atmosférica. Los iones son introducidos en el espectrómetro de masas a través de un sistema de rendijas a vacío, se obtiene una mayor sensibilidad gracias a que se realiza la ionización a presión atmosférica.

El problema reside en la destrucción de compuestos termolábiles en el conducto caliente, se pueden introducir hasta caudales de 2 mL/min y compuestos de varias polaridades.

d. Electrospray

Este tipo de interfase conecta la columna a un capilar cuyo final está sometido a un campo eléctrico de gran magnitud, esto provoca la formación de pequeñas gotas con alta carga eléctrica a presión atmosférica.

Al eliminar por evaporación el disolvente las gotas ven reducido su tamaño y aumentado su campo eléctrico, provocando una inestabilidad que dará lugar a gotas más pequeñas. Al eliminar cargas de la superficie de la gota se produce la ionización de los analitos.

Esta interfase posee una alta sensibilidad y no es necesaria demasiada optimización para un correcto funcionamiento. Presenta la ventaja de poder estudiar compuestos de alto peso molecular.

La elección de uno u otro tipo de interfase dependerá de la naturaleza de la muestra a analizar y de la información que se desee obtener de ella. Gracias a la interfase es posible realizar el acople entre la cromatografía de líquidos, la cromatografía de gases y los espectrómetros de masas.

Para la determinación de plaguicidas algunos autores han empleado la técnica de HPLC en combinación con MS/MS para muestras de aceites comestibles con unos límites de detección de menos de 5 $\mu\text{g/Kg}$ (Díaz et al., 2016; Ferrer et al., 2005). El uso del analizador TOF ha dado unos resultados satisfactorios para la determinación simultánea de 105 plaguicidas (Gilbert-López et al., 2010). Otros autores comparan el uso del triple cuadrupolo frente a TOF, obteniendo unos menores límites de detección en el caso del triple cuadrupolo (0.1-10 $\mu\text{g/Kg}$) en comparación a los obtenidos con el analizador TOF (0.3-57 $\mu\text{g/Kg}$) (Nortes Méndez et al., 2016).

En la Tabla II.3, mencionada anteriormente, se resumen algunas metodologías encontradas en bibliografía para la determinación de plaguicidas y PAHs en aceites y que están basadas en la separación por cromatografía líquida en columna acoplada a la espectrometría de masas.

II.III.4.3 *Espectrometría de masas en tándem*

El uso de una segunda etapa de análisis de masas durante el mismo ensayo se conoce como espectrometría de masas en tándem. Gracias a esta combinación se pueden estudiar iones de manera específica pertenecientes a una mezcla compleja, el fin de esto es obtener información estructural sobre ciertos iones. La combinación de estos analizadores proporciona una mayor selectividad y sensibilidad al método cromatográfico, se suelen nombrar como MS² o MS/MS.

El acople de dos analizadores separados por una cámara de colisiones nos proporciona mayor información sobre las moléculas. El primer analizador tiene la función de seleccionar los iones de interés, exactamente igual que en el caso de usar sólo un espectrómetro de masas, acto seguido se hace pasar por la cámara de colisiones, normalmente presurizada con un gas de colisión (helio). Los iones colisionarán con los átomos presentes en la cámara de colisiones produciéndose la disociación del ion. Estos iones serán analizados de nuevo a través del segundo analizador en relación m/z y de ahí pasarán al detector.

Existen diferentes equipos para la espectrometría de masas en tándem:

II.III.4.3.1 Cuadrupolos en tándem o triple cuadrupolo

En el detector de cuadrupolos en tándem o triple cuadrupolo (QqQ, TQ) el primer cuadrupolo efectúa el mismo trabajo que cuando hablamos de un cuadrupolo simple, selecciona los iones de las moléculas objeto de análisis, tras pasar por el primer cuadrupolo se pasa a la cámara de colisiones, que en este caso contendrá otro cuadrupolo encargado de acelerar el proceso de activación y fragmentación, este proceso es conocido como *disociación inducida por colisiones*. En el último cuadrupolo actúa de nuevo como analizador de masas de esos fragmentos de iones provenientes del segundo cuadrupolo, pasando a continuación al detector (Figura II.20).

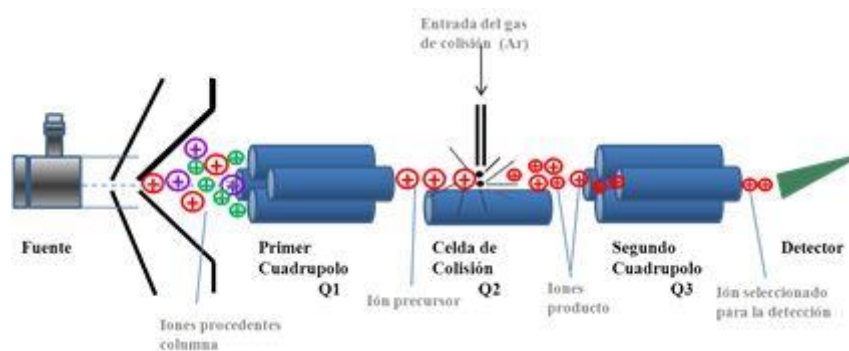


Fig. II.20. Analizador triple cuadrupolo (EEZ-CSIC, 2017).

II.III.4.3.2 Cuadrupolo-Tiempo de vuelo

En este tipo de analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) se incluye un cuadrupolo (Q) como primer analizador de masas, encargado de seleccionar los iones deseados acoplado a un analizador tiempo de vuelo (TOF), este TOF suele tener un sistema de lentes octapolo alrededor de la cámara de colisiones. Los iones fragmento que salen de esta cámara de colisiones son direccionados hacia el analizador tiempo de vuelo (TOF) y son separados en función de su m/z .

El resultado de esta combinación nos da un espectro MS/MS con una alta exactitud de masa, siendo esta su principal ventaja (Gilbert-López et al., 2010).

II.III.4.3.3 Trampa de iones

En un espectrómetro con trampa iónica (Q-Trap) se aplica una serie de barridos de diferentes radiofrecuencias tras haber atrapado a todos los iones provenientes de la fuente de iones. Tras aplicar el barrido se liberan de la trampa a todos los iones que no se desean, y permite obtener información sobre la estructura de los analitos.

Gracias a su alta velocidad de barrido se pueden llevar a cabo varios ensayos simultáneos.

Algunos autores han utilizado la cromatografía de gases en tándem de espectrómetros de masas para la detección de ftalatos, utilizando un espectrómetro Q-Trap, en muestras de aceite de oliva, llegando a LODs entre 0,1 y 148 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Cavaliere

et al., 2008), otros utilizan el triple cuadrupolo para analizar mezclas de 225 plaguicidas en aceites comestibles, trabajando en un rango lineal desde 0,1 hasta 0,25 mg/Kg de muestra, en combinación de GPC para la extracción de los analitos (Marinas et al., 2010).

En las Tablas II.2 y II.3, anteriormente citada, se han seleccionado algunas de las metodologías representativas para la determinación de plaguicidas y PAHs mediante técnicas cromatográficas acoplada a la espectrometría de masas en tándem.

II.IV. Bibliografía

- Abelló Linde. (2017). *Cromatografía de gases: Detector de ionización de llama y detector termoiónico*. 2014. Barcelona: Abelló Linde, S.A.
- Alarcón F., Báez M.E., Bravo M., Richter P., Fuentes E. (2012). Screening of edible oils for polycyclic aromatic hydrocarbons using microwave-assisted liquid-liquid and solid phase extraction coupled to one- to three-way fluorescence spectroscopy analysis. *Talanta*. 100(1) 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.015>
- Anagnostopoulos C., Miliadis G.E. (2013). Development and validation of an easy multiresidue method for the determination of multiclass pesticide residues using GC-MS/MS and LC-MS/MS in olive oil and olives. *Talanta*. 112(1) 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.051>
- Apetrei C., Ghasemi-Varnamkhasti M., Mirela Apetrei I. (2016). Olive Oil and Combined Electronic Nose and Tongue. *Electronic Noses and Tongues in Food Science*. Editorial Elsevier Inc. Capítulo 27, pág 277-289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800243-8.00027-5>
- Bergera G., Jarén C., Arana I., Arazuri S. (2006). Instrumentación para la espectroscopía de infrarrojo cercano. *Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*. 194(1) 30-33.
- Bogusz, M.J., El Hajj S.A., Ehaideb Z., Hassan H., Al-Tufail M. (2004). Rapid determination of benzo(a)pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography-mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1026(1-2) 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.044>
- Borges T.H., Pereira J. A., Cabrera-Vique C., Lara L., Oliveira A.F., Seiquer, I. (2017). Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid

- profile. Food Chemistry. 215(1) 454-462.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.162>
- Cámara C. Toma y tratamiento de muestras. Madrid: Ed. Síntesis. Capítulo 6, Pág 272-334.
- Canosa M. (2008). Desarrollo de metodología analítica para determinación de triclosán y parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. Universidad de Santiago de Compostela.
- Castiñeira M. (1989). La RMN de pulsos en industrias agroalimentarias II. Aplicaciones. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos 24. Pág 449-469.
- Cavaliere B., Macchione B., Sindona G., Tagarelli A. (2008). Tandem mass spectrometry in food safety assessment: The determination of phthalates in olive oil. Journal of Chromatography A. 1205 (1-2) 137-143.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.009>
- Cayuela J. A., García J. F. (2017). Sorting olive oil based on alpha-tocopherol and total tocopherol content using near-infra-red spectroscopy (NIRS) analysis. Journal of Food Engineering xxx 1-10 <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.015>
- Cela R., Lorenzo RA. Técnicas de adsorción y absorción en la preparación de muestras extracción y microextracción en fase sólida. "Técnicas de Separación en Química Analítica". Madrid: Ed. Síntesis. Capítulo 16, Pág 520-555.
- Chen Y., Chenk A.O. (1995). Quality analysis and purity examination of edible vegetable oils by near infrared transmittance spectroscopy. Leaping Ahead with Near Infrared Spectroscopy. Ed. G.D. Batten, Col Royal Australian Chemical Institute. Pág 316-323.
- Cirilli M., Bellincontro A., Urbani S., Servili M., Esposito S., Mencarelli F., Muleo R. (2016). On-field monitoring of fruit ripening evolution and quality parameters in olive mutants using a portable NIR-AOTF device. Food Chemistry. 199(1) 96-104.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.129>
- Dabrio M. Cromatografía de líquidos de alta eficacia. "Cromatografía y electroforesis en columna". Barcelona: Ed. Springer-Verlag. Capítulo 6, pág 145-185.

- De Pedro E., Garrido A., Martínez M.L., Angulo F., García-Olmo J. (1997), Espectroscopia de infrarrojo cercano en el análisis cuantitativo y cualitativo de productos derivados del cerdo ibérico. ITEA Tomo II 18. Pág 661.663.
- Dias J. V., Cutillas V., Lozano A., Pizzutti I.R., Fernández-Alba A.R. (2016). Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up. *Journal of Chromatography A*. 1462(1) 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.072>
- Dost K., Deli C. (2012). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV-Vis detection. *Food Chemistry*. 133(1) 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.001>
- Duynhoven J.V., Gribnau M.C.M., Goudappel G.J., Shukla V.K.S. (1999). Solid fat content determination by NMR. *Carbohydrates Polymer*. 40 (1) 211-219.
- Estación Experimental del Zaidín, EEZ-CSIC (2017). <http://www.eez.csic.es/es/servicio-de-instrumentacion>
- Farajzadeh M. A., Khoshmaram L., Nabil A. A. A. (2014). Determination of pyrethroid pesticides residues in vegetable oils using liquid-liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection. *Journal of Food Composition and Analysis*. 34(2) 128-135. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.03.004>
- Fennema O.R. (1976). *Principles of Food Science. Part 1-Food Chemistry*. Boca Raton: Ed. Marcel Dekker, Inc.
- Ferreiro-González M., Barbero G.F., Alvarez J.A., Ruiz A., Palma M., Ayuso J. (2017). Authentication of virgin olive oil by a novel curve resolution approach combined with visible spectroscopy. *Food Chemistry*. 220(1) 331-336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.015>
- Ferrer C., Gómez M. J., García-Reyes J. F., Ferrer I., Thurman E. M., Fernández-Alba A. R. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid

- chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1069(2) 183-194. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.015>
- Fleurence J., Fayaz M., Namitha K., Murthy, K. (1999). Espectrometría de Masas. *Trends Food Science and Technology*. 10(1) 25-28. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf
- Forina M., Oliveri P., Bagnasco L., Simonetti R., Casolino M. C., Nizzi Grifi F., Casale M. (2015). Artificial nose, NIR and UV-visible spectroscopy for the characterisation of the PDO Chianti Classico olive oil. *Talanta*. 144(1) 1070-1078. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.067>
- García-Reyes J. F., Ferrer C., Gómez-Ramos M. J., Fernández-Alba A. R., Molina-Díaz, A. (2007). Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 26(3) 239-251. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.004>
- Garrido A., Gómez A., Guerrero J.E., Fernández. (1996). NIRS: una tecnología de apoyo para un servicio integral en alimentación animal. *Avances en Alimentación y Nutrición Animal*. Madrid: FEDNA. Pág 275-300.
- Gharbi I., Moret S., Chaari O., Issaoui M., Conte L.S., Lucci P., Hammami M. (2017). Evaluation of hydrocarbon contaminants in olives and virgin olive oils from Tunisia. *Food Control*. 75(1) 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.003>
- Gilbert-López B., García-Reyes J.F., Fernández-Alba A.R., Molina-Díaz A. (2010). Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1217(24) 3736-3747. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.025>
- Gilbert-López B. (2010). Nuevas metodologías analíticas basadas en espectrometrías de masas para el análisis multi-residuo de plaguicidas y otros contaminantes en vegetales con alto contenido graso y en productos alimenticios de origen vegetal. Ed. Universidad de Jaén.

- Gómez-Caravaca A.M., Maggio R.M., Cerretani L. (2016). Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review. *Analytica Chimica Acta*. 913(1) 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.025>
- Gong Z., Alef K., Wilke B.M., Li P. (2007). Activated carbon adsorption of PAHs from vegetable oil used in soil remediation. *Journal of Hazardous Materials*. 143(1-2) 372-378. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.09.037>
- Grossi M., Di Lecce G., Gallina Toschi T., Riccò B. (2014). A novel electrochemical method for olive oil acidity determination. *Microelectronics Journal*. 45(12) 1701-1707. <https://doi.org/10.1016/j.mejo.2014.07.006>
- Guardia Rubio M. (2008). Evaluación de la efectividad del lavado de aceituna sobre la eliminación de residuos de plaguicidas: Nuevas metodologías analíticas y situación real en almazaras. Ed. Universidad de Jaén.
- Guardia Rubio M., Ruiz Medina A., Pascual Reguera M. I., Fernández de Córdoba M. L. (2007). Multiresidue analysis of three groups of pesticides in washing waters from olive processing by solid-phase extraction-gas chromatography with electron capture and thermionic specific detection. *Microchemical Journal*. 85(2) 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2006.06.005>
- Guardia-Rubio, M., Marchal-López, R. M., Ayora-Cañada, M. J., Ruiz-Medina, A. (2007). Determination of pesticides in olives by gas chromatography using different detection systems. *Journal of Chromatography A*. 1145(1-2) 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.068>
- Guillén M.D., Ruiz A. (2001). High Resolution ¹H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends in Food Science & Technology*. 12(1) 328-338.
- Gurdeniz G., Ozen B. (2009). Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. *Food Chemistry*. 116(2) 519-525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.068>
- Guzmán E., Baeten V., Pierna J.A.F., García-Mesa J.A. (2015). Evaluation of the overall quality of olive oil using fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*. 173(1) 927-934. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.041>

- Hernández J. M. (2007). *Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. Enfermedades Hepáticas Autoinmunes*. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada. 44-52.
- Holloosi L., Wenzl T. (2011). Development and optimisation of a dopant assisted liquid chromatographic-atmospheric pressure photo ionisation-tandem mass spectrometric method for the determination of 15+1 EU priority PAHs in edible oils. *Journal of Chromatography A*. 1218 (1) 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.015>
- Inarejos-García A.M., Gómez-Alonso S., Fregapane G., Salvador M.D. (2013). Evaluation of minor components, sensory characteristics and quality of virgin olive oil by near infrared (NIR) spectroscopy. *Food Research International*. 50(1) 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.029>
- Jiménez-Carvelo A.M., González-Casado A., Cuadros-Rodríguez L. (2017). A new analytical method for quantification of olive and palm oil in blends with other vegetable edible oils based on the chromatographic fingerprints from the methyltransesterified fraction. *Talanta*. 164(1) 540-547. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.024>
- Jiménez-Jiménez F., Castro-García S., Blanco-Roldán G. L., Agüera-Vega J., Gil-Ribes J. A. (2012). Non-destructive determination of impact bruising on table olives using Vis-NIR spectroscopy. *Biosystems Engineering*. 113(4) 371-378. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.09.007>
- Karabagias I., Michos C., Badeka A., Kontakos S., Stratis I., Kontominas M. G. (2013). Classification of Western Greek virgin olive oils according to geographical origin based on chromatographic, spectroscopic, conventional and chemometric analyses. *Food Research International*. 54(2) 1950-1958. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.023>
- Korel F., Balaban M. O. (2008). *Electronic Nose Technology in Food Analysis*. "Handbook of Food Analysis Instruments" (Ed. Semih Otles). Boca Raton: CRC Press.
- Laroussi-Mezghani S., Vanloot P., Molinet J., Dupuy N., Hammami M., Grati-Kamoun N., Artaud J. (2015). Authentication of Tunisian virgin olive oils by chemometric


- analysis of fatty acid compositions and NIR spectra. Comparison with Maghrebian and French virgin olive oils. *Food Chemistry*. 173(1) 122-132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.002>
- López-Feria S., Cárdenas S., Valcárcel M. (2009). One step carbon nanotubes-based solid-phase extraction for the gas chromatographic-mass spectrometric multiclass pesticide control in virgin olive oils. *Journal of Chromatography A*. 1216(43) 7346-7350. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.060>
- Luo D., Yu Q.W., Yin H.R., Feng Y.Q. (2007). Humic acid-bonded silica as a novel sorbent for solid-phase extraction of benzo[a]pyrene in edible oils. *Analytica Chimica Acta*. 588(2) 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.02.016>
- Mannina L., Segre A. L. (2002). High resolution nuclear magnetic resonance: from chemical structure to food authenticity. *Grasas y Aceites*, 53(1) 22-33.
- Marinas A., Lafont F., Aramendía M.A., García I.M., Marinas J.M., Urbano F.J. (2010). Multiresidue Analysis of Low- and Medium-polarity Pesticides in Olive Oil by GC-MS/MS. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00071-1>
- Martini E., Tomassetti M., Campanella L. (2015). Determination of traces of several pesticides in sunflower oil using organic phase immuno electrodes (OPIEs). *Talanta*. 132(1) 503-512. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.004>
- Moscetti R., Haff R.P., Stella E., Contini M., Monarca D., Cecchini M., Massantini R. (2015). Feasibility of NIR spectroscopy to detect olive fruit infested by *Bactrocera oleae*. *Postharvest Biology and Technology*. 99(1) 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.07.015>
- Norman E. (2016). Contaminants in Food. Reference Module in Food Science. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03276-5>
- Nortes-Méndez R., Robles-Molina J., López-Blanco R., Vass A., Molina-Díaz A., García-Reyes J. F. (2016). Determination of polar pesticides in olive oil and olives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry. *Talanta*. 158(1) 222-228. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.058>

- Osborne B.G., Fearn T., Hindle P.H., (1993). *Practical NIR Spectroscopy with Application in Food and Beverage Analysis*. Logman Scientific and Technical UK.
- Paramasivam M. (2015). Fungicide Residues. "Handbook of Food Analysis" Ed. L.M.L. Nollet, 3ª Edición. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. Capítulo 9, Pág 201-214.
- Paramasivam M., Jayalakshmi K., Chandrasekaran S., Kuttalam S. (2015) Organochlorine Pesticide Residues in Food. "Handbook of Food Analysis" Ed. L.M.L. Nollet, 3ª Edición. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. Capítulo 6, Pág 136-149.
- Peguero A. (2010). La espectroscopia NIR en la determinación de propiedades físicas y composición química de intermedios de producción y productos acabados. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3316/apg1de1.pdf?sequence=1>
- Pérez Parada J., Pareja L., Niell S., Besil N., Colazzo M., Cesio M.V. (2015). Analysis of Organophosphorus Insecticides in Foods. "Handbook of Food Analysis" Ed. L.M.L. Nollet, 3ª Edición. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. Capítulo 8, Pág 181-200
- Piscopo A., De Bruno A., Zappia A., Ventre C., Poiana M. (2016). Characterization of monovarietal olive oils obtained from mills of Calabria region (Southern Italy). *Food Chemistry*. 213(1) 313-318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.080>
- Pizarro C., Rodríguez-Tecedor S., Pérez-Del-Notario N., Esteban-Díez I., González-Sáiz J. M. (2013). Classification of Spanish extra virgin olive oils by data fusion of visible spectroscopic fingerprints and chemical descriptors. *Food Chemistry*. 138(2-3) 915-922. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.087>
- Plascencia Villa G. (2003). *Espectrometría de Masas*. Cuernavaca: Instituto de Biotecnología. 1-40.
- Plaza-Bolaños P., Frenich A. G., Vidal J. L. M. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. *Analytical methods and trends. Journal of Chromatography A*. 1217(41) 6303-6326. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.079>


- Purcaro G., Moret S., Conte L.S. (2013). Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*. 105(1) 292-305. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.041>
- Purcaro G., Picardo M., Barp L., Moret S., Conte L.S. (2013). Direct-immersion solid-phase microextraction coupled to fast gas chromatography mass spectrometry as a purification step for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oil. *Journal of Chromatography A*. 1307(1) 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.068>
- Ragni L., Iaccheri E., Cevoli C., Berardinelli A., Bendini A., Toschi T. G. (2013). A capacitive technique to assess water content in extra virgin olive oils. *Journal of Food Engineering*. 116(1) 246-252. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.031>
- Rahmanian N., Jafari S. M., Wani T. A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science and Technology*. 42(2) 150-172. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.009>
- Reboredo-Rodríguez P., González-Barreiro C., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J. (2014). Quality of extra virgin olive oils produced in an emerging olive growing area in north-western Spain. *Food Chemistry*. 164(1) 418-426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.043>
- Rojo Camargo M.C., Antonioli P.R., Vicente E. (2012). Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons content in different stages of soybean oils processing. *Food Chemistry*. 135(3) 937-942. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.031>
- Romero I., García-González D.L., Aparicio-Ruiz R., Morales M.T. (2015). Validation of SPME-GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects. *Talanta*. 134(1) 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.032>
- Ruiz-Aracama A., Goicoechea E., Guillén M.D. (2017). Direct study of minor extra-virgin olive oil components without any sample modification. ^1H NMR multisuppression experiment: A powerful tool. *Food Chemistry*. 228(1) 301-314. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.009>

- Salguero-Chaparro L., Baeten V., Fernández-Pierna J.A., Peña-Rodríguez F. (2013). Near infrared spectroscopy (NIRS) for on-line determination of quality parameters in intact olives. *Food Chemistry*. 139(1-4) 1121-1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.002>
- Sánchez R., Vazquez A., Andini J.C., Villén J. (2004). Automated multiresidue analysis of pesticides in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption-desorption interface. *Journal of Chromatography A*. 1029(1-2) 167-172. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.018>
- Santa J., Serrano M., Stashenko E. (2002). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de hidrocarburos presentes en aguas residuales industriales. *Ciencia, Tecnología y Futuro*. 2(1) 49-60.
- Shenk J.S., Westerhaus M.O. (1995). *Analysis of Agricultural and Food-Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Fox Nirsystem, Inc.
- Shenk J.S., Westerhaus M.O. (1996). "Calibration ghe ISI way". *Near Infrared Spectroscopy. The Future Waves*. Ed. A.M.C. Davies, P.C. Williams Nir Publication Chichester UK. Pág 198-202.
- Silva M.V. (2003). Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. *Analytica Chimica Acta* 497 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.08.048>
- Simko P. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. "Handbook of Food Analysis" Ed. L.M.L. Nollet, 3ª Edición. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. Capítulo 9, Pág 329-338.
- Sinelli N., Cerretani L., Egidio V.D., Bendini A., Casiraghi E. (2010). Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity. *Food Research International*. 43(1) 369-375. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.008>
- Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. (2001). *Principios Análisis Instrumental*. 5º edición. Madrid: Mc Graw Hill. Pág 122-200, 481-524.

- Skoog D.A., Leary J. (1993). *Análisis Instrumental*. 4^o Edición. Ed. Madrid: McGraw-Hill. Pág 296.
- Vichi S., Pizzale L., Conte L.S., Buxaderas S., López-Tamames E. (2005). Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1090(1-2) 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.007>
- Vichi S., Pizzale L., Conte L.S., Buxaderas S., López-Tamames E. (2007). The occurrence of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oils from north-eastern Italy. *Food Control*. 18(10) 1204-1210. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.015>
- Wenzl T., Simon R., Anklam E., Kleiner J. (2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 25(7) 716-725. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.05.010>
- Williams P. (1996). *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. The proceedings of the 7th international conference on Near Infrared Spectroscopy. Montreal (Canada): NIR Publications.
- Wu S., Yu W. (2012). Liquid-liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in four different edible oils from China. *Food Chemistry*. 134(1) 597-601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.155>



III. ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTAS TÉCNICAS ANALÍTICAS (ESPECTROSCOPIA DE NIR Y RMN Y EXTRACCIÓN MEDIANTE SOXHLET) PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTENIDO GRASO Y DE HUMEDAD EN ACEITUNAS Y ORUJO



El objetivo de este capítulo es el desarrollo y puesta a punto de una metodología basada en el uso de las técnicas de espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR) y de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) para la determinación de contenido graso y humedad en muestras de aceitunas y orujos y su posterior comparación frente al Método Oficial para comprobar su validez y ventajas con respecto a otras metodologías.

El aceite y la aceituna, son productos de alto valor y básico en la dieta mediterránea. La especie más extendida es la *Olea europaea*, cultivada en la provincia de Jaén, la composición de las aceitunas es de alrededor de un 50% de agua, 22% aceite, 19,1% de hidratos de carbono, 5,8% de celulosa, 1,6% de proteínas y 1,5% de minerales. Esta composición puede verse alterada dependiendo de la fecha de recolección, almacenamiento, y procesado. El conocimiento de estas dos características de los aceites y orujos permitirá garantizar una buena caracterización, evitándose fraudes por adulteración. Además en la almazara permitirá evaluar el rendimiento de las aceitunas que repercutirá en el respectivo pago a los agricultores por su producción de aceitunas.

La ventaja de aplicar estas dos técnicas para la determinación de la humedad y el contenido graso de las muestras radica en el hecho de que la metodología no requiere el tratamiento de la muestra más allá de la homogeneización, evitándose así el uso de disolventes y técnicas de extracción y reduciéndose notablemente el tiempo de manipulación. Las muestras son homogeneizadas mediante un molino de martillos con eje de molienda vertical, en el caso de muestras de orujo esto no es necesario.

Para el análisis mediante espectroscopia NIR las muestras se depositan en las cubetas destinadas a tal fin. El equipo posee una lámpara de wolframio que nos permite trabajar en el rango de longitudes de onda de entre 850 a 1050 nm en la zona visible, en modo transmitancia. Para la calibración del NIR se han llevado a cabo 2000 muestras de aceites de diferentes zonas de España, en el caso de orujos se han usado 700 muestras. El ajuste de los datos se llevó a cabo mediante el uso de Redes Neuronales Artificiales en el caso de los aceites y regresión parcial por mínimos cuadrados para los orujos, en el caso del aceite se obtuvieron intervalos lineales de 10,7–37,8 % y 22,4–69,1 % para contenido graso y humedad

respectivamente. En cambio en orujos los intervalos estaban comprendidos entre 0,9 y 9,3 % y entre 53,2 y 79,9% para contenido graso y humedad, respectivamente.

El análisis mediante espectroscopia RMN se llevó a cabo mediante un equipo que proporciona un campo magnético de 0,237 Tesla, una frecuencia de 10 MHz para el trabajo en ^1H y a una temperatura de trabajo de $40 \pm 0,3$ °C, para el análisis las muestras deben ser secadas por convección de aire a 103 °C durante un tiempo de 10 a 12 horas. Para la calibración del instrumento se llevó a cabo la medida de aceites y orujos cuyos intervalos de calibración estaban comprendidos entre 10,2 y 40,5 % y entre 2,1 y 6,4% en contenido graso, respectivamente. En el caso de humedad los intervalos comprendían entre 20,2 y 70,9 % y entre 50,2 y 75,9% respectivamente. Además se obtuvieron coeficientes de correlación (r) cercanos a la unidad (0,992 – 0,999).

Para confirmar la validez del método se llevó a cabo la comparación del mismo frente al Método Oficial basado en la extracción Soxhlet. Para ello se llevaron a cabo análisis de aceites y orujos mediante las tres técnicas. Para la comparación de los métodos se han usado diferentes test estadísticos. En el caso del estudio de la precisión se ha usado el test F de Fisher, por el cual se concluye que no hay diferencia significativa entre los métodos. Para el estudio de la exactitud se ha utilizado el test de Cochran. P, concluyéndose que tanto la técnica NIR como la RMN presentaban una exactitud muy satisfactoria. En último lugar se llevaron cabo las representaciones de Youden para comparar los resultados obtenidos por los métodos NIR y NMR en diferentes muestras de aceites y orujos, obteniendo pendientes de las rectas cercanas a la unidad en todos los casos.

Por lo tanto, se ha estudiado la viabilidad de dos métodos analíticos (espectroscopía de infrarrojo cercano y espectroscopía de resonancia magnética nuclear) para la determinación de humedad y contenido graso en aceitunas y orujo. Los resultados obtenidos son similares, en términos de precisión y exactitud, con los conseguidos usando el Método Oficial basado en la extracción Soxhlet. Las ventajas que presentan ambos métodos con respecto al Método Oficial (reducción de la manipulación de la muestra, reducción del consumo de reactivos y disolventes, y disminución del tiempo de análisis) hace que se puedan proponer como métodos normalizados de un laboratorio para la determinación de ambos

parámetros en aceitunas y orujo. Los resultados obtenidos demuestran que las metodologías propuestas son totalmente válidas para su aplicación en laboratorios para control de contenido graso y humedad en aceitunas y orujo.

Estudio comparativo de distintas técnicas analíticas (espectroscopía de NIR y RMN y extracción mediante Soxhlet) para la determinación del contenido graso y de humedad en aceitunas y orujo de Jaén

Por A. García Sánchez¹, N. Ramos Martos² y E. Ballesteros^{1*}

¹ Departamento de Química Física y Analítica. Escuela Politécnica Superior de Linares, 23700 Linares, Jaén. E-mail: eballes@ujaen.es;

² Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de Ciencias Experimentales, 23071, Jaén.

RESUMEN

Estudio comparativo de distintas técnicas analíticas (espectroscopía de NIR y RMN y extracción mediante Soxhlet) para la determinación del contenido graso y de humedad en aceitunas y orujo de Jaén .

Se ha estudiado la viabilidad de dos métodos analíticos (espectroscopía de infrarrojo cercano y espectroscopía de resonancia magnética nuclear) para la determinación de humedad y contenido graso en aceitunas y orujo. Los resultados obtenidos son similares, en términos de precisión y exactitud, con los conseguidos usando el Método Oficial basado en la extracción Soxhlet. Las ventajas que presentan ambos métodos con respecto al Oficial (reducción de la manipulación de la muestra, reducción del consumo de reactivos y disolventes, y disminución del tiempo de análisis) hace que se puedan proponer como métodos normalizados de un laboratorio para la determinación de ambos parámetros en aceitunas y orujo.

PALABRAS-CLAVE: Aceituna - Extracción Soxhlet - Grasa - Humedad - NIR - Orujo - RMN.

SUMMARY

Comparative study of various analytical techniques (NIR and NMR spectroscopies, and Soxhlet extraction) for the determination of the fat and moisture content of olives and pomace obtained from Jaén (Spain).

The suitability of two analytical techniques (viz. near infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy) for the determination of moisture and fat content of olives and pomace was determined. The results obtained from the two techniques were similar in terms of accuracy and precision to those provided by the official method, which is based on Soxhlet extraction. On the other hand, the proposed methods involve less intensive sample handling, use reagents and solvents more sparingly and are faster than the official method. This allows for their adoption as standard laboratory methods for the determination of analytical parameters in both olives and pomace.

KEY-WORDS: Fat - Moisture - NIR - NMR - Olives - Pomace - Soxhlet extraction.

1. INTRODUCCIÓN

En los países de la ribera del Mediterráneo se ha cultivado el olivo desde miles de años. Las aceitunas y el aceite procedentes de este árbol han contribuido de forma muy significativa a la dieta de sus habitan-

tes y es una parte más de la civilización que se ha desarrollado allí. Aunque el aceite de oliva ha tenido otros usos a lo largo de la historia (medicina y combustible), este se puede considerar como un alimento básico en la dieta mediterránea y es muy apreciado internacionalmente por su aroma y por su contribución a la prevención y control de enfermedades cardiovasculares y otras.

Se conocen muchas especies de olivo, pero la más extendida es la «Olea Europea». La composición media de la aceituna es: 50 % de agua, 22 % de aceite, 19.1 % de hidratos de carbono, 5.8 % de celulosa, 1.6 % de proteínas y 1.5 % de minerales (Boskou, 1998). No obstante, la composición de la aceituna puede variar dependiendo del tipo de aceituna, momento de su recolección, método de recogida, almacenamiento, tiempo entre la recogida y el procesado en la almazara. El momento más apropiado para la recolección de las aceitunas destinadas a la extracción de aceite, es cuando el fruto alcanza su maduración óptima. En este momento, el contenido en aceite y la calidad del mismo, se encuentran a su nivel más alto (Kiritsakis, 1991).

La determinación de los dos componentes principales de la aceituna, el aceite y el agua de vegetación, tiene una primordial importancia. El contenido total en aceite es la base para pagar a los agricultores por la riqueza en esta fracción de la aceituna que aportan a la almazara. Por lo tanto, el conocimiento de este parámetro es necesario para evaluar el rendimiento del proceso de fabricación de la aceituna. Por otro lado, el agua de vegetación de la propia aceituna afecta a distintas variables de regulación del sistema de elaboración y sobretodo a los denominados de dos fases y que están relacionadas con el rendimiento industrial, como son: la posición respecto del eje de rotación y del punto de salida del aceite, y la adición de agua al decantador centrífugo (Hermoso et al., 1998).

Se han desarrollado diferentes metodologías para la determinación del contenido en aceite de las aceitunas. Todos los métodos proporcionan datos de

contenidos totales o parciales de aceite en la aceituna, pero no de la cantidad real de aceite que se va obtener en el proceso de elaboración de este alimento (rendimiento industrial). Este rendimiento se calcula de una manera estimada a partir de la información que ofrecen los diferentes métodos para la determinación del contenido en aceite, realizando una corrección mediante el uso de un factor variable que depende de la humedad, porcentaje de materia seca y desengrasada, extractabilidad, contenido de aceite en el orujo, etc. (Civantos, 1999).

Para la determinación en aceitunas del agua de vegetación y del contenido de aceite se han desarrollado diferentes métodos, en la mayoría de los casos caracterizados por la lentitud de etapas de la desecación en estufa y extracción en Soxhlet (Norma UNE 55030), por el uso de disolventes orgánicos (Soxhlet y Autelec) y por ser métodos destructivos que modifican las características de la muestra respecto al estado original (Frias et al., 1991; Kmiecik et al., 1991). Estos inconvenientes han originado que se desarrollen nuevas metodologías que ofrezcan información rápida y precisa, y que sean limpias para el medio ambiente. Entre las técnicas que emplean en la actualidad las nuevas metodologías, se puede destacar a la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR) (Guillen y Cabo, 1997) y a la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) (Guillen y Ruiz, 2001).

La aplicación de la técnica de espectroscopía de infrarrojo cercano en la industria agroalimentaria se perfila como la solución actual para satisfacer las necesidades de un control de calidad de los alimentos. Entre las ventajas que han permitido su desarrollo se encuentran las de ser una técnica no destructiva, escasa preparación de muestra, rapidez de respuesta, bajo coste, alta precisión, ser una técnica no contaminante y suministrar información simultánea de diferentes parámetros de calidad para productos muy diversos (Osborne, 1993). El empleo de la técnica NIR en la industria oleícola resulta de gran interés y utilidad para la determinación de ciertos parámetros analíticos como son contenido graso, humedad, acidez en muestras de aceitunas, aceite y orujo (Sato, 1994; García Mesa et al., 1996; Jiménez et al., 2000; Bertrán et al., 2001; León et al., 2003; Muik et al., 2004).

Por otro lado, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear es una herramienta que se utiliza con frecuencia en el análisis de alimentos lipídicos, grasas y aceites (Rutledge et al., 1996). La técnica de RMN de baja resolución ha sido empleada desde hace bastante tiempo para la determinación de grasas sólidas en muestras, las curvas de punto de fusión de grasas semi-sólidas, o el porcentaje de grasa y agua en alimentos (Castañeira, 1989). También la RMN de alta resolución se viene utilizando durante cierto tiempo en el control analítico de ali-

mentos grasos (Belton et al., 1996; Guillen y Ruiz, 2001; Mannina et al., 2002). En la industria oleaginosa se ha determinado el contenido de grasa y de agua en aceitunas mediante RMN de baja resolución a diversos niveles de resonancia (Romero Guzmán et al., 1983). También la RMN se ha utilizado para la detección de adulteraciones de aceites de oliva virgen con otros aceites de semillas (Vigli et al., 2003).

El objeto de este trabajo consiste en el estudio comparativo de dos métodos espectroscópicos (NIR y RMN) y el Método Oficial (basado en una extracción Soxhlet) para la determinación del contenido graso y humedad en aceitunas y orujo. Se aplicarán los dos métodos propuestos al análisis de muestras de distinta procedencia con vistas a probar su viabilidad y sus ventajas con respecto al Método Oficial.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Preparación de las muestras

Las muestras de aceituna y orujo llegan al laboratorio en bolsas de plástico identificadas con un código de barras, y con una cantidad de 600 a 1000 gramos. Una vez registradas, las muestras de aceituna son molidas en su totalidad en un molino de martillos con eje de molienda vertical, interiormente de acero inoxidable y con alimentación automática por tornillo sin-fin. La primera fracción de la muestra durante la molienda es desechada, para arrastrar los restos de muestra anterior, recogiendo sobre 500 a 750 gramos en una bandeja de plástico.

Si se trata de muestras de orujo, no precisan molienda previa, tan solo homogeneización de la misma.

Una vez homogeneizada la muestra, pesamos sobre un trozo de film termorresistente previamente tarado, 25,00 0,50 gramos de muestra, depositando la misma sobre una bandeja rabanera de acero inoxidable.

2.2. Análisis por Espectroscopía NIR

Las muestras se analizaron empleando el equipo OliveScan (Foss, Hilleroed, Dinamarca). Es un espectrofotómetro que cubre un rango de longitudes de onda comprendido entre 850 a 1050 nm, proporcionando medidas en la zona visible, en modo transmitancia y con un rango de absorbancia de 1 a 5 AU. El equipo utiliza como fuente de energía una lámpara de wolframio y como sistema de detección la modalidad de silicio. La cubeta de muestra (8 mm alto x 140 mm diámetro externo x 90 mm diámetro interno) contiene un anillo soporte de aluminio y la base es de vidrio.

Con 25 gramos de pasta homogeneizada y pesada según se ha explicado anteriormente, se rellena

una cubeta para medida por NIR. Se registra la muestra en dicho equipo, se elige la calibración que usaremos (pasta de aceituna u orujo) y medimos por NIR. La medida se realiza con 16 submedidas o pulsos, presentando tras un minuto aproximadamente, en pantalla el contenido en grasa total y la humedad de dicha muestra.

2.3. Análisis por Espectroscopía de RMN

El espectrómetro de RMN Bruker, NMS 110C/125/40 RTA (Rheinstetten, Alemania) dispone de un imán permanente con campo magnético de 0,237 Tesla, con frecuencia de operación a 10 Mhz para ^1H , protegido de los cambios de temperatura ambiental por medio de un horno controlado a 40°C , con una precisión de $\pm 0,3^\circ\text{C}$ y una estabilidad de $0,01^\circ\text{C}$. Con detector mecánico de introducción de la muestra y sonda de alta sensibilidad para mediciones absolutas con tubos de muestra de 40 mm con capacidad equivalente a 40-50 gramos de muestra húmeda. El equipo también posee un preamplificador de señal.

El equipo también posee una unidad de control con generador de radiofrecuencia, un programador de pulsos, un receptor, un convertidor analógico digital, una unidad de control de procesos y un transmisor. Se utiliza una salida RS232 para la conexión al PC o a red existente para la comunicación de datos y control del minispec.

Las mediciones se realizan a través de pulsos de radiofrecuencia a 10 MHz con intervalo de 1 segundo entre pulsos. El tiempo de medición es de 5 segundos aproximadamente. El equipo incluye aplicación para la determinación del rendimiento graso en aceitunas, orujos y derivados.

Para el análisis de las muestras se pesan 25 gramos en un film termoresistente, se introducen en la estufa de secado por convección de aire forzado a 103°C durante toda la noche (aproximadamente 10-12 horas), se sacan de las estufa, se enfrían como mínimo 30 minutos y se realiza la pesada seca de la misma. Previamente, el equipo se ha calibrado, tanto para aceituna como para orujo, en el rango de trabajo del laboratorio. La medida por RMN se lleva a cabo en tres etapas: a) selección de la curva de medida, aceituna u orujo; b) indicación del peso húmedo de la muestra, y c) la muestra introducida en el tubo de medida se analiza en el equipo de RMN, y la medición la realiza a 6 pulsos (scans).

2.4. Métodos de referencia

La determinación de la humedad de las muestras se lleva a cabo mediante el método de secado en una estufa a 105°C para aceitunas (UNE-55-020-73) y orujo (UNE 55-031-73). Una porción de 25 gramos de muestra se deposita en una cápsula de

porcelana y se deseca en la estufa a 105°C durante 6 horas. Se enfría en el desecador se pesa y se lleva de nuevo a la estufa repitiendo estas operaciones hasta que entre dos pesadas consecutivas, la variación en la pérdida de peso de humedad y materias volátiles sea inferior a 0.02 g.

Por otro lado, para determinar el contenido graso total de las muestras tanto de aceituna como de orujo, referido a riqueza grasa húmeda a partir de los datos de humedad y riqueza grasa seca se utiliza el método de extracción de la grasa en Soxhlet con n-hexano para aceitunas (UNE 55030) y orujo (UNE 55-031-73). La muestra desecada, empleada en la determinación de la humedad, se introduce en el extractor Soxhlet y la extracción de la grasa con n-hexano, se lleva a cabo durante 4 horas aproximadamente. A continuación en la estufa a 105°C se eliminan las trazas de disolvente. Con la cantidad de aceite recuperado, se determina la riqueza grasa seca, y a partir de éste la riqueza de grasa húmeda.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Calibración de instrumentos

Calibración del instrumento de NIR

Para la calibración del NIR se tomaron 2000 muestras de pasta de aceituna procedentes de diferentes zonas de producción de España y Australia. En el caso de orujo se partió de 700 muestras procedentes principalmente de molinos que trabajan en dos fases y con diferente porción de hueso.

El rango de intervalo lineal para la pasta de aceituna estudiado estaba comprendido entre 10.7 y 37.8 % para contenido graso, y entre 22.4 y 69.1 % para humedad, empleando para su cálculo Redes neuronales Artificiales (ANA). Para el caso de orujo el rango era entre 0.9 y 9.3 % para contenido graso, y entre 53.2 y 79.9 % para humedad, aplicándose la regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS). En ambos casos la evaluación de cada método de calibración se realizó mediante validación cruzada prediciendo el contenido en todas las muestras y comparando los resultados con los obtenidos mediante los métodos de referencia.

Calibración del instrumento de RNM

La calibración para la espectroscopía RMN se ha llevado a cabo pesando cantidades exactas de aceite de manera que los rangos de calibración lineal estén comprendidos entre 10.2 y 40.5 % y entre 2.1 y 6.4 % en contenido graso para aceituna y orujo, respectivamente. En el caso de la determinación de la humedad el rango de estudio ha sido (20.2– 70.9) % y (50.2-75.9) % para aceituna y orujo, respectiva-

Tabla 1
Resultados obtenidos de la comparación de los Métodos NIR y RMN con el Método de Referencia para la determinación del contenido graso y humedad en aceitunas de la Sierra de Jaén

Parámetro ²	Método ¹					
	Soxhlet		NIR		RMN	
	% CG	% H	% CG	% H	% CG	% H
n	25	25	25	25	25	25
X	24,58	47,15	24,68	47,02	24,33	47,35
V	6,84	3,33	7,28	3,09	6,40	3,85
t _{cal} ³	-	-	0,13	0,34	0,34	0,29
F _{cal} ⁴	-	-	1,06	1,07	1,07	1,16

¹CG = contenido graso; H = humedad

²n = número de muestras analizadas; X= valor medio; V= varianza

³t_{cal}= test de Cochran; t_{tab}= 2,06 (α = 0,05; 24, 2 colas); t_{tab}= 1,71 (α = 0,05; 24, 1 cola)

⁴F_{cal}= test F de Fisher; F_{tab}=1,98 (α = 0,05; 25.25, 1 cola)

mente. Los coeficientes de correlación (r) eran próximos a la unidad (0.992-0.999).

3.2. Estudio comparativo entre las distintas técnicas analíticas

Para este estudio se analizaron muestras de aceituna de distinta procedencia (campaña y sierra) y orujo. Cada muestra se analizó por triplicado mediante las tres técnicas (Soxhlet, espectroscopia NIR y RMN), siguiendo las metodologías indicadas en el apartado 2 (Material y Métodos) para la determinación de contenido graso y humedad en este tipo de muestras. Con vistas a tener un estudio comparativo más exhaustivo se analizaron 25 muestras de cada tipo de aceituna y orujo.

Con vistas a realizar una comparación de precisión de los tres métodos utilizados se utilizó el test F de Fisher (Valcárcel y Ríos, 1992) en el cual se comparan las varianzas de dos conjuntos de datos (F_{cal} = V₁/V₂, donde V₁ V₂). Finalmente el resultado de F_{cal} se compara con el F tabulado (Miller y Miller, 2002). Si F_{cal} es menor F_{tab} se concluye que no existe una diferencia significativa entre los dos grupos de resultados (método NIR ó RMN y el método de referencia).

Para la comparación de la exactitud de los métodos propuestos en este trabajo (NIR Y RMN) con respecto al método de referencia (extracción con Soxhlet), se utiliza el test de Cochran (Valcárcel y Ríos, 1992), en el cual se calcula el valor de t de la siguiente manera:

$$t_{cal} = |X_1 - X_2| / [(V_1/n_1) + (V_2/n_2)]^{1/2}$$

(donde X₁ y X₂ son los valores medios de las medidas, V₁ y V₂ son las varianzas, y n₁ y n₂ es el número de determinaciones en cada grupo de resultados)

Finalmente el valor de t_{cal} se compara con el valor de t tabulado (Miller y Miller, 2002) y si es inferior el valor de t calculado, se deduce que no hay diferencias significativas entre las medias aritméticas de los análisis realizados por ambos métodos (método NIR ó RMN) y el método de referencia (extracción con Soxhlet).

Los resultados obtenidos para la comparación de los distintos métodos para el análisis de aceitunas (campaña y sierra) y orujo se resumen en las Tablas 1-3. Como se puede observar en todos los casos los valores de la F son inferiores al valor de F tabulado [F_{tab}=1.98 (α = 0.05, 25.25, 1 cola)], por lo cual se demuestra que los métodos espectroscópicos NIR y RMN presentan precisiones del mismo orden que el método de referencia (extracción con Soxhlet). Por otro lado, los valores de t también son inferiores a los t tabulados [t_{tab}= 2.06 (α = 0.05, 24, 2 colas); t_{tab}= 1.71 (α = 0.05, 24, 1 cola)], demostrándose que los métodos espectroscópicos propuestos para la determinación del contenido graso y humedad en aceitunas y orujo son exactos para un nivel de significancia de α = 0.05.

Por otro lado, se han realizado las representaciones de Youden (Youden y Steiner, 1987) para la comparación de los resultados obtenidos por los métodos propuestos (NIR y RMN) del contenido graso y humedad para 25 muestras de aceitunas (sierra y campaña) y orujo, y los procedentes de la aplicación del método de referencia a las mismas muestras, respectivamente. En la Tabla 4 se incluyen los

Tabla 2
Resultados obtenidos de la comparación de los Métodos NIR y RMN con el Método de Referencia para la determinación del contenido graso y humedad en aceitunas de la Campiña de Jaén

Parámetro ²	Método ¹					
	Soxhlet		NIR		RMN	
	% CG	% H	% CG	% H	% CG	% H
n	25	25	25	25	25	25
X	22,08	51,68	22,12	51,61	22,03	51,44
V	4,74	6,23	4,49	6,20	4,54	6,08
t _{cal} ³	-	-	0,07	0,11	0,08	0,34
F _{cal} ⁴	-	-	1,06	1,01	1,04	1,02

¹CG = contenido graso; H = humedad

²n = número de muestras analizadas; X= valor medio; V= varianza

³t_{cal}= test de Cochran; t_{tab}= 2,06 (α = 0,05; 24, 2 colas); t_{tab}= 1,71 (α = 0,05, 24, 1 cola)

⁴F_{cal}= test F de Fisher; F_{tab}=1,98 (α = 0,05; 25,25, 1 cola)

Tabla 3
Resultados obtenidos de la comparación de los Métodos NIR y RMN con el Método de Referencia para la determinación del contenido graso y humedad en orujo de Jaén

Parámetro ²	Método ¹					
	Soxhlet		NIR		RMN	
	% CG	% H	% CG	% H	% CG	% H
n	25	25	25	25	25	25
X	2,14	60,09	2,21	60,22	2,20	59,78
V	0,15	5,51	0,14	5,25	0,17	5,46
T _{cal} ³	-	-	0,64	0,19	0,53	0,47
F _{cal} ⁴	-	-	1,12	1,05	1,12	1,01

¹CG = contenido graso; H = humedad

²n = número de muestras analizadas; X= valor medio; V= varianza

³t_{cal}= test de Cochran; t_{tab}= 2,06 (α = 0,05; 24, 2 colas); t_{tab}= 1,71 (α = 0,05; 24, 1 cola)

⁴F_{cal}= test F de Fisher; F_{tab}=1,98 (α = 0,05; 25,25, 1 cola)

resultados de estas representaciones. Los valores del coeficiente de determinación múltiple (R^2) son 0.9198-0.9782 y 0.9228-0.9828 para los métodos espectroscópicos NIR y RMN, respectivamente. Las pendientes de las gráficas son próximas a la unidad en todos los casos (0.9408-1.0558). Como ejemplo, en la Figuras 1 y 2 se pueden observar las representaciones de Youden para la comparación de la determinación del contenido graso en muestras de

aceituna de sierra por NIR y el método estándar, y la determinación de la humedad en muestras de orujo por RMN y el método estándar, respectivamente.

4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos de la comparación de los métodos espectroscópicos NIR y RMN con el método de referencia se puede concluir que los pri-

Tabla 4
Resultados obtenidos de la comparación de los Métodos NIR y RMN y el Método de Referencia mediante la Representación de Youden.

Parámetro ¹	Aceituna Sierra ²				Aceituna Campiña ²				Orujo ²			
	% CG		% H		% CG		% H		% CG		% H	
	NIR	RMN	NIR	RMN	NIR	RMN	NIR	RMN	NIR	RMN	NIR	RMN
CCM	0,9890	0,9838	0,9772	0,9814	0,9817	0,9880	0,9814	0,9913	0,9591	0,9606	0,9674	0,9848
CDR2	0,9782	0,9679	0,9548	0,9632	0,9638	0,9762	0,9631	0,9828	0,9198	0,9228	0,9359	0,9699
R2A	0,9773	0,9665	0,9529	0,9616	0,9622	0,9752	0,9614	0,9820	0,9163	0,9195	0,9331	0,9686
EE	0,3937	0,4791	0,3961	0,3574	0,4231	0,3429	0,4903	0,3350	0,1134	0,1112	0,6042	0,4157
n	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
a	-0,4026	0,9532	2,6199	-2,4737	1,0242	0,6827	1,0292	0,8385	0,2713	0,0256	3,4686	0,8632
b	1,0203	0,9510	0,9408	1,0558	0,9555	0,9669	0,9786	0,9792	0,9056	1,0160	0,9444	0,9805

¹CCM = coeficiente de correlación múltiple; CDR2 = coeficiente de determinación múltiple R²; R2A = R² ajustado; EE = error estándar; n = número de muestras; a = ordenada en el origen; b = pendiente
²CG = contenido graso; H = humedad

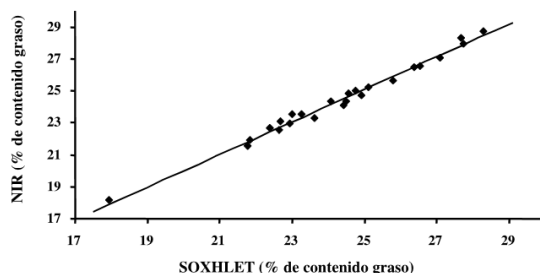


Figura 1

Comparación de los resultados obtenidos en la determinación del contenido graso en muestras de aceituna de sierra mediante el método de referencia (extracción con Soxhlet) y NIR.

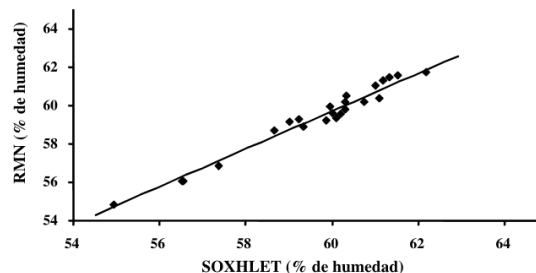


Figura 2

Comparación de los resultados obtenidos en la determinación de la humedad en muestras de orujo mediante el método de referencia (extracción con Soxhlet) y RMN.

meros pueden usarse en el laboratorio para el control del contenido graso y humedad en muestras de aceituna y orujo. Estos métodos son más rápidos y menos laboriosos, por tanto son una buena solución para el análisis de un gran número de muestras, hecho muy demandado en los laboratorios de control de calidad de aceiteras. Con ello se demuestra la viabilidad de la metodología espectroscópica NIR y RMN para el análisis de rutina en los laboratorios de empresas dedicadas a la elaboración y distribución de aceite de oliva y derivados, independientemente del contenido graso y de humedad que posean las muestras analizadas.

También se ha realizado un estudio comparativo de dos tipos de muestras de aceituna procedentes de campiña y de sierra de la provincia de Jaén. En las muestras analizadas, el contenido graso es más elevado en la aceituna de sierra (Tablas 1-2) que en la aceituna procedente de campiña. En cambio, la humedad es superior en las muestras procedentes de la zona de campiña.

Del análisis en orujo (Tabla 3) se puede concluir que el contenido graso es pequeño, si se compara con el contenido en aceituna, siendo el contenido de humedad superior que al de la aceituna.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Universidad de Jaén por la ayuda ofrecida a través del Proyecto de Investigación propio de esta Universidad (Plan de Ayudas para el Fomento a la Investigación, UJA-2002).

BIBLIOGRAFÍA

Aenor, Asociación Española de Normalización y Certificación. (1961). Cuerpos Grasos. Determinación del contenido en materia grasa total de la aceituna. Norma UNE 55030, Madrid, España.

Aenor, Asociación Española de Normalización y Certificación. (1973). Materias Grasas. Humedad y materias volátiles (Método de la estufa de aire). Norma UNE 55-020-73, Madrid, España.

Aenor, Asociación Española de Normalización y Certificación. (1973). Materias Grasas. Determinación de la humedad y materias volátiles en orujo de aceituna. Norma UNE 55-031-73, Madrid, España.

Aenor, Asociación Española de Normalización y Certificación. (1973). Materias Grasas. Determinación del contenido en materia grasa total del orujo de aceituna. Norma UNE 55-032-73, Madrid, España.

Belton, P. S., Delgadillo, I., Holmes E., Nicholls, A., Nicholson J. K. y Spraul, M. (1996). Use of high-field ^1H NMR spectroscopy for the analysis of liquid foods. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1483-1487.

Bertran, E., Iturriaga, H., Maspoch, S. y Montoliu, I. (2001). Effect of orthogonal signal correction on the determination compounds with very similar near infrared spectra. *Anal. Chim. Acta*, **431**, 303-311.

Boskou, D. (1998). Historia y características del olivo en *Química y Tecnología del Aceite de Oliva*, p. 13-24.

Boskou, D. (Ed.). A. Madrid Vicente Ediciones y Mundi Prensas Libros S. A., Madrid.

Castiñeira, M. (1989). La RMN de pulsos en industrias agroalimentarias. II. Aplicaciones. *Revist. Agroquim. Tecnol. Alim.*, **24**, 449-469.

Civantos, C. (1999). Obtención del Aceite de Oliva. 2ª Edición. Editorial Agrícola Española, S. A., Madrid.

Frias, L., García-Ortiz, A., Hermoso, M., Jiménez, A., Llaveró, M. P., Morales, J., Ruano, M. T. y Uceda, M. (1991). Analistas de Laboratorio de Almazara. Serie apuntes nº 6/1991. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, Sevilla.

García Mesa, J. A., Hermoso Fernández, M. y Cáceres Alonso, P. (1996). Determinación del contenido graso y la humedad en orujos de dos fases mediante infrarrojo cercano. *Grasas y Aceites*, **47**, 317-322.


Guillen, M. D. y Cabo, N. (1997). Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *J. Sci. Food Agric.* **75**, 1-11.

Guillen, M. D. y Ruiz, A. (2001). High resolution ^1H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends Food Sci. Technol.* **12**, 328-338.


Hermoso, M., González, J., Uceda, M., García-Ortiz, A., Morales, J., Frías, L. y Fernández, A. (1998). Elaboración de Aceite de Oliva de Calidad. Obtención por el Sistema de Dos Fases. Serie apuntes nº 61/1998.

- Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Jiménez, A., Izquierdo, E., Rodríguez, F., Dueñas, J. I. y Tortosa, C. (2000). Determinación de grasa y humedad en aceitunas mediante medidas de reflectancia en infrarrojo cercano. *Grasas y Aceites*, **51**, 311-315.
- Kiritsakis, A. K. (1991). El Aceite de Oliva. A. Madrid Vicente Ediciones, Madrid.
- Kmieciak, S., Meziane, S., Kadl, H. y Moussaoui, R. (1991). Oil extraction from olive foot cake with acid hexane. *Grasas y Aceites*, **42**, 46-50.
- León, L., Rallo, L. y Garrido, A. (2003). Análisis de aceituna intacta mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS): una herramienta de utilidad en programas de mejora del olivo. *Grasas y Aceites*, **54**, 41-47.
- Mannina, L. y Segre A. (2002). High Resolution Nuclear Magnetic Resonance: from chemical structure to food authenticity. *Grasas y Aceites*, **53**, 22-33.
- Miller, J. N. y Miller, J. C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Prentice-Hall, Madrid.
- Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., Pérez-Villarejo, L. y Ayora-Cañada, M. J. (2004). Determination of oil and water content in olive pomace using near infrared and Raman spectrometry. A comparative study. *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**, 35-41.
- Osborne, B. G. (1993). Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis, 2nd Ed. Wiley, New York.
- Romero Guzmán, F. y Gracian Tous, J. (1983). Aplicación de la resonancia magnética nuclear a la determinación de la riqueza grasa en oleaginosos. III. Aceitunas: factores que afectan a la respuesta del agua. *Grasas y Aceites*, **34**, 249-252.
- Rutledge, D. N. y Tome, D. (1996). Nuclear magnetic resolution NMR en *Analytical Techniques for Food and Agricultural Products*, Linden, G (Ed.), p 249-167. VCH Publisher Inc., New York.
- Sato, T. (1994). Application of principal-component analysis on near-infrared spectroscopic data of vegetable-oils for their classification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 293-298.
- Valcárcel, M. y Ríos, A. (1992). La Calidad en los Laboratorios Analíticos, Capítulo II y III. Reverté, Barcelona.
- Vigli, G., Philippidis, A., Spyros, A. y Dais, P. (2003). Classification of edible oils by employing ³¹P and ¹H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5715-5722.
- Youden, W. J. y Steiner, E. H. (1987). Statistical Manual of the AOAC. 5^a Edición. AOAC Publisher, Arlington.

Recibido: Octubre 2004
Aceptado: Marzo 2005



**IV. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA
LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS E
HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS EN ACEITES DE OLIVA Y DE
ORUJO**



Para el sostenimiento de la agricultura moderna y mantener el suministro de alimentos de origen vegetal la industria agrícola se ha visto ayudada a partir de los años 30 del pasado siglo de los plaguicidas, la expansión de la agricultura durante este período hizo necesaria el uso de este tipo de compuestos químicos. La primera generación de compuestos químicos destinados al control de plagas era de naturaleza inorgánica, los cuales no tuvieron el efecto deseado y se vio obligada a buscar una segunda generación de plaguicidas, el plaguicida estrella de esta generación fue el denominado DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), el éxito de este plaguicida hizo que se desarrollaran otros de la misma familia de organoclorados hasta que se descubrió que esta familia de compuestos tenían una alta persistencia en el Medio Ambiente, eran solubles en lípidos y no eran degradados por los seres vivos, siendo bioacumulados. Tras este descubrimiento se desarrolló la siguiente generación de plaguicidas organofosforados, estos compuestos son inhibidores irreversibles de la enzima acetilcolinesterasa en insectos y mamíferos, estos compuestos presentan una vida media relativamente corta, normalmente días, y en los mamíferos se metabolizan fácilmente a compuestos totalmente inocuos y son eliminados del organismo. El problema de los plaguicidas, independientemente de la generación que sea, es la resistencia que van desarrollando los insectos, algunos de ellos son resistentes a estos compuestos y eso permite que se sigan reproduciendo, siendo las siguientes generaciones resistentes total o parcialmente, esto obliga a aumentar la dosis de plaguicidas necesarios para mantener a las plagas bajo control. Actualmente se han desarrollado otros tipos de insecticidas como son los carbamatos y piretroideos sintéticos, los cuales no son bioacumulativos.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) son una familia de compuestos formados por unión de determinado número de anillos bencénicos, algunos de estos compuestos son usados en los procesos de producción; fenantreno en la producción de plaguicidas, pireno para pigmentos, antraceno y fluoranteno para colorantes y naftaleno en la producción de plásticos. A pesar de eso, la mayoría de PAHs presentes en el Medio Ambiente proceden de la quema o combustión incompleta de materia orgánica. La presencia de estos compuestos en alimentos se origina principalmente por causas naturales y por la contaminación ambiental derivada de la

actividad humana (quema de combustibles, etc.) además de los procesos de cocinado de los alimentos, cocción, asado, parrilla, frituras, etc.

El objetivo de la primera parte de este capítulo radica en la puesta a punto de un método fiable para la determinación simultánea de 26 plaguicidas en muestras de aceite de oliva mediante purificación por cromatografía en geles permeables (GPC) y determinación mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (GC-MS/MS). En la Figura IV-1 se incluye un esquema del procedimiento seguido para el tratamiento de muestras y determinación de contaminantes.

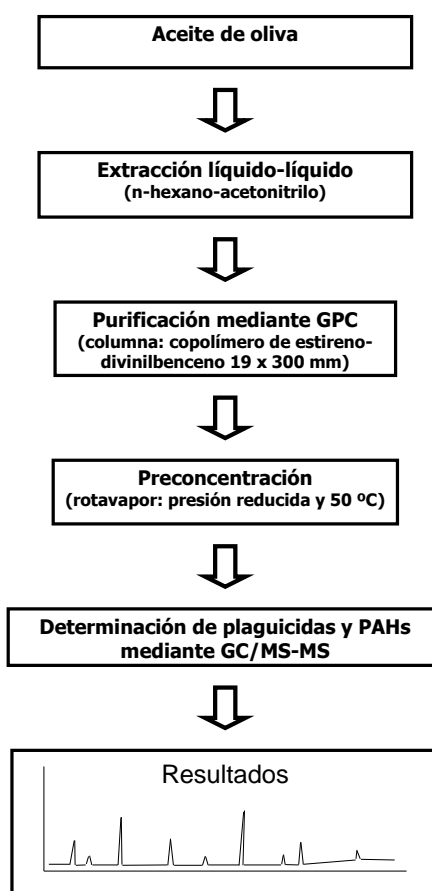


Fig. IV.1. Esquema del procedimiento analítico para la determinación de plaguicidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos en aceite de oliva.

Se han optimizado las diversas variables que afectan a la determinación de este tipo de compuestos en muestras de aceites de oliva. En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de la eficacia de diversos disolventes orgánicos (*n*-hexano, ciclohexano, éter de petróleo, diclorometano, dietil éter, acetonitrilo y metanol) y se concluyó que el uso de

una mezcla de 2 ml de *n*-hexano y 10 ml de acetonitrilo fue la más eficaz para la extracción de plaguicidas contenidos en 2 gramos de aceite. A continuación, se estudiaron las condiciones óptimas para la eliminación de la mezcla de disolventes, viéndose como óptimo el uso de rotavapor a 50 °C a 45 rpm y a baja presión.

Para el uso de GPC se estudió y optimizó tanto la ventana de tiempos para la extracción de los plaguicidas como el disolvente a utilizar como fase móvil, en el caso de la fase móvil el diclorometano fue el elegido frente al resto de disolventes usados (*n*-hexano, ciclohexano, éter de petróleo, dietil éter, acetonitrilo y metanol). La ventana de tiempo resultante para la extracción de los pesticidas se encuentra entre los minutos 14 y 23 teniendo en cuenta un margen de un minuto antes y después del tiempo óptimo (13 y 22 min) para asegurar la extracción completa de los plaguicidas.

El método propuesto proporciona una respuesta lineal en el intervalo comprendido entre 1 y 500 µg/Kg, con límites de detección comprendidos entre 0,1 y 1,6 µg/Kg. La precisión fue estudiada, obteniéndose unos resultados de desviación estándar relativa (RSD) entre 4,93 y 8,11 %. Los porcentajes de recuperación conseguidos con el método eran superiores del 84 %.

Finalmente, el método fue aplicado para la detección de plaguicidas en aceites virgen extra y refinados. En la mayoría de muestras analizadas fue encontrado al menos uno de los plaguicidas objeto de estudio, siendo mayor el número de estos contaminantes encontrados en las muestras de aceite de oliva virgen extra que en las de aceite de oliva refinado.

En la segunda parte de este capítulo se describe el método desarrollado para la determinación simultánea de hidrocarburos policíclicos aromáticos y plaguicidas en aceites de oliva y aceite de orujo. Esta metodología está basada en la descrita en la primera parte de este capítulo, manteniéndose todas las condiciones para el tratamiento de la muestra y su posterior detección (Figura IV.1). En este caso, las características analíticas que del método son las siguientes: a) es lineal en los intervalos de 1–500 µg/Kg para plaguicidas y de 0,3–200 µg/Kg para PAHs; b) los límites de detección encontrados se encuentran entre 0,1 y 1,7 µg/Kg (plaguicidas) y entre 0,05 y 0,07 µg/Kg (PAHs); c) la precisión encontrada, expresada como desviación estándar relativa (RSD)

estaba comprendida entre 3,40 y 8,61 %; d) los porcentajes de recuperación conseguidos se encontraban entre 84 y 110 %.

El método fue aplicado en el análisis de 15 muestras de aceite de oliva y 10 de aceite de orujo. De los resultados obtenidos se puede concluir que los plaguicidas carbaril, diuron, terbutilazina, oxifluorfen y L-cihalotrina se encontraron en la mayoría de las muestras de aceite de oliva virgen. En cambio, en las muestras de aceite de oliva refinado y aceite de orujo el número encontrado de plaguicidas fue inferior. Por otro lado, el aceite de orujo y aceite de oliva refinado la frecuencia de encontrar a los PAHs era superior.



Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography–tandem mass-spectrometric determination

Andrés García Sánchez^a, Natividad Ramos Martos^b, Evaristo Ballesteros^{a,*}

^a Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P.S. of Linares, University of Jaén, E-23700 Linares, Jaén, Spain

^b Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Jaén, E-23071 Jaén, Spain

Received 13 September 2005; received in revised form 4 November 2005; accepted 7 November 2005

Available online 19 December 2005

Abstract

A method for the multiresidue analysis of olive oil samples for 26 pesticides is proposed. Residual pesticides are extracted from oil using an *n*-hexane/acetonitrile mixture, extracts being cleaned-up by gel permeation chromatography (GPC) for analysis by gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC–MS/MS). Electron ionization and chemical ionization are employed in a single analysis for the determination of pesticides. Pesticide recoveries from virgin and refined olive oil spiked with 10, 100 and 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ concentrations of the pesticides ranged from 83.8 to 110.3%. The proposed method features good sensitivity: its limits of quantification are low enough to allow pesticide residues to be determined at concentrations below the maximum residue levels legally accepted. The precision, expressed as relative standard deviation, ranges from 4.93 to 8.11%. Applicability was tested on 40 olive oil samples. Several pesticides were detected in most of the virgin olive oil samples. By contrast, refined olive samples contained few pesticides, and only endosulfan sulphate was detected in all.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pesticides; Olive oil; Gel permeation Chromatography; Gas chromatography; Tandem mass spectrometry

1. Introduction

Several hundreds of pesticides of diverse chemical nature are widely used worldwide for agricultural and non-agricultural purposes. Fortunately, a large fraction of applied pesticides is degraded via chemical, physical or biological mechanisms in soil or water. The residual fraction, however, can persist in the environment and contaminate agricultural products via chemical effects or as a result of too early harvesting. As a consequence, consumers are indirectly exposed to pesticides, usually in minute quantities, in several food groups including meat, dairy products, fruits, vegetables, oil, dried foods, most processed foods and many other household staples [1,2]. In order to protect consumers' health, many countries have restricted the use of pesticides by establishing legal directives on maximum residue levels (MRLs) to control their presence in food [3,4].

Olive oil is a major ingredient of the Mediterranean diet on account of its nutritional and biological properties, but can be contaminated by insecticides and herbicides used in the production of olives. The Codex Alimentarius Commission of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization (WHO) have established MRLs for pesticide residues in olives and olive oil [3]. The European Community has set maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin including olives [4].

The low detection levels required by regulatory bodies and the complex nature of olive oil, efficient sample preparation and trace-level detection and identification capabilities are essential with a view to ensuring reliable analyses. The development of effective methods for pesticide multiresidue analysis is made difficult by the need to simultaneously extract and analyse compounds of variable polarity, volatility, solubility and $\text{p}K_{\text{a}}$. Lentz-Rizos and Avramides have reviewed existing methods for this purpose [5]. Most are based on partitioning between hexane or light petroleum and acetonitrile, followed by clean-up and chromatographic determination. Many clean-up procedures employ fractionation of extracts based on polarity as in liquid–liquid

* Corresponding author. Tel.: +34 953648560; fax: +34 953648560.

E-mail address: eballes@ujaen.es (E. Ballesteros).

partitioning [6,7], or adsorption chromatography using either Florisil, neutral alumina or silica gel column [7–9], or gel permeation chromatography (GPC) [10]. Of the three techniques, GPC appears to be the best suited to multiresidue analysis as it affords clean-up of both polar and non-polar pesticides with a single injection on a fully automated system [11,12].

The technique of choice for the determination and quantification of pesticide residues in olive oil is currently gas chromatography (GC). The development of element-selective and specific detectors, and the replacement of packed columns with capillary columns, have turned GC into a highly successful analytical tool for pesticide analysis [5]. The GC detectors most commonly used for this purpose are of the flame ionization (FID) [11], nitrogen–phosphorus (NPD) [6,7,9,11,13], flame photometric (FPD) [7,12], electron capture [14] or mass-spectrometric (MS) type [15]. In recent years, tandem MS (MS/MS) based on bench-top ion-trap systems has become a major choice for pesticide residue analysis with increased selectivity and sensitivity [16–18].

Some pesticides are thermolabile and hence difficult to volatilize without decomposing. High-performance liquid chromatography (HPLC) can be effective for this purpose [19]. Thus, pesticide residues in olive oil have been successfully determined by reversed-phase liquid chromatography with mass-spectrometric detection [15]. Recently, Goto et al. developed a method for the determination of *N*-methyl carbamate pesticides in wine and juice by electrospray ionization liquid chromatography–tandem mass spectrometry [20]. Liquid chromatographic–triple quadrupole mass spectrometry and the liquid chromatograph–ion trap mass spectrometry have also been compared in the determination of pesticides in oranges [21].

The purpose of this work was to develop a multiresidue method for the determination of pesticide residues in olive oil. Sample preparation involved extraction with various organic solvents and clean-up by gel permeation chromatography. We tested a variety of solvents and GPC purification mechanisms in order to ensure the best possible analytical conditions for determining pesticides in such a complex matrix as olive oil. Gas chromatography with mass-selective detection afforded the determination of the pesticides at concentrations below their maximum allowed level. The proposed method was used to analyse various types of olive oil.

2. Experimental

2.1. Materials

Acetonitrile, *n*-hexane, cyclohexane, dichloromethane, diethyl ether, petroleum ether and methanol, all chromatographic-grade, were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). All products (particularly dichloromethane, which is toxic) were handled with care, using efficient fume hoods and wearing protective gloves. Analytical-grade anhydrous sodium sulphate from Merck (Darmstadt) was also used. The pesticides and bromophos-methyl (the internal standard) were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Germany).

Pesticide stock solutions (50 mg/l) were prepared by dissolving appropriate amounts of the pesticide standards in acetone and stored refrigerated at -20°C in glass-stopped bottles in the dark. Pesticide working solutions were prepared by dilution of the stock solutions in cyclohexane. No degradation of the pesticides was detected under the storage conditions used at any time during the experiment.

2.2. Apparatus and methods

2.2.1. Solvent extraction

An amount of ca. 2 g of filtered olive oil sample was weighed into a 30 ml all-glass measuring flask with *n*-hexane (2 ml) and acetonitrile (10 ml), and supplied with 3 mg of anhydrous sodium sulphate and 40 μl of 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1 μg) of internal standard (IS). The resulting mixture was stirred for 30 min and allowed to stand for 30 min. A volume of 10 ml of the extract (light layer) was then dried in a rotary evaporator at a reduced pressure and at temperature of about 45°C , the residue being collected with 10 ml of dichloromethane for subsequent purification by GPC.

2.2.2. Clean-up by gel permeation chromatography

The GPC system consisted of a Varian Prostar 220 isocratic pump and Varian Prostar 410 auto-sampler attached to two Waters Envirogel GPC clean-up columns: a guard column (150 mm \times 19 mm) and a main clean-up column (300 mm \times 19 mm) packed with styrene–divinylbenzene copolymer (200–400 mesh). A Prostar 704 fraction collector was used to collect extracts, which were passed through a syringe filter (0.2 μm pore size) attached to a disposable plastic 5 ml syringe. The filtered extracts (5 ml, Section 2.2.1) were injected into the GPC column. The flow-rate was set at 5.0 ml/min and the mobile phase was dichloromethane at ambient temperature. The eluent was collected between 14 and 23 min in fraction collector tubes. A Waters 2487 Dual I UV–vis detector (Mildford, MA, USA) was used to make absorbance measurements of the GPC column eluates at 220 and 254 nm. The volume (45 ml) of extract containing the pesticides was reduced to 500 μl in a rotary evaporator at a low pressure at a temperature below 50°C . Finally, the extract was diluted to 1 ml with cyclohexane.

2.2.3. GC–MS analysis

A Varian Instrument GC–MS (Sunnyvale, CA, USA) was used, equipped with a Varian 3800 GC and Saturn 2200 ion trap mass spectrometer. The MS was equipped with electron ionization (EI) and chemical ionization (CI) sources. The GC component was equipped with a 1079 PTV temperature programmable injector, electronic flow control (EFC), CP-1177 split/splitless injector and CP-8400 auto-sampler were used with the GC–MS. The glass liner was furnished with a plug of carbofrit (Resteck, Bellefonte, PA, USA). The sample was separated on HP-5 (crosslinked with 5% phenylmethylpolysiloxane) fused-silica column of 30 mm \times 0.25 mm i.d., with 0.25 μm thickness. A 2 m \times 0.25 mm i.d. column was used as precolumn (deactivated silica tube).

2.2.3.1. GC conditions used for the separation. A 99.999% purity of helium carrier gas at a flow-rate of 1.0 ml/min was used. The PTV injector port temperature was programmed as follows: 70 °C (hold 0.5 min), ramp to 300 °C at 150 °C/min (hold 15 min). The oven temperature program was as follows: 70 °C (hold 3.5 min); ramp to 180 °C at 25 °C/min (hold 10 min); ramp to 300 °C at 4 °C/min (hold 10 min). Sample injection was done in the splitless mode, using a CP-8400 auto-sampler (injected volume 7 μ l).

2.2.3.2. MS conditions used for the detection. The detector temperature (GC–MS transfer line) was 280 °C and the MS conditions were as follows: solvent delay 7 min; electron impact ionization voltage 70 eV; scan-rate 1.5 scans/s; scanned-mass range m/z 80–450. The ion-trap mass spectrometer was operated in the EI mode for the most of the pesticides and also in the CI mode for seven. The filament emission current was 30 and 90 μ A for CI and EI, respectively. The reagent gas used for chemical ionization was methanol. The MS/MS process was carried out by collision-induced dissociation (CID) with non-resonant excitation for all analytes.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of experimental variables

Seven organic solvents (viz. *n*-hexane, cyclohexane, petroleum ether, dichloromethane, diethyl ether, acetonitrile and methanol) were studied as extractants for the pesticides from olive oil. A mixture of 2 ml of *n*-hexane and 10 ml of acetonitrile was found to be the most efficient for extraction of the pesticides from 2 g of refined olive oil containing a 100 μ g/g concentration of pesticides. The use of a vibromatic shaker was found to increase the extraction efficiency. A time of 30 min was found to ensure blending of the mixture of organic solvent and sample to an extent resulting in extraction yields close to 100%.

Extracts were dried in the rotary evaporator. The optimum conditions for this purpose were 50 °C, 45 rpm and a reduced pressure (50% vacuum).

In order to optimize the collection window for the pesticide fraction from GPC system, the extracts (5 ml) obtained as described in Section 2.2.1 were injected into the GPC column at 5.0 ml/min. Dichloromethane was found to provide the most efficient mobile phase among the seven organic solvents studied (*n*-hexane, cyclohexane, petroleum ether, dichloromethane, diethyl ether, acetonitrile and methanol). Molecular masses of most synthetic pesticides was between 200 and 400, whereas that of most lipids ranged from 600 to 1500. Hence, the larger lipid molecules that are too long to pass through the pores of polymer beads are not retained, and they are the first to be eluted from the column [10,22]. As can be seen in Fig. 1, the fat fraction was eluted between 9 and 12 min. On the other hand, the pesticides were detected between 15 and 22 min. Therefore, a pesticide collection window between 14 and 23 min was selected (1 min around the emergence of the pesticide fraction) in order to ensure their complete collection (Fig. 1). No perturbation phenol and

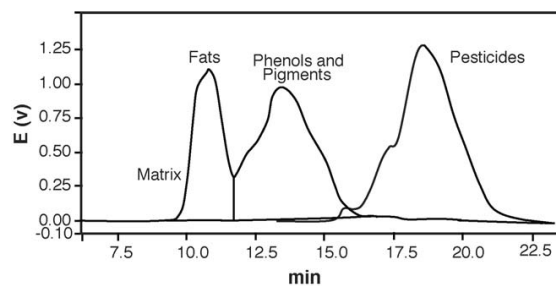


Fig. 1. Fractions obtained upon GPC clean-up of the olive oil extracts as determined by spectrophotometry at 220 and 254 nm.

pigment fraction (between 12 and 17 min) was detected over the chromatographic separation of the pesticides.

3.2. Optimization of the MS/MS parameters

MS/MS processes involve two steps, namely: formation and detection of ions. In the first step, the precursor ion, or an entire cluster of parent ions, are isolated in the trap; in the second, the precursor ion or product ions, are dissociated by collisional activation with an inert gas. Normally, the strongest parent ions are selected; when such ions have a low mass, however, it may be preferable to choose slightly weaker ions of higher mass. Once the ions have been selected, the excitation storage level must be set before the CID step is optimized [23].

The most common way of implementing CID is by applying a radio-frequency (RF) voltage to the end-cap electrodes of the ion trap in order to isolate ions with a selected m/z value or spanning a short range of m/z values. After isolation, a non-resonant excitation voltage is applied over the trap and collisions with helium buffer gas lead to the formation of product ions [24]. In order to perform these operations, the instrument's software uses a procedure called "automated method development" (AMD) for each individual pesticide. The principal variables of this process are the excitation amplitude and the excitation storage level. The parameter values used in this work are listed in Table 1. An excitation time of 25 ms was used throughout.

Once the MS/MS conditions were optimized, quantitation ions were selected and MS/MS spectra stored in our customized MS/MS library, for comparison with those of the target analytes. A positive analyte identification required a minimum spectral fit greater than 800 (with 1000 for identical spectra) and a signal-to-noise (S/N) ratio greater than 3. For quantification, the S/N ratio must be higher than 10.

3.3. Analytical performance

A calibration curve was constructed for each individual pesticide in order to determine its linearity range and limit of detection. The curves, in the form of straight lines, were obtained by injecting extracts of the pesticides at variable concentrations in cyclohexane into the gas chromatograph. The injected extracts were prepared from amounts of 2 g of refined olive oil (without pesticides) that were spiked with variable

Table 1
MS/MS conditions for the monitored pesticides

Serial no.	Pesticide	RTW ^a (min)	Range (m/z)	Precursor ion ^b (m/z)	CID ^c amplitude (V)	CID RF ^d (m/z)	Quantifiers (m/z)	Most abundant ion (m/z)
IS	Bromophos (IS) ^e	21.57–21.97	150–345	331 EI	75	90	284:286 + 316 ^f	286
1	Trichlorfon	7.59–7.99	100–225	221 CI	62	80	141 + 145	141
2	Diuron	8.00–8.30	80–195	187 EI	77	75	124	124
3	Carbaryl	9.87–10.19	100–150	145 CI	51	60	117	117
4	Promecarb	11.80–12.10	80–215	208 CI	20	48	151	151
5	Dimethoate	12.69–12.99	100–240	230 CI	47	100	199	199
6	Simazine	13.01–13.30	100–240	202 CI	72	80	104	104
7	Terbutylazine	13.71–14.01	135–235	230 CI	55	80	174	174
8	Formothion	15.61–16.21	100–205	199 CI	60	90	171 + 157	171
9	Chlorpyrifos methyl	16.48–17.08	80–300	286 EI	75	85	208 + 241	208
10	Parathion methyl	17.02–17.61	80–300	263 EI	44	80	136 + 246	136
11	Pirimiphos methyl	18.70–19.10	100–300	290 EI	64	85	151	151
12	Terbutryn	19.10–19.60	100–300	241 EI	48	75	170 + 185	170
13	Malathion	19.28–20.08	90–180	173 EI	39	75	99 + 127	99
14	Chlorpyrifos	19.77–20.57	150–325	314 EI	98	172	258	258
15	Parathion ethyl	20.57–20.97	110–300	291 EI	58	110	114 + 235	114
16	Methidathion	24.06–24.66	80–150	145 EI	45	70	85	85
17	Endosulfan α	24.72–25.32	150–345	339 EI	54	125	265:267	267
18	Oxyfluorfen	27.00–27.50	100–310	300 EI	90	90	132 + 223	132
19	Endosulfan β	28.34–28.94	150–345	339 EI	53	125	265:267	267
20	Endosulfan sulphate	30.37–30.97	200–395	387 EI	36	71	251:255 + 289	289
21	Diflufenican	31.75–32.35	200–400	394 EI	82	150	266 + 374	374
22	Phosmet	33.20–33.50	90–165	160 EI	74	75	133	133
23	Fenoxycarb	33.50–34.0	100–265	255 EI	60	80	186	186
24	L-Cyhalothrin	35.97–36.37	100–190	181 EI	64	60	152	152
25	α -Cypermethrin	40.65–41.15	85–190	181 EI	84	75	152	152
26	Deltamethrin	44.05–44.55	85–260	253 EI	42	70	172:174	172

^a RTW: retention time window.

^b EI: electron ionization, CI: chemical ionization.

^c CID: collision-induced dissociation.

^d RF: radio-frequency.

^e IS: internal standard.

^f Quantifiers: 284 + 285 + 286 + 316.

concentrations of the pesticides and 1 μg of IS, and subjected to the procedure described in Section 2.2. The linear ranges for the spiked refined olive oil samples are listed in Table 2. Linearity was good throughout the concentration range studied, with correlation coefficients between 0.9910 and 0.9995. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined as the minimum concentrations providing chromatographic signals 3 times and 10 times, respectively, higher than background noise (in our study, blank refined olive oil extracts without pesticides) [25]. The ranges for LOD and LOQ were 0.1–1.6 and 0.3–3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. Similarly, the precision of the method (expressed as repeatability, $n = 11$) was checked on standards containing 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pesticide concentrations; the relative standard deviations obtained are shown in Table 2.

3.4. Recovery study

Pesticide recoveries were determined in triplicate at three different concentration levels (viz. 10, 100 and 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in spiked samples of virgin olive oil and refined olive oil. As can be seen in Table 3, recoveries were satisfactory (>84%), most exceeding 90%. The precision, as determined under repeatability

conditions, was good, with the vast majority of relative standard deviation values falling below 6%.

3.5. Application to olive oil samples

The validated method was applied to the analysis of 40 samples of olive oil (25 of virgin oil and 15 of refined oil) from Andalucía (Spain). This allowed us to compare the pesticides present in the samples depending on the manufacturing procedure used. Each sample was analysed in triplicate following the procedure described in Section 2.2.

As can be seen from Table 4, the virgin olive oil samples contained many of the pesticides studied including oxyfluorfen, endosulfan β , endosulfan sulphate, diflufenican, α -cypermethrin, diuron and terbutylazine. Note the high concentrations of terbutryn in samples V5 and V9, those of terbutylazine in V16 and V17, and that of simazine in V2. By contrast, the refined olive oil samples contained fewer pesticides (see Table 5). This was probably due to some of the pesticides being removed from the refining oil, but remaining in the natural, untreated oil matrix without altering its composition. In any case, all refined oil samples but one (R2) were found to contain endosulfan sulphate. In addition contain diuron, terbutylazine

Table 2
Analytical figures of merit of the determination of pesticides

Serial no.	Pesticide	Linear range ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R^2	R.S.D. ^a (%)	Limit of detection ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Limit of quantification ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	Trichlorfon	5–500	0.9994	6.71	1.6	3.6
2	Diuron	1–500	0.9989	6.14	0.2	0.6
3	Carbaryl	4–500	0.9976	7.35	0.9	2.4
4	Promecarb	2–500	0.9990	6.92	0.4	1.0
5	Dimethoate	2–500	0.9984	6.85	0.3	0.8
6	Simazine	3–500	0.9948	7.80	0.7	1.7
7	Terbutylazine	1–500	0.9917	5.36	0.2	0.7
8	Formothion	1–500	0.9913	5.49	0.2	0.6
9	Chlorpyrifos methyl	2–500	0.9941	5.85	0.2	0.8
10	Parathion methyl	2–500	0.9933	6.12	0.3	0.8
11	Pirimiphos methyl	1–500	0.9916	4.93	0.1	0.3
12	Terbutryn	5–500	0.9983	7.81	1.4	3.4
13	Malathion	2–500	0.9963	6.72	0.4	1.1
14	Chlorpyrifos	2–500	0.9912	6.80	0.3	0.8
15	Parathion ethyl	3–500	0.9954	6.90	0.7	1.8
16	Methodathion	2–500	0.9911	6.12	0.4	1.2
17	Endosulfan α	3–500	0.9910	6.36	0.8	2.2
18	Oxyfluorfen	2–500	0.9948	7.62	0.7	1.5
19	Endosulfan β	3–500	0.9985	8.11	0.7	1.6
20	Endosulfan sulphate	2–500	0.9918	6.98	0.4	1.0
21	Diflufenican	1–500	0.9944	5.22	0.1	0.4
22	Phosmet	1–500	0.9937	5.75	0.1	0.3
23	Fenoxycarb	5–500	0.9989	7.50	1.1	3.2
24	L-Cyhalothrin	1–500	0.9931	5.19	0.1	0.3
25	α -Cypermethrin	1–500	0.9995	6.28	0.2	0.5
26	Deltamethrin	1–500	0.9994	6.32	0.2	0.6

^a Relative standard deviation ($n = 11$) for 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Table 3
Percent recoveries of pesticides spiked to oil samples

Serial no.	Pesticide	Virgin olive oil			Refined olive oil		
		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^a	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^a	250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^a	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^a	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^a	250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^a
1	Trichlorfon	97 \pm 6	105 \pm 3	98 \pm 5	88 \pm 5	107 \pm 4	87 \pm 3
2	Diuron	97 \pm 4	108 \pm 3	105 \pm 3	100 \pm 4	105 \pm 4	94 \pm 3
3	Carbaryl	110 \pm 5	84 \pm 3	103 \pm 3	86 \pm 4	89 \pm 3	88 \pm 3
4	Promecarb	86 \pm 4	93 \pm 3	101 \pm 3	87 \pm 5	93 \pm 4	88 \pm 3
5	Dimethoate	109 \pm 5	107 \pm 3	101 \pm 4	84 \pm 4	86 \pm 3	106 \pm 3
6	Simazine	108 \pm 4	95 \pm 3	100 \pm 4	95 \pm 4	106 \pm 4	106 \pm 4
7	Terbutylazine	102 \pm 3	106 \pm 3	97 \pm 4	92 \pm 6	106 \pm 3	96 \pm 4
8	Formothion	105 \pm 5	90 \pm 3	108 \pm 3	101 \pm 4	102 \pm 3	90 \pm 3
9	Chlorpyrifos methyl	103 \pm 4	103 \pm 3	98 \pm 4	101 \pm 3	99 \pm 3	101 \pm 3
10	Parathion methyl	100 \pm 5	104 \pm 4	98 \pm 3	103 \pm 5	94 \pm 4	102 \pm 3
11	Pirimiphos methyl	94 \pm 4	103 \pm 3	100 \pm 5	101 \pm 4	95 \pm 3	99 \pm 3
12	Terbutryn	96 \pm 5	109 \pm 5	97 \pm 4	106 \pm 5	94 \pm 5	104 \pm 6
13	Malathion	97 \pm 5	98 \pm 3	96 \pm 4	109 \pm 6	88 \pm 3	106 \pm 4
14	Chlorpyrifos	89 \pm 3	99 \pm 4	101 \pm 3	107 \pm 3	92 \pm 4	91 \pm 3
15	Parathion ethyl	90 \pm 4	104 \pm 4	96 \pm 3	109 \pm 3	106 \pm 4	109 \pm 4
16	Methodathion	89 \pm 5	106 \pm 3	96 \pm 3	90 \pm 4	108 \pm 3	110 \pm 4
17	Endosulfan α	97 \pm 3	95 \pm 4	101 \pm 3	103 \pm 3	93 \pm 4	88 \pm 3
18	Oxyfluorfen	95 \pm 3	101 \pm 4	96 \pm 4	103 \pm 4	109 \pm 4	104 \pm 3
19	Endosulfan β	109 \pm 3	104 \pm 4	104 \pm 3	97 \pm 4	106 \pm 4	97 \pm 3
20	Endosulfan sulphate	96 \pm 4	105 \pm 3	98 \pm 4	109 \pm 4	107 \pm 4	101 \pm 3
21	Diflufenican	95 \pm 4	108 \pm 3	94 \pm 4	101 \pm 5	99 \pm 3	103 \pm 4
22	Phosmet	101 \pm 4	107 \pm 3	96 \pm 3	107 \pm 4	98 \pm 4	108 \pm 3
23	Fenoxycarb	87 \pm 5	85 \pm 5	106 \pm 3	110 \pm 3	109 \pm 4	92 \pm 5
24	L-Cyhalothrin	86 \pm 3	90 \pm 4	103 \pm 3	101 \pm 3	96 \pm 4	89 \pm 3
25	α -Cypermethrin	89 \pm 5	105 \pm 4	100 \pm 4	104 \pm 4	97 \pm 3	92 \pm 3
26	Deltamethrin	90 \pm 4	89 \pm 3	93 \pm 4	105 \pm 3	87 \pm 4	103 \pm 3

Percent recovery \pm standard deviation ($n = 3$).

^a Concentration added.

Table 4
Results ($\mu\text{g}/\text{kg}$) obtained in the analysis of virgin olive oil by GPC-GC-MS/MS

Serial no.	Pesticide	V1 ^a	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24	V25
1	Trichlorfon	– ^b	–	–	–	11.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	Diuron	48.0	33.4	46.2	34.2	31.2	26.5	33.7	22.2	46.3	44.0	97.3	42.6	27.6	39.2	81.4	96.2	98.1	107.2	91.4	110	56.3	10.4	21.4	23.6	–
3	Carbaryl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	Promecarb	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5	Dimethoate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	Simazine	–	120.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	Terbutylazine	96.3	51.2	52.4	66.0	–	55.5	62.6	88.8	76.4	64.6	58.3	81.4	65.1	55.4	190.4	–	130.0	166.1	176.0	33.3	34.2	42.5	55.6	5.6	44.4
8	Formothion	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	Chlorpyrifos methyl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	Parathion methyl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	Pirimiphos methyl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	Terbutryn	–	–	–	–	130.0	–	–	–	126.0	–	–	–	–	–	–	111.1	80.0	–	–	–	–	–	–	–	–
13	Malathion	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	Chlorpyrifos	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	23.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	24.7	–	–	–	–
15	Parathion ethyl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16	Methidathion	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17	Endosulfan α	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	Oxyfluorfen	66.3	–	–	–	32.3	46.1	38.8	15.4	29.4	41.2	12.9	–	–	20.2	14.1	19.8	28.4	31.4	31.5	29.4	–	18.4	31.2	29.4	21.0
19	Endosulfan β	39.5	–	–	–	11.4	–	9.4	–	11.1	–	20.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	12.6	–	–	–	–
20	Endosulfan sulphate	52.7	56.0	48.2	42.6	58.1	44.2	46.5	42.6	33.6	30.2	91.7	18.7	22.6	24.5	33.8	31.0	24.3	36.3	21.7	35.0	109.1	31.7	36.7	44.4	28.6
21	Diffufenican	34.3	22.2	10.9	–	12.7	26.8	19.3	9.9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	11.4	12.0	98.0	–
22	Phosmet	15.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23	Fenoxycarb	–	–	–	–	13.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	L-Cyhalothrin	10.8	–	–	–	12.6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25	α -Cypermethrin	76.4	–	–	18.4	26.7	21.3	34.5	17.2	19.2	18.8	27.2	19.0	26.2	20.2	18.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
26	Deltamethrin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	19.3	21.1	22.2	29.7	16.5	10.2	17.7	9.9	10.6

^a V: virgin olive oil.

^b Not detectable.

Table 5
Results ($\mu\text{g}/\text{kg}$) obtained in the analysis of refined olive oil by GPC-GC-MS/MS

Serial no.	Pesticide	R1 ^a	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15
1	Trichlorfon	– ^b	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	Diuron	–	–	–	24.2	–	–	–	–	18.4	9.8	–	31.6	24.6	18.5	20.1
3	Carbaryl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	9.4	–	–	–	–	–
4	Promecarb	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5	Dimethoate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	Simazine	–	–	–	10.6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	Terbutylazine	–	–	–	11.6	–	–	–	9.6	–	11.2	10.9	–	9.6	18.2	9.2
8	Formothion	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	Chlorpyrifos methyl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	Parathion methyl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	Pirimiphos methyl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	Terbutryn	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	Malathion	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	Chlorpyrifos	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
15	Parathion ethyl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16	Methodathion	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17	Endosulfan α	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	Oxyfluorfen	–	–	–	–	–	–	–	–	11.4	–	–	–	–	–	–
19	Endosulfan β	9.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20	Endosulfan sulphate	9.8	–	18.6	9.5	9.7	10.4	11.1	10.2	20.2	31.6	21.6	22.8	19.3	18.9	21.6
21	Diflufenican	–	–	–	10.3	–	–	–	–	22.5	–	–	11.6	12.4	–	24.8
22	Phosmet	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23	Fenoxycarb	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	L-Cyhalothrin	61.4	11.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25	α -Cypermethrin	–	9.9	–	–	–	–	–	–	–	19.4	–	–	–	–	–
26	Deltamethrin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

^a R: refined olive oil.

^b Not detectable.

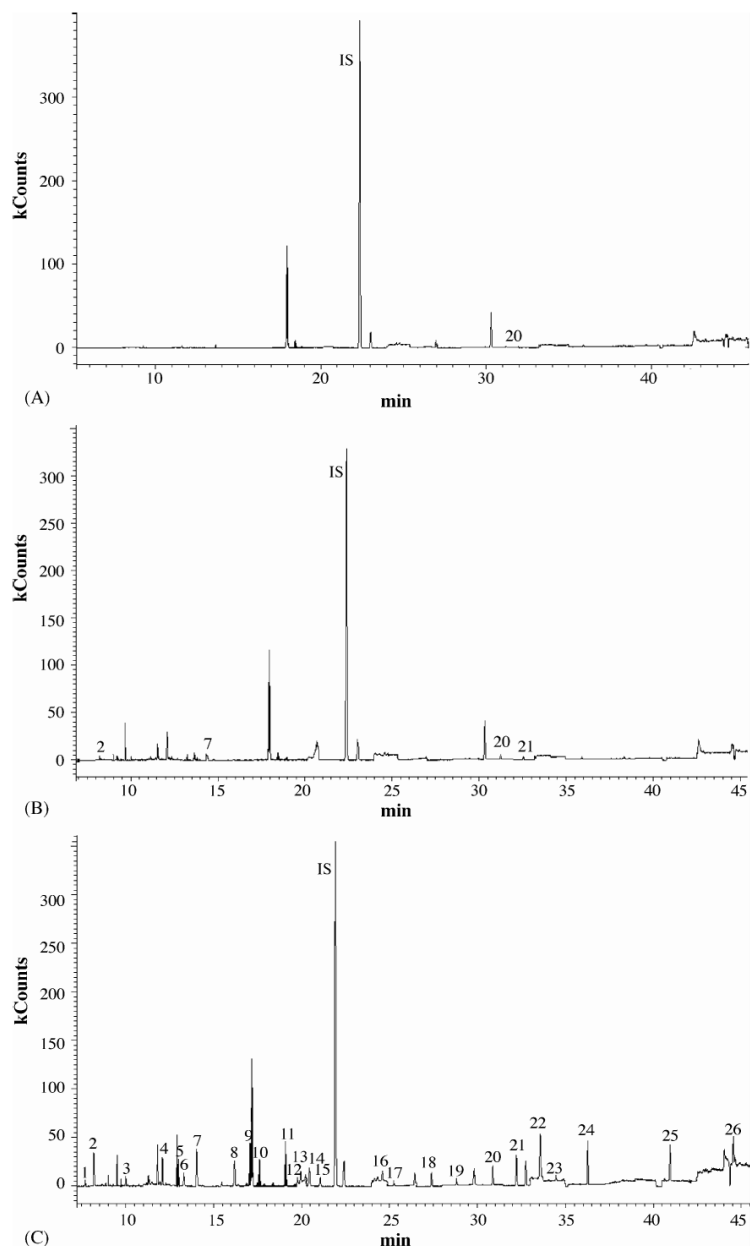


Fig. 2. Gas chromatograms for a sample of refined olive oil (A), virgin olive oil (B) and virgin olive oil spiked with a $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ concentration of 26 pesticides (C). IS, internal standard; 1, trichlorfon; 2, diuron; 3, carbaryl; 4, promecarb; 5, dimethoate; 6, simazine; 7, terbuthylazine; 8, formothion; 9, chlorpyrifos methyl; 10, parathion methyl; 11, pirimiphos methyl; 12, terbutryn; 13, malathion; 14, chlorpyrifos; 15, parathion ethyl; 16, methidathion; 17, endosulfan α ; 18, oxyfluorfen; 19, endosulfan β ; 20, endosulfan sulphate; 21, diflufenican; 22, phosmet; 23, fenoxycarb; 24, L-cyhalothrin; 25, α -cypermethrin; 26, deltamethrin. For other conditions, see Section 2.2.

and diflufenican. Fig. 2 shows the chromatograms obtained in the analysis of refined olive oil (A), virgin olive oil (B) and virgin olive oil spiked with $50 \mu\text{g}/\text{kg}$. As can be seen in Fig. 2A, only one pesticide (endosulfan sulphate) was detected in the refined olive oil. On the other hand, diuron, terbuthylazine, endosulfan sulphate and diflufenican were all detected in virgin olive oil (Fig. 2B).

4. Conclusions

A method for the GPC clean-up of olive oil extracts and determination of 26 pesticides by GC–MS/MS was developed. The GPC technique was found to substantially simplify the removal of fat matter relative to other sample treatments. In addition, the use of tandem MS (MS/MS) with a bench-top ion-trap system

increased the sensitivity of the determination of the pesticides in the oil samples. The accuracy and precision of the method allows its use in routine quality control analyses of olive oil.

The analysis of real revealed the presence of substantial differences in number of pesticides and concentrations between virgin olive oil and refined olive oil. Therefore, refining reduces the amount of residual pesticides in olive oil.

Acknowledgement

The authors would like to thank the University of Jaén (Spain) for financial support (Plan de Ayuda para el Fomento de la Investigación, UJA 2004).

References

- [1] J. Hajslová, in: C.F. Moffat, K.J. Whittle (Eds.), *Environmental Contaminants in Food*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1998, p. 215.
- [2] E. Ballesteros, in: L.M.L. Nollet (Ed.), *Handbook of Food Analysis*, Marcel Dekker, New York, 2004, p. 1177.
- [3] Codex Alimentarius Commission, *Codex Alimentarius Pesticide Residues in Food—Maximum Residues Limits*, second ed., vol. 2B, FAO/WHO, Rome, 1996.
- [4] Pesticide Residues, European Commission, Brussels, 2001, http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pest/index_en.htm.
- [5] C. Lentza-Rizos, E. Avramides, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 141 (1995) 111.
- [6] P. Cabras, A. Angioni, M. Melis, E.V. Minelli, F.M. Pirisi, *J. Chromatogr. A* 761 (1997) 327.
- [7] A.E. Hiskia, M.E. Atmajidou, D.F. Tsipi, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 570.
- [8] J. Tekel, S. Hatrík, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 397.
- [9] L. Rastrelli, K. Totaro, F. De Simone, *Food Chem.* 79 (2002) 303.
- [10] H. Steinwandter, *Fresenius J. Anal. Chem.* 331 (1988) 499.
- [11] J.J. Vreuls, R.J.J. Swen, V.P. Goudriaan, M.A.T. Kerkhoff, G.A. Jongenotter, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 275.
- [12] G.A. Jongenotter, M.A.T. Kerkhoff, C.M. van der Knaap, B.G.M. Vandeginste, *J. High Resolut. Chromatogr.* 22 (1999) 17.
- [13] C. Lentza-Rizos, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 1096.
- [14] C. Lentza-Rizos, E.J. Avramides, E. Visi, *J. Chromatogr. A* 921 (2001) 297.
- [15] S. Barrek, O. Paise, M.F. Grenier-Loustalot, *Anal. Bional. Chem.* 376 (2003) 355.
- [16] R.S. Sheridan, J.R. Meola, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 982.
- [17] F.J. Arrebola, J.L. Martínez Vidal, M.J. González-Rodríguez, A. Garrido-Frenich, N. Sánchez Morito, *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 131.
- [18] K. Patel, R.J. Fussell, M. Hetmanski, D.M. Goodall, B.J. Keely, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 289.
- [19] Y. Picó, C. Blasco, G. Font, *Mass Spectrom. Rev.* 23 (2004) 45.
- [20] T. Goto, Y. Ito, H. Oka, I. Saito, H. Matsumoto, H. Sugiyama, C. Ohkubo, H. Nakazawa, H. Nagase, *Anal. Chim. Acta* 531 (2005) 79.
- [21] C. Soler, J. Mañes, Y. Pico, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 115.
- [22] A. Balinova, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 11.
- [23] S. Schachterle, C. Feigel, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 411.
- [24] J.B. Plomley, M. Lausevic, R.E. March, *Mass Spectrom. Rev.* 19 (2000) 305.
- [25] L.C. Currie, *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 105.



Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry[☆]

E. Ballesteros^{a,*}, A. García Sánchez^a, N. Ramos Martos^b

^a Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P.S. of Linares, University of Jaén, Alfonso X, El Sabio 28, E-23700 Linares (Jaén), Spain

^b Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Jaén, E-23071 Jaén, Spain

Received 8 November 2005; received in revised form 19 January 2006; accepted 24 January 2006

Available online 9 February 2006

Abstract

A multiresidue method for determining major pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in olive oils in a single injection by use of gas chromatography/tandem mass spectrometry (GC–MS/MS) is proposed. Samples are previously extracted with an acetonitrile/*n*-hexane mixture and cleaned up by gel permeation chromatography. Electron ionization and chemical ionization allow pesticides and PAHs to be determined in a single analysis. The precision obtained was quite satisfactory (relative standard deviations ranged from 3 to 7.8%), and so were recoveries (84–110%). The linear relation was observed from 1 to 500 µg/kg for pesticides and 0.3 to 200 µg/kg for PAHs; also, the determination coefficient, R^2 , was better than 0.995 in all instances. The proposed method was applied to the routine analysis of PAH and pesticide residues in virgin and refined olive oil and olive-pomace oil samples.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pesticides; Polycyclic aromatic hydrocarbons; Olive oil; Olive-pomace oil; Gel permeation chromatography; Gas chromatography; Tandem mass spectrometry

1. Introduction

Modern agricultural practices include the use of a variety of pesticides to control pests and diseases, and increase crop yields. The growing public concern about the potential health risks posed by the presence of pesticide residues in the human diet has substantially altered crop protection strategies, which now focus on food quality and safety [1,2]. Accordingly, pesticide usage is subject to strict regulations, especially as regards residual levels in commercial foods—olives and olive oils included. For example, the Codex Alimentarius Commission of the Food and Agriculture Organization (FAO), the World Health Organization (WHO) [3] and the European Community [4] have established maximum residue limits (MRLs) in food for a number of pesticides.

PAHs present in food come mainly from natural sources, environmental pollution (e.g. airborne particulates, fish in polluted waters), food additives and packaging, food preparation procedures (e.g. baking, grilling, roasting, frying) and pyrolysis processes. PAHs in food are among the major factors contributing to human cancer despite their typically low concentrations—in the microgram-per-gram range [5]. A number of authors have reported the presence of PAHs in edible oils and fats [6,7]. These products may be contaminated by environmental pollution and/or during processing steps preceding refining [8]. Such processes include a decolourization step using activated carbon and clays to significantly reduce PAH levels in oil [9]. The International Olive Oil Council recommended in 2001 a value of 2 µg/kg as the maximum tolerable concentration of benzo(a)pyrene and other PAHs in olive-pomace oil [10]. Also, Spain's Ministry of the Presidency has established MRLs for eight PAHs in olive-pomace oil (viz. 2 µg/kg for individual PAHs and 5 µg/kg for their combination) [11].

The low detection levels set by regulatory bodies and the complex nature of olive and olive-pomace oils potentially containing pesticides and PAHs has raised the need to develop

[☆] Presented at the 11th Instrumental Analysis Conference, Barcelona, Spain, 15–17 November 2005.

* Corresponding author. Tel.: +34 953648560; fax: +34 953648560.

E-mail address: eballes@ujaen.es (E. Ballesteros).

simple, sensitive, selective, accurate analytical methods for their routine screening analysis.

Chromatographic methods [particularly gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC)] are specially suitable for residue analysis [12,13]. However, the direct determination of multiresidues in oils is made difficult by the complexity of the matrix, the low levels of the analytes and the variety of interferents potentially present. This entails the use of some sample pretreatment as an essential part of the chromatographic process. The pretreatment usually involves extracting traces of the target analytes from the oil sample and removing co-extracted and co-concentrated components from the matrix to avoid potential interferences (i.e. clean-up). For pesticides, the pretreatment involves partitioning between hexane or petroleum ether and acetonitrile, followed by clean-up by adsorption on alumina or silica gel [2,14,15]. The most common method for extracting PAHs from these matrices involves saponification of lipids with alcoholic KOH, followed by liquid–liquid partitioning and solid-phase purification on silica gel [16,17]. Some authors avoid the laborious saponification step and determine PAHs in vegetable oils by liquid–liquid partitioning between dimethyl sulphoxide [18] or dimethyl formamide [19] and an organic solvent (e.g. *n*-hexane, pentane, cyclohexane), followed by clean-up on silica gel. In recent years, gel permeation chromatography (GPC) has been extensively used in multiresidue methods [1,13] to separate analytes and lipid molecules in oil and fat samples. Thus, Jongenotter et al. [20] developed an automated on-line GPC–GC method for the determination of organophosphorus pesticides in olive oils. Also, PAHs have been determined in smoked meat products by using an analytical method involving accelerated solvent extraction and GPC for efficient lipid removal without saponification and GC quantitation [21].

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) is currently the technique of choice for determining organic contaminants in food samples [22]. The large number of applications reported to date is a result of the efficiency of GC separation and the wealth of qualitative information and high sensitivity provided by MS. A number of methodologies have been developed to determine pesticides in olive oil [23], or in fruits and vegetables [24]. Also, PAHs have been identified and quantified by GC–MS in olive-pomace oil [18,25] and olive oil [26]. In the latter case, a low-pressure wide-bore column was used for GC–MS and the results were compared with those obtained by HPLC with fluorescence detection [26]. In recent years, tandem MS (MS/MS) using bench-top ion-trap systems has proved an effective choice for the analysis of residues of pesticides [27,28], PAHs [29] and other organic contaminants with increased selectivity and sensitivity.

The simultaneous presence of pesticides and PAHs in olive and olive-pomace oils has rarely been considered, however, in multiresidue analyses. In this work, we used GC–MS/MS to identify and quantify in a simultaneous manner a mixture of pesticides and PAHs in these types of sample. To this end, the GPC conditions for clean-up of the fat matrix were optimized by using various organic solvents and variable collection times for the analyte fractions. The results thus obtained were validated

in recovery tests on samples spiked with variable concentrations of the pesticides and PAHs.

2. Experimental

2.1. Materials

Acetonitrile, *n*-hexane, cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate, diethyl ether, petroleum ether and methanol were supplied by Merck (Darmstadt, Germany), all in chromatographic grade. Anhydrous sodium sulphate, also from Merck, was analytical-grade. The pesticides and bromophos-methyl (the internal standard) were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Finally, the PAHs and *p*-terphenyl were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany).

Pesticide and PAH stock solutions (50 mg/l) were prepared by dissolving each pesticide or PAH standard in acetone and storing it in a glass-stopped bottle that was placed in a freezer at -20°C in the dark. Pesticide and PAH working-strength solutions were prepared by dilution of the stock solutions in cyclohexane. No degradation of the pesticides or PAHs was detected under the storage conditions used at any time during the experiments.

2.2. Samples

The virgin olive and refined olive oil samples used were obtained from various producers in Andalucía (southern Spain). Olive-pomace oil samples from the same region were also used; some were analysed as received, whereas others were treated with activated carbon to remove PAH residues introduced as contaminants during the production process [9].

2.3. Extraction

Following filtering, about 2 g of olive oil or olive-pomace oil was weighed into a 30 ml all-glass measuring flask containing *n*-hexane (2 ml) and acetonitrile (10 ml) to which 3 mg of anhydrous sodium sulphate, 40 μl of a solution containing 25 $\mu\text{g/ml}$ (1 μg) bromophos-methyl (the internal standard for pesticides) and 50 μl of one containing 1 $\mu\text{g/ml}$ (0.05 μg) *p*-terphenyl (the internal standard for PAHs) were then added. The resulting mixture was stirred for 30 min and allowed to stand for 30 min. Then, a volume of 10 ml of extract (the light phase) was dried in a rotary evaporator at low pressure at 45°C , the residue being collected with 10 ml of dichloromethane for subsequent purification by GPC.

2.4. Clean-up by gel permeation chromatography

The GPC system comprised a Varian Prostar 220 isocratic pump and a Varian Prostar 410 autosampler furnished with two Waters Envirogel CPG clean-up columns, namely: a guard column (150 mm \times 19 mm) and a main clean-up column (300 mm \times 19 mm) packed with styrene–divinylbenzene copolymer of 200–400 mesh. The extract was collected in a Prostar 704 fraction collector and passed through a syringe filter 0.2 μm in pore size attached to a disposable plastic 5-ml

syringe prior to injection of a 5-ml aliquot into the GPC column. The mobile phase was dichloromethane at ambient temperature and the flow-rate 5.0 ml/min. The eluent was collected between 14 and 24 min in fraction collection tubes. A UV-vis Dual 1 Waters 2487 detector (Milford, MA) was used to measure the absorbance at 220 and 254 nm of the eluate from GPC column. The volume of fraction (50 ml) containing the pesticides and PAHs was reduced by placing it in a rotary evaporator at low pressure at a temperature below 50 °C. Finally, the extract was diluted to 1 ml with cyclohexane.

2.5. GC-MS analysis

GC determinations were carried out on a Varian 3800 gas chromatograph from Varian Instruments (Sunnyvale, CA) equipped with a Saturn 2200 mass spectrometer detector (electronic ionization and chemical ionization with methanol and ion-trap analyser with mass/mass option), a 1079 PTV Universal capillary injector, an EFC control and two columns, namely:

a 2 m × 0.25 mm i.d. precolumn (a deactivated silica tube) and a 30 mm × 0.25 mm i.d., 0.25 μm HP-5 (crosslinked 5% phenylmethylpolysiloxane) fused-silica column. The carrier gas was helium (1.0 ml/min) of purity greater than 99.999%. The PTV injector port temperature was programmed as follows: 70 °C, held for 0.5 min, ramp to 300 °C at 150 °C/min, held for 15 min. The oven temperature was changed as follows: initial level, 70 °C, held for 3.5 min; ramp to 180 °C at 25 °C/min, held for 10 min; ramp to 300 °C at 4 °C/min, held for 12 min. Samples were injected in the splitless mode, using a CP8400 autosampler (injected volume 7 μl). The glass liner was fitted with a plug of carbofrit from Restek (Bellefonte, PA).

The detector temperature (GC-MS transfer line) was 280 °C. Analyses were done with a filament-multiplier delay of 7 min in order to prevent instrument damage. The MS conditions were as follows: electron impact ionization voltage 70 eV; scan-rate 1.5 scans/s; scanned mass range 80–450 *m/z*. The ion-trap mass spectrometer was operated in both the electron ionization (EI) mode and the chemical ionization (CI) mode. The filament

Table 1
MS/MS conditions for the monitored pesticides and PAHs

Residue	RTW ^a (min)	Range (<i>m/z</i>)	Precursor ion ^b (<i>m/z</i>)	CID ^c amplitude (V)	CID RF (<i>m/z</i>)	Product ion-qualifiers (<i>m/z</i>)	Product ion-quantifier (<i>m/z</i>)	Resonant or non-resonant ^d
Bromophos (IS) ^e	21.57–21.97	150–345	331 EI	75	90	284:286 + 316	286	Non resonant
<i>p</i> -Terphenyl (IS) ^e	27.12–27.32	150–310	230 EI	1	85	228 + 215	228	Resonant
Trichlorfon	7.59–7.99	100–225	221 CI	62	80	141 + 145	141	Non resonant
Diuron	8.00–8.30	80–195	187 EI	77	75	124	124	Non resonant
Carbaryl	9.87–10.19	100–150	145 CI	51	60	117	117	Non resonant
Promecarb	11.80–12.10	80–215	208 CI	20	48	151	151	Non resonant
Dimethoate	12.69–12.99	100–240	230 CI	47	100	199	199	Non resonant
Simazine	13.01–13.30	100–240	202 CI	72	80	104	104	Non resonant
Terbuthylazine	13.71–14.01	135–235	230 CI	55	80	174	174	Non resonant
Formothion	15.61–16.21	100–205	199 CI	60	90	171 + 157	171	Non resonant
Chlorpyrifos methyl	16.48–17.08	80–300	286 EI	75	85	208 + 241	208	Non resonant
Parathion methyl	17.02–17.61	80–300	263 EI	44	80	136 + 246	136	Non resonant
Pirimiphos methyl	18.70–19.10	100–300	290 EI	64	85	151	151	Non resonant
Terbutryn	19.10–19.60	100–300	241 EI	48	75	170 + 185	170	Non resonant
Malathion	19.28–20.08	90–180	173 EI	39	75	99 + 127	99	Non resonant
Chlorpyrifos	19.77–20.57	150–325	314 EI	98	172	258	258	Non resonant
Parathion ethyl	20.57–20.97	110–300	291 EI	58	110	114 + 235	114	Non resonant
Methidathion	24.06–24.66	80–150	145 EI	45	70	85	85	Non resonant
Endosulfan α	24.72–25.32	150–345	339 EI	54	125	265:267	267	Non resonant
Oxyfluorfen	27.00–27.50	100–310	300 EI	90	90	132 + 223	132	Non resonant
Endosulfan β	28.34–28.94	150–345	339 EI	53	125	265:267	267	Non resonant
Endosulfan sulphate	30.37–30.97	200–395	387 EI	36	71	251:255 + 289	289	Non resonant
Diflufenican	31.75–32.35	200–400	394 EI	82	150	266 + 374	374	Non resonant
Phosmet	33.20–33.50	90–165	160 EI	74	75	133	133	Non resonant
Fenoxycarb	33.50–34.0	100–265	255 EI	60	80	186	186	Non resonant
<i>L</i> -Cyhalothrin	35.97–36.37	100–190	181 EI	64	60	152	152	Non resonant
α-Cypermethrin	40.65–41.15	85–190	181 EI	84	75	152	152	Non resonant
Deltamethrin	44.05–44.55	85–260	253 EI	42	70	172:174	172	Non resonant
Benzo(k)fluoranthene	40.00–40.30	150–265	252 EI	1.3	90	226 + 250 + 251	250	Resonant
Benzo(e)pyrene	41.30–41.50	150–265	252 EI	1.3	90	226 + 250 + 251	250	Resonant
Benzo(a)pyrene	41.50–41.70	150–265	252 EI	1.3	90	226 + 250 + 251	250	Resonant
Benzo(g,h,i)perylene	47.86–48.06	125–300	276 EI	1.8	90	274 + 275	274	Resonant

^a RTW: retention time window.

^b EI: electron ionization, CI: chemical ionisation.

^c CID: collision-induced dissociation.

^d CID with non-resonant or resonant excitation.

^e IS: internal standard.

emission current was 30 for CI and 90 μA for EI. Methanol was used as the reagent gas for chemical ionization. The MS/MS process was conducted by collision-induced dissociation (CID) with non-resonant (pesticides) or resonant (PAHs) excitation.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the extraction and gel permeation chromatography steps

Various organic solvents (viz. acetonitrile, cyclohexane, dichloromethane, diethyl ether, methanol, *n*-hexane and petroleum ether) were tested as extractants for the pesticide and PAH residues from olive and olive-pomace oils. A mixture of 2 ml of *n*-hexane and 10 ml of acetonitrile was found to be the most efficient for extracting residues from 2 g of refined olive oil containing 100 $\mu\text{g/g}$ concentrations of the pesticides and PAHs. Extraction was more effective if a vibromatic shaker was used; with a shaking time of 30 min, extraction yields approached 100%.

The window for collecting the pesticide and PAH fractions from the GPC system was established by injecting 5 ml aliquots of the extracts obtained as described in Section 2.3 into the

GPC column at 5.0 ml/min. Dichloromethane was found to be the most efficient mobile phase among the eight organic solvents studied (acetonitrile, cyclohexane, dichloromethane, diethyl ether, ethyl acetate, methanol, *n*-hexane, and petroleum ether). The molecular mass of most synthetic pesticides is between 200 and 400, whereas that of most lipids ranges from 600 to 1500. Lipid molecules are too large to enter into the pores of the polymer, so they are not retained by the column and are the first to be eluted [1,13]. Thus, the lipid fraction appeared between 9 and 12 min. On the other hand, the pesticides and PAHs were detected at times between 15 and 23 min. Therefore, a pesticide collection window of 14–24 min (viz. a range spanning 1 min before to 1 min after appearance of the residue fraction) was selected in order to ensure complete collection.

3.2. Optimization of MS–MS variables

MS–MS processes involve two steps, namely: formation of ions and their detection. In the first step, the precursor ion, or an entire cluster of precursor ions, are isolated in the trap; in the second, the precursor ions are dissociated through collisional activation with an inert gas. Normally, the strongest precursor

Table 2
Analytical figures of merit of the determination of pesticides and PAHs

Residue	Linear range ($\mu\text{g/kg}$)	R^2	RSD ^a (%)	Limit of detection ($\mu\text{g/kg}$)	Limit of quantification ($\mu\text{g/kg}$)	MRL ($\mu\text{g/kg}$)
Trichlorfon	5–500	0.9957	6.80	1.5	3.4	500 ^c
Diuron	1–500	0.9997	7.46	0.3	0.9	200 ^c
Carbaryl	3–500	0.9914	8.64	0.7	1.6	25000 ^b
Promecarb	2–500	0.9942	5.62	0.4	1.0	10 ^c
Dimethoate	2–500	0.9916	6.74	0.3	0.8	50 ^b
Simazine	4–500	0.9942	5.96	0.7	1.7	100 ^c
Terbutylazine	1–500	0.9937	7.80	0.2	0.7	50 ^c
Formothion	1–500	0.9966	7.44	0.2	0.6	20 ^c
Chlorpyrifos methyl	2–500	0.9965	7.60	0.4	1.1	50 ^c
Parathion methyl	2–500	0.9986	7.23	0.3	0.8	200 ^c
Pirimiphos methyl	1–500	0.9992	7.21	0.1	0.3	50 ^c
Terbutryne	5–500	0.9952	6.33	0.8	2.2	50 ^c
Malathion	2–500	0.9988	6.45	0.4	1.1	500 ^c
Chlorpyrifos	1–500	0.9989	3.40	0.3	0.8	50 ^c
Parathion ethyl	4–500	0.9989	6.36	0.7	1.8	50 ^c
Methidation	2–500	0.9996	4.94	0.4	1.2	2000 ^b
Endosulfan α	5–500	0.9987	5.86	1.1	2.6	50 ^c
Oxyfluorfen	4–500	0.9978	6.96	0.7	1.5	20 ^c
Endosulfan β	5–500	0.9982	5.91	1.0	2.4	50 ^c
Endosulfan sulphate	3–500	0.9993	4.98	0.4	1.0	50 ^c
Diflufenican	1–500	0.9996	4.19	0.1	0.4	20 ^c
Phosmet	1–500	0.9984	6.72	0.1	0.3	2000 ^c
Fenoxycarb	5–500	0.9931	7.21	1.7	3.8	1000 ^c
L-Cyhalothryn	1–500	0.9998	8.61	0.1	0.3	20 ^c
α -Cypermethrin	1–500	0.9994	6.40	0.2	0.5	50 ^c
Deltamethrin	3–500	0.9996	6.39	0.2	0.6	100 ^c
Benzo(k)fluoranteno	0.3–200	0.9922	5.54	0.06	0.15	2 ^d
Benzo(e)pireno	0.3–200	0.9956	7.03	0.05	0.10	2 ^d
Benzo(a)pireno	0.3–200	0.9980	5.11	0.05	0.10	2 ^d
Benzo(g,h,i)perylene	0.4–200	0.9973	7.76	0.07	0.20	2 ^d

^a Relative standard deviation ($n = 11$) for 10 $\mu\text{g/kg}$ (pesticides) and 1 $\mu\text{g/kg}$ (PAHs).

^b MRL for pesticides in olive oil.

^c MRL for pesticides in olives.

^d MRL for PAHs in olive-pomace oil [4,10,11].

ions are selected; however, when such ions have a low mass it may be preferable to choose slightly weaker ions of a greater mass. Once a choice has been made, the excitation storage level is set before the CID step is optimized [30].

The most common way of performing CID is by applying a radio-frequency (RF) voltage to the end-cap electrodes of the ion trap in order to isolate ions with a selected m/z value or spanning a short range of m/z values. Following isolation, an excitation voltage, whether resonant or non-resonant, is applied over the trap, collisions with helium buffer gas leading to the formation of product ions [31]. The instrument's bundled software includes a procedure for "Automated Method Development" (AMD), which allows the previous tasks to be automatically performed for each pesticide and PAH. The primary variables to be considered in the process are the excitation amplitude and the excitation storage level. The final values used in this work are shown in Table 1. The excitation time was 25 ms for the compounds ionized by EI and 2 ms for those ionized by CI.

Once the MS–MS conditions were optimized, quantitation ions were selected and MS–MS spectra stored in the authors' custom MS–MS library. Finally, the spectra for the target

analytes were compared with those in the library. A positive analyte identification required a minimum spectral fit greater than 850 (with 1000 for two identical spectra) and a signal-to-noise (S/N) ratio above 3. For quantitation, the S/N ratio must be higher than 10.

3.3. Analytical performance

Matrix effects commonly encountered in the determination of residues in food [27,28] were avoided by constructing calibration graphs with refined olive oil (i.e. residue-free oil) as matrix. For this purpose, solutions containing 2 g of refined olive oil in addition to variable concentrations of the pesticides and PAHs, 40 μ l of a solution containing 25 μ g/ml (1 μ g) bromophos-methyl (the internal standard for pesticides) and 50 μ l of a solution containing 1 μ g/ml (0.05 μ g) *p*-terphenyl (the internal standard for PAHs) were prepared as described in Section 2. The linear relations were obtained by injecting extracts of the pesticides and PAHs at variable concentrations in cyclohexane into the gas chromatograph. As can be seen in Table 2, the linear relation was observed over the range 1–500 μ g/kg for pesticides and 0.3–200 μ g/kg for PAHs. Linearity was good

Table 3
Percent recoveries of pesticides and PAHs spiked to the different samples^a

Residue	Virgin olive oil			Refined olive oil			Pomace-olive oil		
	10 μ g/kg ^b	50 μ g/kg ^b	250 μ g/kg ^b	10 μ g/kg ^b	50 μ g/kg ^b	250 μ g/l ^b	10 μ g/kg ^b	50 μ g/kg ^b	250 μ g/kg ^b
Trichlorfon	108 ± 4	98 ± 3	102 ± 3	100 ± 4	97 ± 3	108 ± 4	103 ± 6	102 ± 4	101 ± 4
Diuron	100 ± 4	104 ± 4	94 ± 3	98 ± 3	107 ± 5	98 ± 2	108 ± 3	95 ± 3	100 ± 4
Carbaryl	107 ± 3	98 ± 3	91 ± 4	96 ± 4	104 ± 4	94 ± 4	90 ± 4	87 ± 3	106 ± 6
Promecarb	93 ± 6	103 ± 5	97 ± 3	101 ± 7	93 ± 6	87 ± 5	90 ± 3	97 ± 6	89 ± 5
Dimethoate	97 ± 4	93 ± 4	100 ± 4	101 ± 4	94 ± 4	89 ± 6	93 ± 5	103 ± 4	92 ± 4
Simazine	88 ± 4	109 ± 4	100 ± 4	103 ± 3	106 ± 6	98 ± 2	107 ± 6	101 ± 6	103 ± 6
Terbutylazine	97 ± 4	109 ± 5	96 ± 4	105 ± 3	106 ± 4	90 ± 4	91 ± 7	108 ± 5	102 ± 5
Formothion	97 ± 3	107 ± 4	90 ± 6	94 ± 5	93 ± 4	101 ± 5	87 ± 3	106 ± 4	93 ± 5
Chlorpyrifos methyl	108 ± 3	98 ± 6	102 ± 5	109 ± 2	102 ± 2	94 ± 5	103 ± 4	94 ± 3	91 ± 4
Parathion methyl	93 ± 4	102 ± 4	92 ± 6	84 ± 4	90 ± 4	107 ± 6	90 ± 5	104 ± 4	94 ± 5
Pirimiphos methyl	109 ± 3	96 ± 5	85 ± 6	107 ± 3	102 ± 4	96 ± 2	106 ± 4	108 ± 5	98 ± 4
Terbutryn	98 ± 5	107 ± 6	97 ± 5	87 ± 4	107 ± 4	110 ± 3	97 ± 3	85 ± 3	99 ± 6
Malathion	97 ± 4	85 ± 5	100 ± 6	107 ± 2	92 ± 3	104 ± 6	85 ± 5	105 ± 5	90 ± 3
Chlorpyrifos	103 ± 4	84 ± 4	91 ± 3	108 ± 3	104 ± 2	95 ± 3	85 ± 4	104 ± 6	92 ± 3
Parathion ethyl	93 ± 73	95 ± 5	99 ± 3	87 ± 5	91 ± 3	105 ± 6	97 ± 5	109 ± 3	94 ± 6
Methidathion	84 ± 3	102 ± 7	87 ± 6	89 ± 3	89 ± 3	95 ± 3	87 ± 3	86 ± 3	92 ± 3
Endosulfan α	109 ± 4	109 ± 4	90 ± 4	108 ± 3	100 ± 4	97 ± 5	105 ± 3	110 ± 4	99 ± 5
Oxyfluorfen	96 ± 3	97 ± 3	99 ± 4	110 ± 4	99 ± 2	98 ± 3	108 ± 5	97 ± 7	108 ± 3
Endosulfan β	107 ± 4	108 ± 5	96 ± 6	104 ± 6	110 ± 5	98 ± 3	107 ± 3	94 ± 3	104 ± 4
Endosulfan sulphate	93 ± 4	86 ± 5	95 ± 5	97 ± 3	105 ± 7	87 ± 4	95 ± 4	108 ± 5	85 ± 3
Diflufenican	90 ± 5	92 ± 5	84 ± 4	87 ± 3	94 ± 3	100 ± 4	93 ± 3	109 ± 3	99 ± 3
Phosmet	94 ± 4	90 ± 5	104 ± 3	108 ± 6	104 ± 4	103 ± 6	100 ± 5	102 ± 3	99 ± 3
Fenoxycarb	106 ± 3	108 ± 4	94 ± 6	107 ± 4	107 ± 4	94 ± 5	102 ± 5	109 ± 4	96 ± 4
L-Cyhalothrin	90 ± 3	98 ± 5	92 ± 2	86 ± 3	93 ± 5	101 ± 6	108 ± 7	101 ± 5	94 ± 4
α -Cypermethrin	109 ± 6	101 ± 6	101 ± 6	106 ± 3	94 ± 5	97 ± 4	105 ± 3	101 ± 6	107 ± 3
Deltamethrin	89 ± 4	87 ± 4	98 ± 4	103 ± 7	89 ± 3	96 ± 3	92 ± 5	87 ± 4	109 ± 6
Benzo(k)fluoranthene ^c	86 ± 5	89 ± 5	97 ± 4	84 ± 3	87 ± 3	99 ± 5	103 ± 4	100 ± 4	92 ± 3
Benzo(e)pyrene ^c	100 ± 3	97 ± 4	102 ± 5	88 ± 4	109 ± 5	92 ± 5	87 ± 5	107 ± 4	99 ^{v4}
Benzo(a)pyrene ^c	105 ± 5	100 ± 5	105 ± 4	110 ± 3	84 ± 3	104 ± 5	95 ± 3	94 ± 4	101 ± 4
Benzo(g,h,i)perylene ^c	102 ± 5	86 ± 4	103 ± 5	85 ± 4	110 ± 3	108 ± 4	97 ± 4	108 ± 3	105 ± 4

^a Percent recovery \pm standard deviation ($n = 3$).

^b Concentration added.

^c The concentrations added for PAHs were 1, 2 and 10 μ g/kg (first, second and third column, respectively, for each oil).

throughout, with correlation coefficients between 0.9914 and 0.9998. The limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) for the target analytes were determined as the minimum concentrations providing chromatographic signals three and ten times, respectively, higher than background noise (viz. the blank signals obtained from residue-free refined olive oil extracts) [32]. LODs and LOQs differed between pesticides and PAHs. The precision of the method, expressed as repeatability ($n=11$), was checked on standards containing 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pesticides and 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PAHs; the relative standard deviations thus obtained ranged from 3.40 to 8.64%.

3.4. Analyte recovery

The recoveries of the studied pesticides and PAHs were determined in triplicate at three different levels (viz. 10, 50 and 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for pesticides, and 1, 2 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for PAHs) in spiked samples of virgin and refined olive oils, and olive-pomace oil. As can be seen in Table 3, all recoveries exceeded 84%—and most 90%. The precision as determined under repeatability conditions was good; the vast majority of relative standard deviations were below 7%.

3.5. Application to olive and olive-pomace oil samples

The proposed method was used to determine 26 pesticides and 4 polycyclic aromatic hydrocarbons in 15 samples of virgin and refined olive oil, as well as in 10 of olive-pomace oil. As can be seen from Table 4, terbuthylazine was the pesticide present at the highest concentrations (5.3–175.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in virgin olive oil, followed by endosulfan sulphate and oxyfluorfen (with an average concentration of 18.7 and 8.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively). This type of oil was also found to contain the pesticides carbaryl, diflufenican, L-cyhalothrin and α -cypermethrin—which were present in most of the samples—in substantial amounts. The other pesticides were either absent or present at much lower levels. On the other hand, the PAHs were present at considerably lower concentrations than the pesticides, and also in fewer samples. Benzo(e)pyrene was the most concentrated PAH (0.3–2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

As can be seen from Table 4, the incidence and levels of the pesticides in refined olive oil were low relative to virgin olive oil. This was possibly a result of the pesticides being partly or completely removed during refining of the oil. However, the PAHs studied were present at higher concentrations in some refined

Table 4
Incidence of pesticides and PAHs in virgin and refined olive oil, and olive-pomace oil

Residue	Virgin olive oil			Refined olive oil			Olive-pomace oil		
	n^a	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Min–Max ^b ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n^a	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Min–Max ^b ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n^a	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Min–Max ^b ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Trichlorfon	1	5.2	–	0	–	–	0	–	–
Diuron	15	20.1	1.9–45.5	9	1.7	1.1–2.2	4	2.3	1.2–3.2
Carbaryl	15	4.5	1.6–19.7	5	2.9	1.0–4.4	8	3.9	1.0–8.4
Promecarb	0	–	–	1	1.1	–	0	–	–
Dimethoate	2	1.3	1.2–1.4	0	–	–	2	1.3	1.1–1.5
Simazine	0	–	–	0	–	–	0	–	–
Terbuthylazine	15	56.5	5.3–175.5	6	4.4	1.3–9.2	5	7.5	2.0–12.5
Formothion	0	–	–	4	2.4	1.1–5.7	1	1.2	–
Chlorpyrifos methyl	4	10.7	9.1–12.4	1	6.9	–	3	8.8	6.6–10.6
Parathion methyl	0	–	–	0	–	–	0	–	–
Pirimiphos methyl	1	2.6	–	2	1.2	1.2–1.3	0	–	–
Terbutryn	0	–	–	0	–	–	2	1.7	1.3–2.1
Malathion	0	–	–	0	–	–	0	–	–
Chlorpyrifos	8	3.4	1.3–11.6	3	1.7	1.3–2.2	5	1.5	1.0–2.3
Parathion ethyl	0	–	–	0	–	–	0	–	–
Methidathion	0	–	–	0	–	–	0	–	–
Endosulfan α	1	6.3	–	0	–	–	0	–	–
Oxyfluorfen	14	8.8	1.7–21.0	7	2.1	1.2–4.3	5	3.4	1.7–6.3
Endosulfan β	1	8.7	–	0	–	–	0	–	–
Endosulfan sulphate	15	18.7	11.2–59.1	12	7.0	2.0–11.5	9	7.9	3–16.3
Diflufenican	13	4.5	1.3–8.7	12	3.2	2.0–5.2	7	1.9	1.1–3.3
Phosmet	0	–	–	1	1.0	–	3	1.5	1.4–1.6
Fenoxycarb	0	–	–	0	–	–	0	–	–
L-Cyhalothrin	14	1.4	1.0–3.3	11	1.2	1.0–1.7	8	2.6	1.4–3.7
α -Cypermethrin	12	2.3	1.0–7.3	10	2.0	1.1–3.5	9	4.1	1.3–7.7
Deltamethrin	0	–	–	0	–	–	3	1.6	1.3–2.3
Benzo(k)fluoranthene ^c	3	1.2	0.9–1.4	4	1.0	0.8–1.4	9	40.8	0.8–88.7
Benzo(e)pyrene ^c	5	1.3	0.3–2.0	12	2.2	0.6–3.4	10	14.2	0.8–37.4
Benzo(a)pyrene ^c	6	0.6	0.3–1.2	11	1.0	0.4–2.2	10	19.2	0.5–49.3
Benzo(g,h,i)perylene ^c	7	0.9	0.5–1.5	12	1.2	0.5–3.5	10	31.1	1.0–77.5

^a Number of samples where the residue was detected (15 samples for virgin and refined olive oil, and 10 samples for olive-pomace oil).

^b Min–Max: minimum and maximum residue levels found.

^c Five samples of olive-pomace oil contained levels above the legal limit.

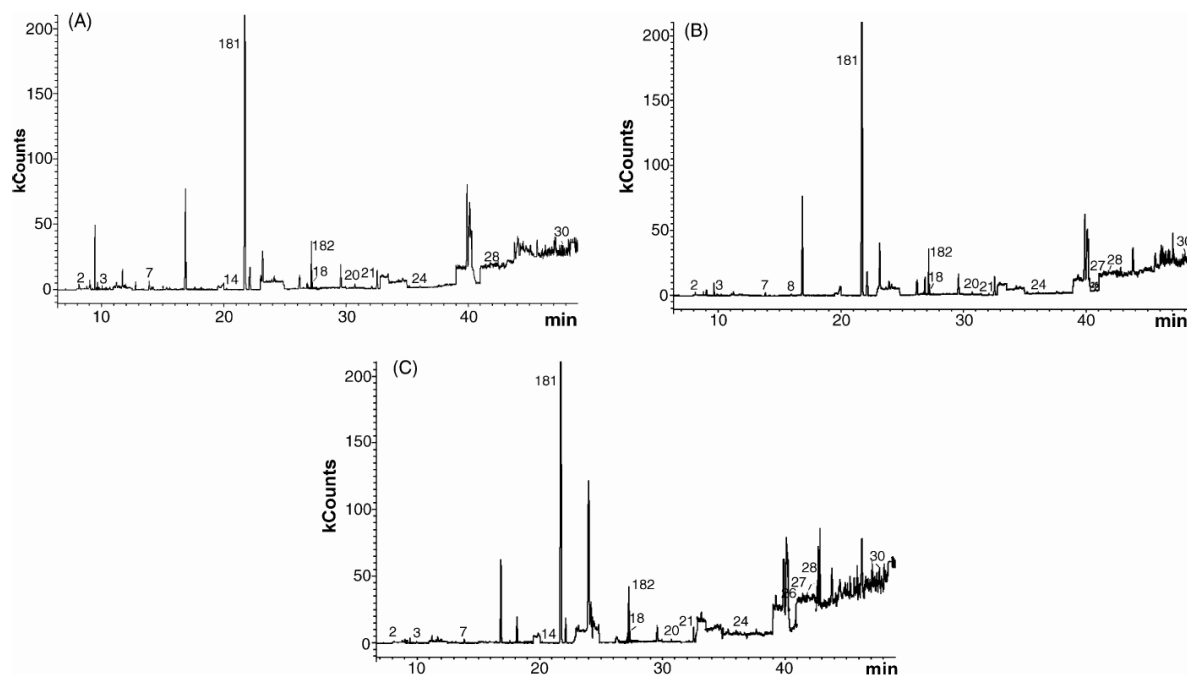


Fig. 1. Gas chromatograms for virgin olive oil (A), refined olive oil (B) and olive-pomace oil (C). IS₁, internal standard for pesticides (bromophos-methyl); IS₂, internal standard for PAHs (*p*-terphenyl); (1) trichlorfon; (2) diuron; (3) carbaryl; (4) promecarb; (5) dimethoate; (6) simazine; (7) terbuthylazine; (8) formothion; (9) chlorpyrifos methyl; (10) parathion methyl; (11) pirimiphos methyl; (12) terbutryn; (13) malathion; (14) chlorpyrifos; (15) parathion ethyl; (16) methidathion; (17) endosulfan α ; (18) oxyfluorfen; (19) endosulfan β ; (20) endosulfan sulphate; (21) diflufenican; (22) phosmet; (23) fenoxycarb; (24) L-cyhalothrin; (25) α -cypermethrin; (26) benzo(k)fluoranthene; (27) benzo(e)pyrene; (28) benzo(a)pyrene; (29) deltamethrin; (30) benzo(g,h,i)perylene.

olive oils than in the virgin olive oils. This may have been the result of the refining process involving heating at temperatures high enough to produce these carcinogenic compounds. Usually, PAHs in refined olive oil are completely or partly removed by passing the oil through a bed of activated carbon and clay (decolourization step) [9]. The studied oils may not have been decolourized—or any PAH reduction procedures applied may have been inefficient.

Finally, we analysed 10 samples of refined olive-pomace oil including 5 that were not decolourized during refining. This only influenced the results for PAHs, which exhibited lower levels in the decolourized samples. Also, the pesticide levels in all samples were low relative to virgin and refined olive oils, and the pesticides were present in fewer samples in the former—again, by effect of the refining process [9].

Fig. 1, which shows the chromatograms obtained for virgin olive oil (A), refined olive oil (B) and olive-pomace oil (C), confirms the above-described results.

4. Conclusions

A method for the simultaneous determination of pesticides and PAHs in olive and olive-pomace oil was developed by optimizing the operating conditions in order to ensure that the pesticide and PAH residues would be present in the same fraction following clean-up and gel permeation chromatography.

The use of electron ionization and chemical ionization in a single analysis allows the simultaneous identity confirmation and quantitation of all residues. The GC–MS/MS technique provides excellent limits of detection in this context. The proposed method is expeditious and robust; it affords more than 500 injections of 7 μ l of GPC fractionated oil samples into the PTV injector of the GC without the need to maintain the GC column or ion source except for the periodic replacement of the glass liner (carbofrit). The proposed method is more simple than existing methods for the separation and determination of pesticides and PAHs in olive and olive-pomace oils. These advantages make the method an effective choice for the determination of pesticides and PAH residues in oil by quality control laboratories in the oil industry. Also, the method could be extended to a wider range of analytes and other types of food.

The increased concentrations of PAHs found in refined olive and olive-pomace oil relative to virgin olive oil suggests that their presence in refined oil is a result of the refining process itself and dictates their decolourization in order to completely or partly remove these toxic products [9].

Acknowledgements

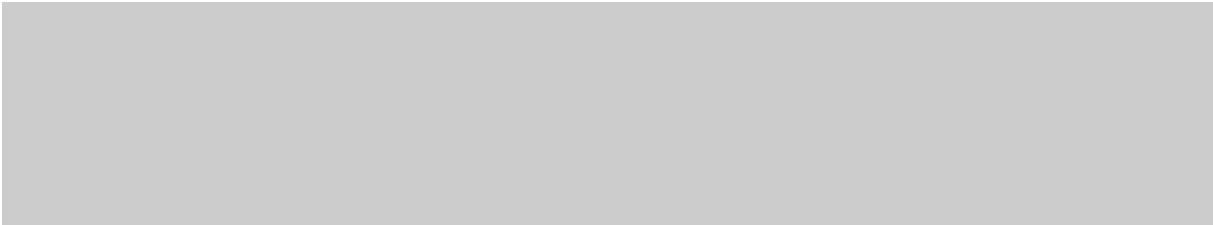
The authors would like to thank the University of Jaén (Spain) for financial support (Plan de Ayuda para el Fomento de la Investigación, UJA 2004).

References

- [1] J. Hajslová, in: C.F. Moffat, K.J. Whittle (Eds.), *Environmental Contaminants in Food*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1998, p. 215.
- [2] W.G. Fong, H.A. Moye, J.N. Seiber, J.P. Toth, *Pesticide Residues in Foods. Methods, Techniques and Regulations*, John Wiley & Sons, New York, 1999.
- [3] Codex Alimentarius Commission, *Codex Alimentarius Pesticide Residues in Food—Maximum Residues Limits*, vol. 2B, second ed., FAO/WHO, Rome, 1996.
- [4] Pesticide Residue. European Commission, Brussels, 2001. http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph-ps/pest/index_en.htm.
- [5] R.H. de Vos, W. van Dokkum, A. Schouten, P. de Jong-Berkhout, *Food Chem. Toxicol.* 28 (1990) 263.
- [6] F. van Stijn, M.A.T. Kerkhoff, B.G.M. Vandeginste, *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 263.
- [7] K. Tamakawa, in: L.M.L. Nollet (Ed.), *Handbook of Food Analysis*, Marcel Dekker, New York, 2004, p. 1449.
- [8] S. Moret, T. Populin, L.S. Conte, K. Crob, H.P. Neukom, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 417.
- [9] W. Moreda, R. Rodríguez-Acuña, M.C. Pérez-Camino, A. Cert, *J. Food Sci. Agric.* 84 (2004) 1759.
- [10] International Olive Oil Council, Resolution no. RES-4/85-IV/O1, <http://www.internationalolive.org>.
- [11] Boletín Oficial del Estado, Orden 25/7/2001 (BOE 26/7/2001), Ministerio de la Presidencia, Madrid, 2001, p. 27397.
- [12] W. Moreda, M.C. Peréz-Camino, A. Cert, *J. Chromatogr. A* 936 (2001) 159.
- [13] E. Ballesteros Tribaldo, in: L.M.L. Nollet (Ed.), *Handbook of Food Analysis*, Marcel Dekker, New York, 2004, p. 1177.
- [14] C. Lentza-Rizos, E. Avramides, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 141 (1995) 111.
- [15] A.E. Hiskia, M.E. Atmajidou, D.F. Tsipi, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 570.
- [16] M.L. Lee, M.V. Novotny, K.D. Bartle, *Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds*, Academic Press, New York, 1981, p. 78.
- [17] S. Moret, L.S. Conte, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 245.
- [18] G. Diletti, G. Scortichini, R. Scarpone, G. Gatti, L. Torreti, G. Migliorati, *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 247.
- [19] A. Marcos Pupin, M.C. Figueiredo Toledo, *Food Chem.* 55 (1996) 185.
- [20] G.A. Jongenotter, M.A.T. Kerkhoff, C.M. van der Knaap, B.G.M. Vandeginste, *J. High Resol. Chromatogr.* 22 (1999) 17.
- [21] W. Jira, *Eur. Food Res. Technol.* 218 (2004) 208.
- [22] S.J. Lehotay, J. Hajslová, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 686.
- [23] S. Barrek, O. Paise, M.F. Grenier-Loustalot, *Anal. Bional. Chem.* 376 (2003) 355.
- [24] D. Stajnbaher, L. Zupancic-Kralj, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 185.
- [25] M.D. Guillén, P. Sopolana, G. Palencia, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2123.
- [26] M.J. Bogusz, S.A. El Hajj, Z. Ehaideb, H. Hassan, M. Al-Tufail, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 1.
- [27] A. Garrido-Frenich, F.J. Arrebola, M.J. González-Rodríguez, J.L. Martínez Vidal, N. Mora Díez, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 1038.
- [28] K. Patel, R.J. Fussell, M. Hetmanski, D.M. Goodall, B.J. Keely, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 289.
- [29] A.H.W. Abdulkadar, A.A.M. Kunhi, A.J. Jassim, A.A. Abdulla, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 1164.
- [30] S. Schachterle, C. Feigel, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 411.
- [31] J.B. Plomley, M. Lausevic, R.E. March, *Mass Spectrom. Rev.* 19 (2000) 305.
- [32] L.C. Currie, *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 105.



V. CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

A tenor de los resultados obtenidos durante el trabajo de investigación realizado en la presente Memoria, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. Se ha puesto a punto una metodología para la determinación de contenido graso y humedad en muestras de aceitunas y orujos que está basada en el uso de las técnicas de espectroscopia en el infrarrojo cercano y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear.
2. Para la calibración del equipo de espectroscopía en el infrarrojo cercano se han llevado a cabo 2000 muestras de aceites de diferentes zonas de España, en el caso de orujos se han usado 700 muestras. El ajuste de los datos se llevó a cabo mediante el uso de Redes Neuronales Artificiales en el caso de los aceites y regresión parcial por mínimos cuadrados para los orujos, en el caso del aceite se obtuvieron intervalos lineales de 10,7–37,8 % y 22,4–69,1 % para contenido graso y humedad respectivamente. En cambio, en orujos los intervalos estaban comprendidos entre 0,9 y 9,3 % y entre 53,2 y 79,9% para contenido graso y humedad, respectivamente.
3. Para la calibración del instrumento de resonancia magnética nuclear se llevó a cabo la medida de aceites y orujos cuyos intervalos de calibración estaban comprendidos entre 10,2 y 40,5 % y entre 2,1 y 6,4% en contenido graso, respectivamente. En el caso de humedad los intervalos comprendían entre 20,2 y 70,9 % y entre 50,2 y 75,9% respectivamente. Además, se obtuvieron coeficientes de correlación (r) cercanos a la unidad (0,992–0,999).
4. Se ha llevado a cabo la comparación la metodología desarrollada para la determinación de contenido graso y humedad en aceitunas y orujos frente al Método Oficial para comprobar su validez y sus ventajas que presente frente a otros métodos para la determinación de estos parámetros tan importantes para poder valorar la calidad de las materias primas para la producción de aceite de

oliva o aceite de orujo. En el caso del estudio de la precisión se ha usado el test F de Fisher, por el cual se concluye que no hay diferencia significativa entre los métodos. Para el estudio de la exactitud se ha utilizado el test de Cochran. P, concluyéndose que tanto la técnica NIR como la RMN presentaban una exactitud muy satisfactoria. En último lugar se llevaron cabo las representaciones de Youden para comparar los resultados obtenidos por los métodos NIR y NMR en diferentes muestras de aceites y orujos, obteniendo pendientes de las rectas cercanas a la unidad en todos los casos.

5. Se ha desarrollado un método analítico para la determinación de 26 plaguicidas en diferentes tipos de aceite de oliva. Este método consta de varias etapas de preparación en las cuales se extraen los analitos mediante la mezcla de n-hexano y acetonitrilo y se purifica el extracto mediante cromatografía en geles permeables. Finalmente, la determinación de los plaguicidas se lleva a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem.
6. El método desarrollado para la determinación de plaguicidas presenta una satisfactoria sensibilidad con límites de detección entre 0.1 y 1.6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. La precisión de este método, calculada como desviación estándar relativa es inferior a 8.1 %, con porcentajes de recuperación entre 83 y 110 %.
7. Se ha propuesto un método multiresiduo para la determinación simultánea de plaguicidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos en aceites de oliva y aceite de orujo basado en el empleo de una etapa de preparación de muestra (extracción líquido-líquido y purificación mediante cromatografía en geles permeables) y una etapa de cuantificación de los analitos mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas en tándem.
8. El método multiresiduo es sensible para detectar a los diferentes contaminantes por debajo de su límite máximo de residuo establecido por la legislación. Los límites de detección encontrados se encuentran entre 0,1 y 1,7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (plaguicidas) y entre 0,05 y 0,07 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (hidrocarburos policíclicos aromáticos).
9. La precisión y exactitud del método son satisfactorias. La precisión encontrada, expresada como desviación estándar relativa (RSD) estaba

comprendida entre 3,40 y 8,61 % y los porcentajes de recuperación conseguidos se encontraban entre 84 y 110 %.

10. El método se propuso a la determinación de diferentes tipos de aceites de oliva (virgen, refinado) y aceite de oliva. En los aceites de oliva refinado se encontraron niveles inferiores de plaguicidas que los encontrados en los otros tipos de aceites. En cambio, la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos era más frecuente en los aceites de oliva refinado y en el aceite de orujo.



**VI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA
INVESTIGACIÓN**



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA INVESTIGACIÓN

Artículos

Título: MULTIRESIDUE ANALYSIS OF PESTICIDES IN OLIVE OIL BY GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY FOLLOWED BY GAS CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS-SPECTROMETRIC DETERMINATION

Revista: Analytica Chimica Acta

Año: 2006

Volumen: 558

Número: 1-2

Página inicial: 53

Página final: 61

Autores: García-Sánchez, Andrés; Ramos-Martos, Natividad; Ballesteros, Evaristo

Título: SIMULTANEOUS MULTIDETERMINATION OF RESIDUES OF PESTICIDES AND POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN OLIVE AND OLIVE-POMACE OILS BY GAS CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY

Revista: Journal of Chromatography A

Año: 2006

Volumen: 1111

Número: 1

Página inicial: 89

Página final: 96

Autores: Ballesteros, Evaristo; García-Sánchez, Andrés; Ramos-Martos, Natividad

Título: ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTAS TÉCNICAS ANALÍTICAS (ESPECTROSCOPIA DE NIR Y RMN Y EXTRACCIÓN MEDIANTE SOXHLET) PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO GRASO Y DE HUMEDAD EN ACEITUNAS Y ORUJO DE JAÉN

Revista: Grasas y Aceites

Año: 2005

Volumen: 56

Número: 3

Página inicial: 220

Página final: 227

Autores: García-Sánchez, Andrés; Ramos-Martos, Natividad; Ballesteros, Evaristo

Capítulos de libro:

Título del capítulo: SIMPLIFICACIÓN/AUTOMATIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA APLICADA A LA DETERMINACIÓN DE COMPONENTES MAYORITARIOS Y RESIDUOS EN ACEITE DE OLIVA Y OTROS PRODUCTOS DERIVADOS DEL OLIVO

Autores del capítulo: Ballesteros, Evaristo; Ramos-Martos, Natividad; García-Sánchez, Andrés.

Título del libro: PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN (2003-2004)

Editor del libro: Gálvez del Postigo-Ruiz, Antonio Miguel

Página inicial: 279

Página final: 307

Lugar: JAÉN

Editorial: UNIVERSIDAD DE JAÉN, SERVICIO DE PUBLICACIONES

ISBN: 84-8439-271-6

Año: 2005

Título del capítulo: SIMPLIFICACIÓN DE LA METODOLOGIA ANALITICA PARA LA DETERMINACION SIMULTÁNEA DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS E HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMATICOS EN ACEITE DE OLIVA

Autores del capítulo: Ballesteros, Evaristo; Ramos-Martos, Natividad; García-Sánchez, Andrés.

Título del libro: PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN (2005-2006)

Editor del libro: Gálvez del Postigo-Ruiz, Antonio Miguel

Página inicial: 7

Página final: 30

Lugar: JAÉN

Editorial: UNIVERSIDAD DE JAÉN, SERVICIO DE PUBLICACIONES

ISBN: 978-84-8439-407-5

Año: 2008

Aportaciones a Congresos:

Título de la aportación: POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS ISOLATION AND DETERMINATION FROM DRINK SAMPLES BY SOLID PHASE EXTRACTION ANALYTE ENRICHMENT AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Nombre del congreso: XXI REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2017

Lugar: VALENCIA, ESPAÑA

Autores: Rascón, Andrés, J.; García-Sánchez, Andrés; Ballesteros, Evaristo.

Título de la aportación: MULTIDETERMINACION DE RESIDUOS DE HIDROCARBUROS POLICICLICOS AROMATICOS Y PLAGUICIDAS EN ACEITE DE OLIVA MEDIANTE CROMATOLOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Nombre del congreso: REUNION DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUIMICA ANALITICA (10) (10.2006.CADIZ, ESPAÑA)

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2006

Lugar: CADIZ, ESPAÑA

Autores: Ballesteros, Evaristo; Ramos-Martos, Natividad; García-Sánchez, Andrés

Título de la aportación: VALIDACION DE METODOS ESPECTROSCOPICOS NIR Y RMN PARA LA DETERMINACION DE HUMEDAD Y MATERIA GRASA EN ACEITUNAS

Nombre del congreso: TERCER CONGRESO VIRTUAL IBEROAMERICANO SOBRE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS

Tipo de evento: Comunicación Virtual en Congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2005

Lugar: INTERNET

Autores: Ballesteros, Evaristo; Ramos-Martos, Natividad; García-Sánchez, Andrés

Título de la aportación: RESIDUOS TÓXICOS EN ACEITE DE OLIVA. DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS

Nombre del congreso: I CONGRESO DE LA CULTURA DEL OLIVO

Tipo de evento: Comunicación Oral en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2005

Lugar: Jaén, ESPAÑA

Autores: Ballesteros, Evaristo; Ramos-Martos, Natividad; García-Sánchez, Andrés

Título de la aportación: DETERMINACIÓN DE MULTIRRESIDUOS DE PLAGUICIDAS E HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN ACEITES VEGETALES MEDIANTE CROMATOLOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Nombre del congreso: JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2005

Lugar: BARCELONA, ESPAÑA

Autores: García-Sánchez, Andrés; Ramos-Martos, Natividad; Ballesteros, Evaristo

Título de la aportación: MULTIRESIDUE ANALYSIS OF PESTICIDES IN OLIVE OILS BY GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY FOLLOWED BY GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS WITH MASSSELECTIVE DETECTION

Nombre del congreso: EUROANALYSIS: EUROPEAN CONFERENCE ON ANALITICAL CHEMISTRY

(13.2004.SALAMANCA, ESPAÑA)

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2004

Lugar: SALAMANCA, ESPAÑA

Autores: García-Sánchez, Andrés; Ramos-Martos, Natividad; Ballesteros, Evaristo

Título de la aportación: COMPARATIVE STUDY OF VARIOUS ANALYTICAL TECHNIQUES (NIR AND NMR SPECTROSCOPY, AND SOXHLET EXTRACTION) FOR THE DETERMINATION OF OIL CONTENT AND HUMIDITY IN OLIVES

Nombre del congreso: XXXIII COLLOQUIUM SPECTROSCOPICUM INTERNATIONALE

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2003

Lugar: GRANADA, ESPAÑA

Autores: Ramos-Martos, Natividad; García-Sánchez, Andrés; Ballesteros, Evaristo