



I Congreso Internacional Current trends and new challenges in olive oil sector



“Autenticación de Aceite de Oliva”: Problemas y posibles soluciones



Manuel León
Instituto de la Grasa (CSIC)
Sevilla – Spain
mleon@ig.csic.es



Definición de Autenticidad

Un alimento es auténtico cuando:
sus características, propiedades y composición
coinciden exactamente con aquellas
que se asocian, describen, o debieran describirse,
en la etiqueta.

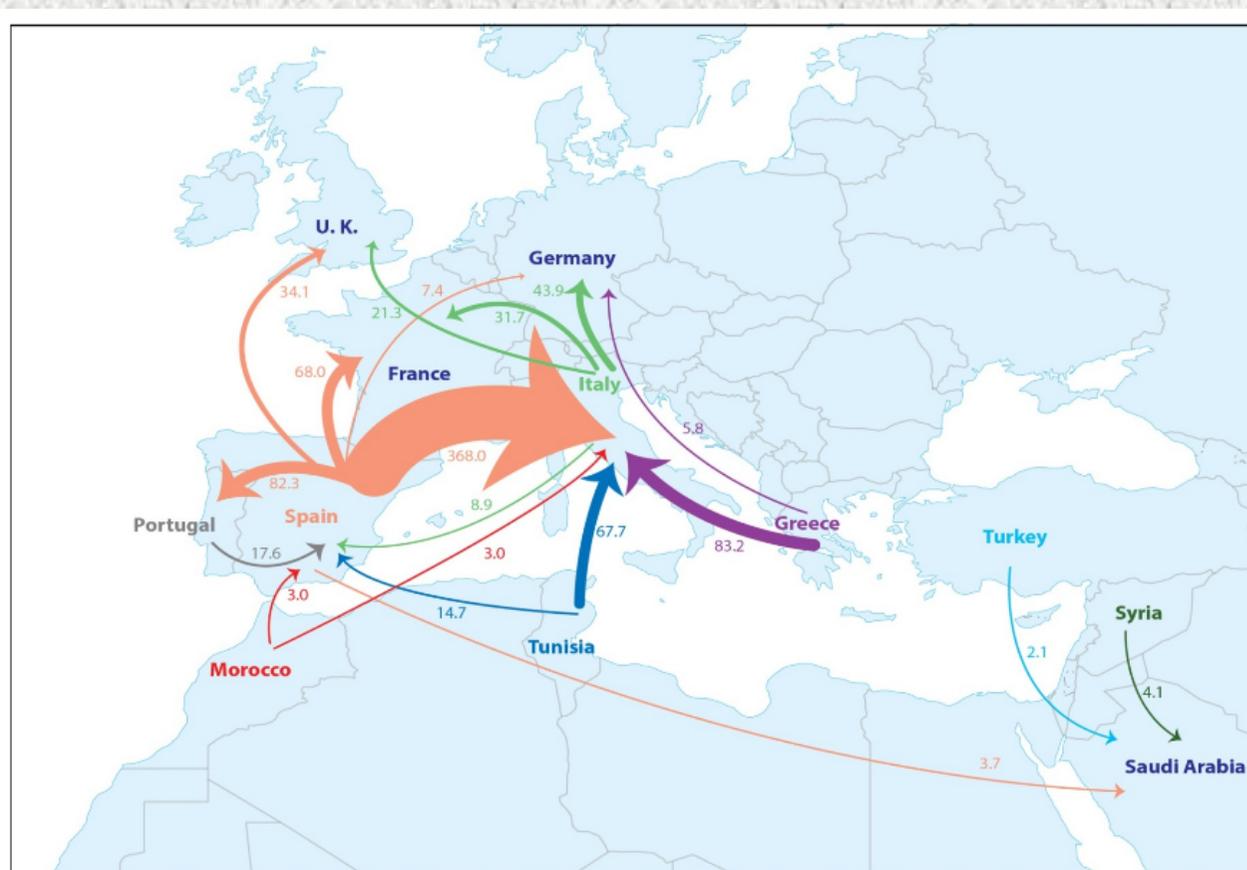




Producción del aceite de oliva virgen en el mundo



- > **Consumo:** Incremento del consumo en países no productores (publicidad local)
- > **Producción:** Incremento del $\approx 50\%$ y producción fuera del área mediterránea



Source: GTIS, Global Trade Atlas database (accessed June 10, 2013).

Note: Trade amounts are shown in thousands of metric tons.



Producción del aceite de oliva virgen en el mundo

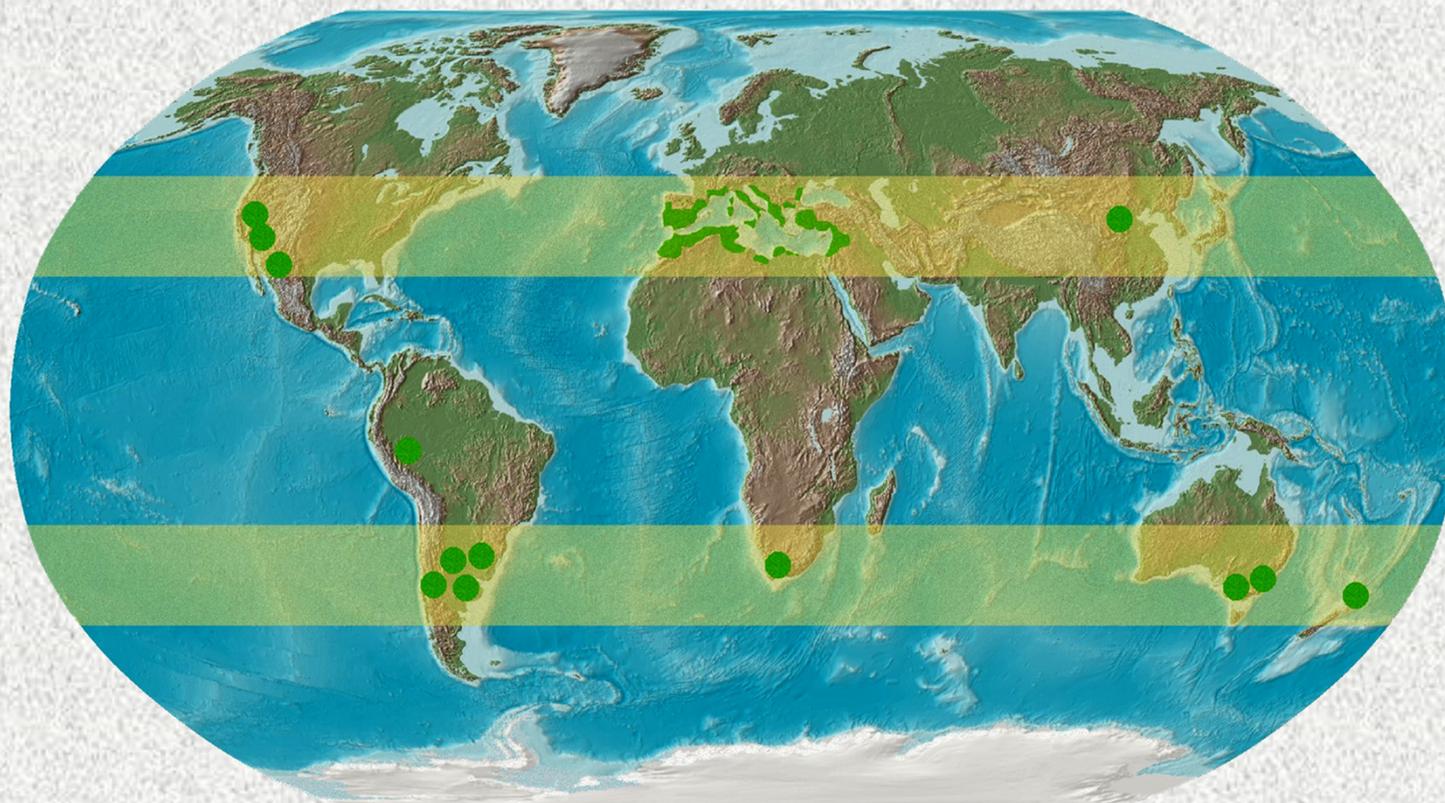


-> **Consumo:** Incremento del consumo en países no productores (publicidad local)

-> **Producción:** Incremento del $\approx 50\%$ y producción fuera del área mediterránea

29 Países productores

Albania
Argelia
Argentina
Australia
Chile
Chipre
Croacia
Egipto
Eslovenia
España
Francia
Grecia
Irán
Israel
Italia
Jordania
Libia
Malta
México
Marruecos
Nueva Zelanda
Palestina
Portugal
Serbia-Montenegro
Sudáfrica
Siria
Túnez
Turquía
Uruguay



D.L. García-González, N. Romero, R. Aparicio J. Agric. Food Chemistry, 58, 12899–12905, 2010

D.L. García-González, N. Tena, R. Aparicio J. Agric. Food Chemistry, 58, 8357–8364, 2010

N. Tena, A. Lazzez, R. Aparicio, D.L. García-González. J. Agric. Food Chemistry, 55, 7852–7858, 2007



Aspectos en la autenticidad del aceite de oliva

Adulteración

- Adición de un aceite más barato a uno más caro.
(p. ej. adición de aceite refinado a AOV)

Origen geográfico

- Información etiquetado falsa
- Trazabilidad
- Caracterización de DOP

Sistema de producción

- Ecológico vs. convencional

Sistema de extracción

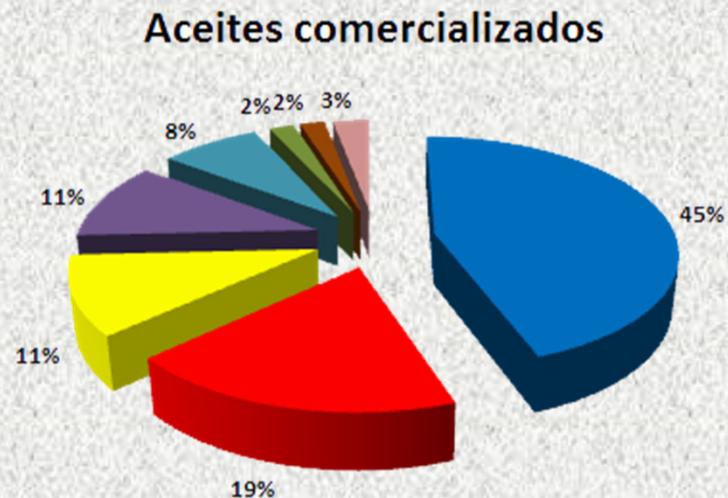
- Centrifugación & Percolación.

Cultivar

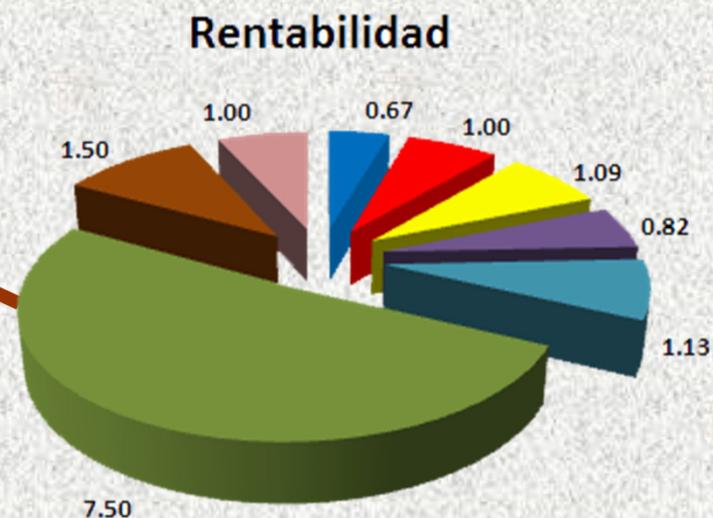
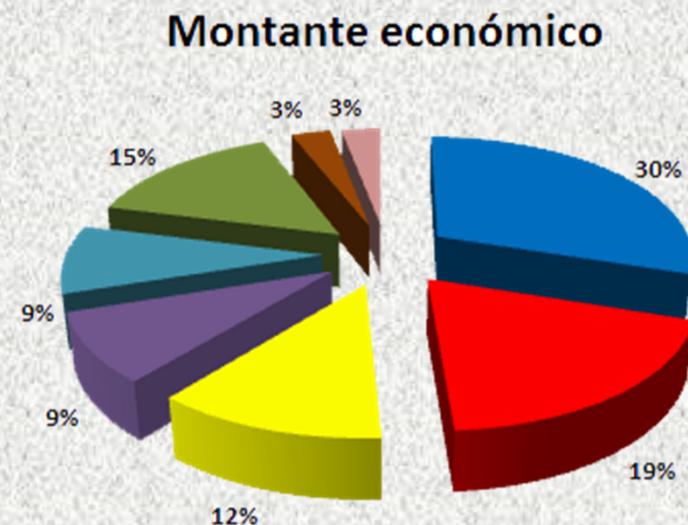
- Caracterización de aceites monovarietales



¿Por qué el aceite de oliva es susceptible de ser adulterado?



- Palma
- Soja
- Girasol
- Colza
- Coco
- Oliva
- Maiz
- Otro



Una irresistible tentación para personas ladinas

Mercado Internacional de Aceites Vegetales Comestibles

Source: The International Olive Oil Council



Herramientas en autenticidad: Compuestos

Los aceites comestibles poseen muchos compuestos químicos, resultados de un sin fin de rutas bioquímicas y químicas

Inconvenientes:

- Amplio rango de concentraciones
- Cientos de aceites comestibles
- Decenas de aspectos de autenticidad

Ventajas:

- Cientos de compuestos químicos
- Docenas de técnicas analíticas & métodos (desde oficiales a in-house)

Miles de problemas potenciales

Decenas de soluciones posibles

Optimismo moderado



Herramientas en autenticidad: Compuestos

FATTY ACIDS

- Palmitic
- Palmitoleic
- Margaric
- Margaroleic
- Stearic
- Oleic
- Linoleic
- Linolenic
- Arachidic
- Gadoleic
- Behenic

PHENOLS

- Hydroxytyrosol
- Tyrosol
- Hty acetate
- 1st derivative Hty
- 1st derivative Ty
- Pinoresinol
- 2nd derivative Hty
- 2nd derivative Ty
- Luteolin
- Apigenin
- Etc

ALCOHOLS

- Phytol
- Erythrodiol
- Docosanol
- Tetracosanol
- Pentacosanol
- Hexacosanol
- Octacosanol
- Taraxerol
- Dammaradienol
- β -Amirine
- Butyrospermol
- Cycloarthenol
- 24-Methylencycloarthenol
- Etc.

HYDROCARBONS

- Copaene
- Valencene
- Muurolene
- Tridecene
- Tetracosane
- Pentacosane
- Hexacosane
- Heptacosane
- Etc.

VOLATILES

- Hexanal
- (E)-2-Hexenal
- Hexanol
- Acetic acid
- Hexyl acetate
- (Z)-3-Hexenol
- Nonanal
- Etc

METALS

- Fe
- Cu
- Etc.

TOCOPHEROLS

- α -tocopherol
- β -tocopherol

WAXES

- C36
- C38
- C40
- C42
- Etc

TRIGLYCERIDES

- LLL
- OLLn
- OOLn
- OLL
- OOO+PoPP
- PoOO
- POP
- LOO+LnPP
- Etc.
- ECN42
- ECN44
- ECN 46
- Etc.

METHYL-STEROLS

- Grammisterol
- Cycloeucalenol
- 24-Ethyllophenol
- Citrostadienol
- Obtusifoliol

PIGMENTS

- Chlorophylls
- Pheophytins
- Pyropheophytins

STEROLS

- Campesterol
- Stigmasterol
- β -Sitosterol
- Δ^5 -Avenasterol
- Δ^7 -Stigmasterol
- Etc.

DIACYLGLYCEROLS

- 1,2 DAG
- 1,3 DAG
- Etc.

ALKYL ESTERS

- Methyl esters
- Ethyl esters

CAROTENOIDS

- β -Carotene
- Lutein
- Neoxanthin
- Antheraxanthin
- Mutatoxanthin
- Violaxanthin
- Luteoxanthin
- Etc.



Herramientas en autenticidad: Compuestos



Electronic Nose



GC-O



NMR 500Mz
NMR 300Mz



HPLC-MS



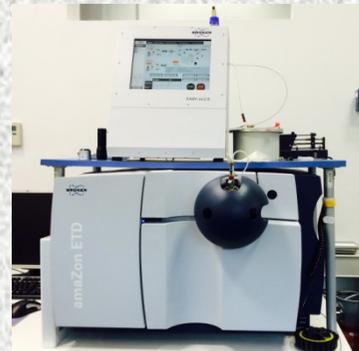
GC x GCMS



HPLC



HPLC



GC-MS



HRGC



SPME-GCMS



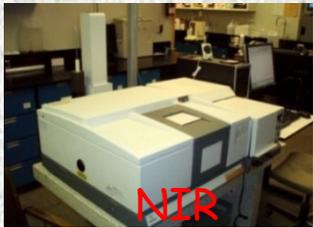
FTIR-ATR



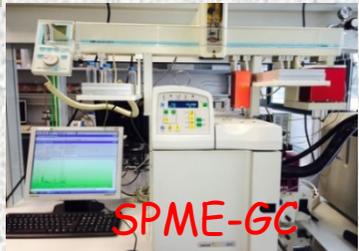
Soft deodorizing plant



FTIR-Cell



NIR



SPME-GC



Métodos oficiales de análisis



Parámetro	Método	Principio/Aparato
Acidez libre	ISO 660:2003 AOCS Cd 3d-63(03)	Valoración
Índice de peróxidos	ISO 3960:2001 AOCS Cd 8b-90(03)	Valoración
Índice de yodo	ISO 3961:1996 AOAC 993.20 AOCS Cd 1d-92 (97)	Valoración Wijs
Características organolépticas	COI/T.20/Doc.15	Panel test
Absorbancia en el ultra-violeta	COI/T.20/Doc.19 ISO 3656:2002 AOCS Ch 5-91(01)	Absorción en UV
Contenido en plomo	AOAC 994.02 ISO 12193:2004 AOCS Ca 18c-91(97)	Absorción atómica
Contenido en arsénico	AOAC 952.13 AOAC 942.17 AOAC 986.15	Absorción atómica
Contenido en cobre e hierro	ISO 8294:1994 AOAC 990.05	Absorción atómica
Disolventes halogenados	COI/T.20/Doc.8	GC
Humedad e impurezas	ISO 662:1998	Gravimetría



Métodos oficiales de análisis



Parámetro	Método	Instrumento
Composición de ácidos grasos	COI/T.20/Doc.24	GC
	ISO 5508:1990	
	AOCS Ch 2-91(02)	
Contenido en ácidos grasos <i>Trans</i>	COI/T.20/Doc.17	GC
	ISO 15304:2002	
	AOCS Ce 1f-96(02)	
Contenido en ceras	COI/T.20/Doc.18	GC
	OCS Ch 8-02(02)	
Contenido en alcoholes alifáticos	COI/T.20/Doc 26	GC
Diferencia entre TAG teóricos y empíricos Contenido de TAGs del ECN42 ¹	COI/T.20/Doc. 20	HPLC
	AOCS Ce 5b-89(97)	
Composición y contenido total de esteroides	COI/T.20/Doc. 10	GC
	ISO 12228 :1999	
	AOCS Ch 6-91 (97)	
Contenido de eritrodol + uvaol	IUPAC 2 431	GC
α -Tocoferol	ISO 9936 :1997	HPLC
Ácidos grasos posición 2 de TAGs	ISO 6800:1997	HPLC
	AOCS Ch 3-91(02)	
Estigmastadienos	COI/T.20/Doc.11	GC, HPLC ²
	ISO 15778-1:1999	
	AOCS Cd 26-96 (03)	

¹ Theoretical values ECN42 & ECN44 in TAGs by COI/T.20/Doc.9

² ISO 15788-2:2003



CENTRANDO EL PROBLEMA

Tipos de adulteraciones

Cualificación
de la
Complicación



- Adición de aceite **refinado** a **aceite de oliva virgen**
- Adición de aceite **crudo** a **aceite de oliva virgen**
- Adición de aceite **refinado** a **aceite de oliva refinado**
- Adición de aceite de oliva **desodorizado** a **AOVE**

Muy Fácil

Fácil

Difícil

Muy difícil



No hay un método global para todos los tipos de adulteraciones



Adición de aceite refinado a aceite de oliva virgen

Métodos oficiales: Presencia de Estigmastadienos por cromatografía de gases.
Determinación de ácidos grasos *cis/trans*.
Base científica: Estigmastadienos se forman a partir de esteroides y tiene...

- **Ventajas:** Excelente LOD (2%) & LOQ (0.1 ppm)
Métodos rápidos y sencillos de implementar.
Información detallada de los ácidos grasos
Detecta la presencia aceites desesterolizados.
- **Inconvenientes:** Problema en aceites poco insaturados y elevado límite de detección para los *trans*.





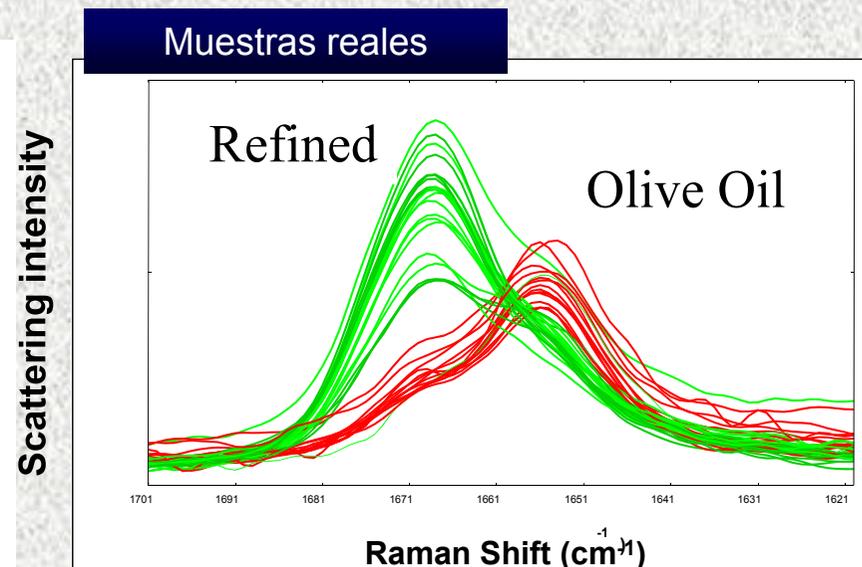
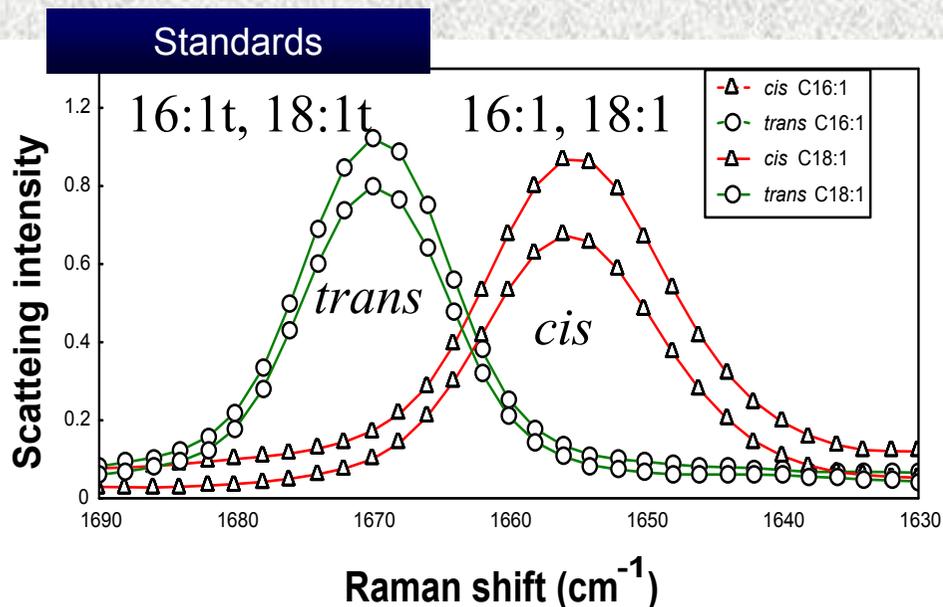
Adición de aceite refinado a aceite de oliva virgen

Método alternativo:

Baeten & Aparicio (2000) Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 4, 196-203

Determinación de ácidos grasos *cis/trans* fatty por FTIR or FT-Raman

- **Ventajas:** Metodología rápida.
- **Inconveniente:** Información no detalla
Problemas con aceites poco insaturados
LOD > Estigmastadieno.



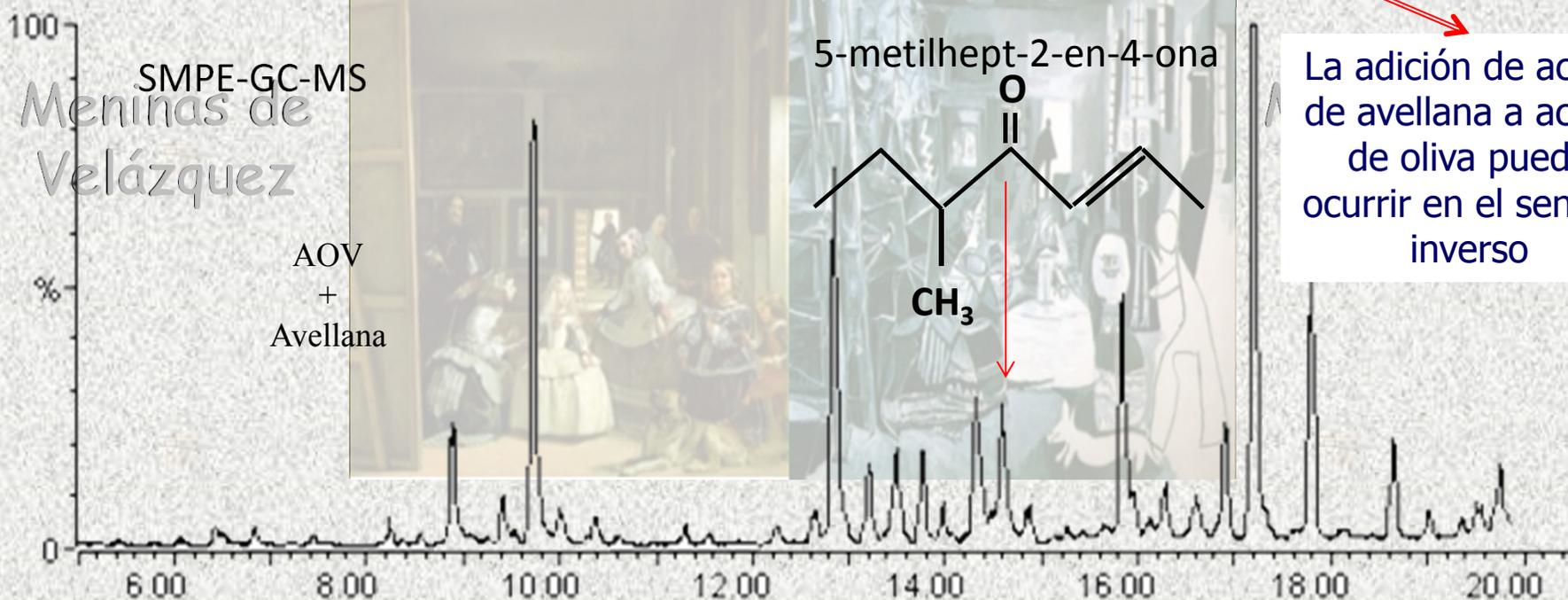


Adición de aceite **crudo** a **aceite de oliva virgen**

Aceite de avellana \rightleftarrows + \rightleftarrows aceite de oliva virgen

Método oficial: Presencia de Filbertona de avellana por cromatografía de gases

Base científica: Rutas bioquímicas de formación de volátiles C8 difieren según cultivo.



La adición de aceite de avellana a aceite de oliva puede ocurrir en el sentido inverso

- **Ventajas:** Rápido, sencillo y barato. LOD (8%) Excelente LOQ (10 ppm filbertona)
- **Inconvenientes:** Aceites muy oxidados pueden enmascarar el pico de la filbertona. 2-Octanona puede interferir en la cuantificación de la filbertona

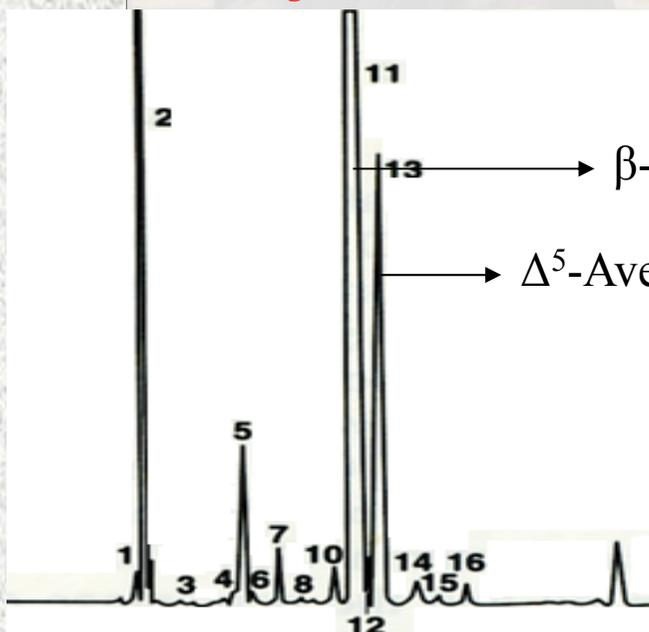


Adición de aceite **refinado** a **aceite de oliva refinado**

Método: Determinación de esteroides por GC

Aceite	Esterol característico	Concentración
Aceite de oliva virgen	β -Sitosterol Δ^5 -Avenasterol	683–2610 mg/kg 34-266mg/kg
Aceite de cártamo	Δ^7 -Estigmastenol	300–550 mg/ kg
Aceite de girasol	Δ^7 -Estigmastenol	150–500 mg/ kg
Aceite de colza	Brassicasterol	100–1100 mg/kg para canola

Aceite de oliva virgen



Algunos ejemplos

Aceite de oliva +	Esterol del Interés	LOD
Aceite de colza	Brassicasterol	~2%
Aceite de soja	Campesterol & Stigmasterol	~10%
Aceite de girasol	Campesterol, Stigmasterol, Δ^7 -Stigmasterol & Δ^7 -Avenasterol	~5%
Aceite de pepita de uva	Campesterol, Stigmasterol	~10%

Louvre es falso! según Erik el Belga
¿estas auténticas o falsas?



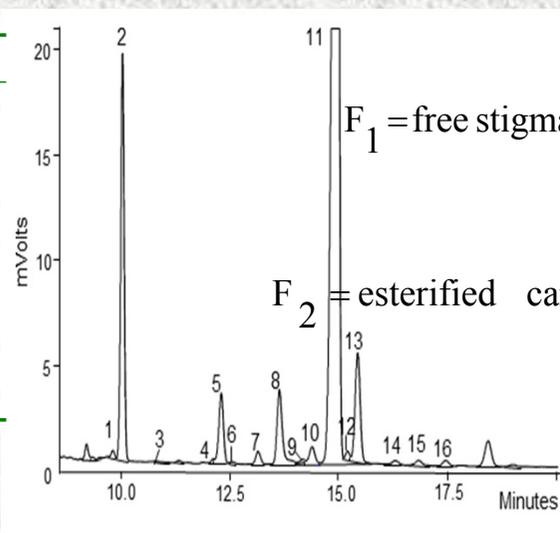
Adición de aceite **refinado** a **aceite de oliva refinado**

Método oficioso: Razón entre ciertos esteroides libres y esterificados (presencia de avellana: HO)

Base científica: Empírica. Diferencias cuantitativas. No hay relación causal.

	I	II	III	IV	V	VI	VII
French HO	76-84	14-16	22-61	1132-1349	16-27	6-12	1336-1599
Italian HO	72	14	61	1229	51	27	1531
Spanish HO	62-87	10-18	41-65	1052-1666	7-17	6-11	1458-1956
Turkish HO	55-95	13-17	19-81	1105-1376	17-30	9-15	1242-1657
European OO ¹	25-114	5-67	34-266	683-2610	Nr	Nr	≥ 1000
North African OO	59-62	16-26	158-214	1545-1851	1-4	8-14	1800-2300
Turkish OO	33-74	15-17	30-218	1000-2025	2-9	5-30	1100-1700

I, campesterol; II, stigmasterol; III, Δ^5 -avenasterol; IV, β -sitosterol;
V, Δ^7 -stigmasterol; VI, Δ^7 -avenasterol; VII, total sterols



$$F_1 = \text{free stigmasterol (ppm)} \times \frac{\text{free } \Delta^7\text{-stigmasterol (\%)}}{\text{esterified } \Delta^7\text{-stigmasterol (\%)}}$$

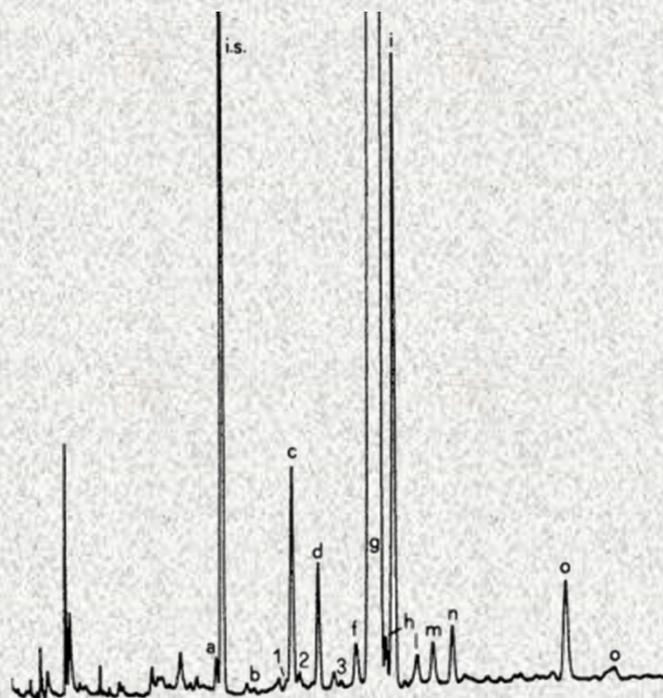
$$F_2 = \text{esterified campesterol} \times \frac{\text{esterified } \Delta^7\text{-stigmasterol}}{\text{esterified } \Delta^7\text{-avenasterol}}$$

- **Ventajas:** Aceptable LOD (6-8%)
- **Inconvenientes:** Método laborioso con pobre reproducibilidad
Numerosos falsos positivos.



Adición de aceite refinado a aceite de oliva refinado

Aceite de orujo de oliva
+
Aceite de oliva virgen/Refinado



Método oficial: Determinación de los dialcoholes terpénicos Eritrodiol & Uvaol, estos debería ser menor del 4.5% esteroides totales.

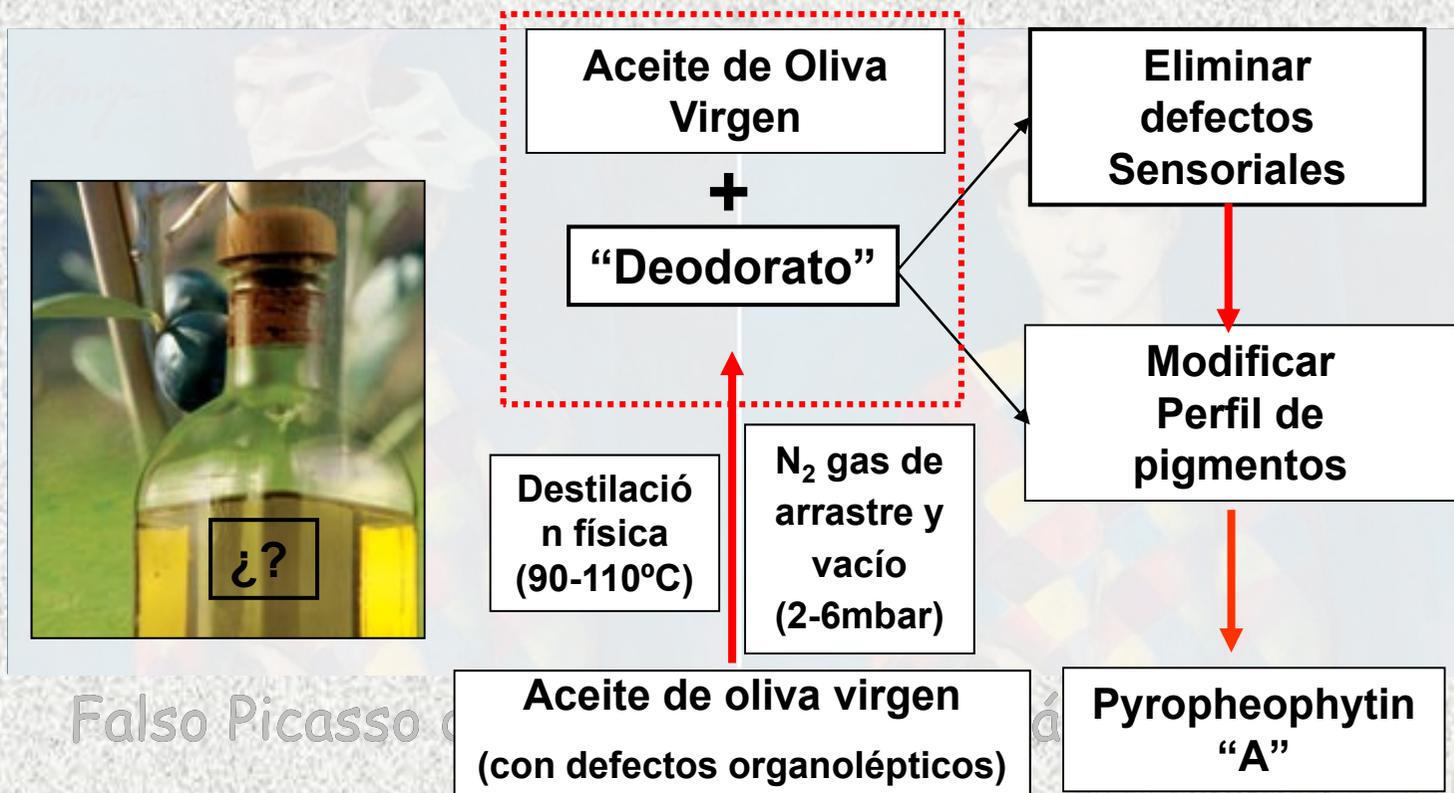
Si es >4.5%

Determinación de ceras (AOV < 250ppm)

- **Ventaja:** Determinado con los esteroides.
- **Inconveniente:** Valores positivos deben ser comprobados con el contenido en ceras, pero esa comprobación está en discusión. Algunas variedades tienen un alto contenido en eritrodiol.



Adición de aceite de oliva **desodorizado** a **AOVE**





Adición de aceite de oliva **desodorizado** a **AOVE**

Método: Razón de Pirofeofitina A y Feofitina A & A' por HPLC

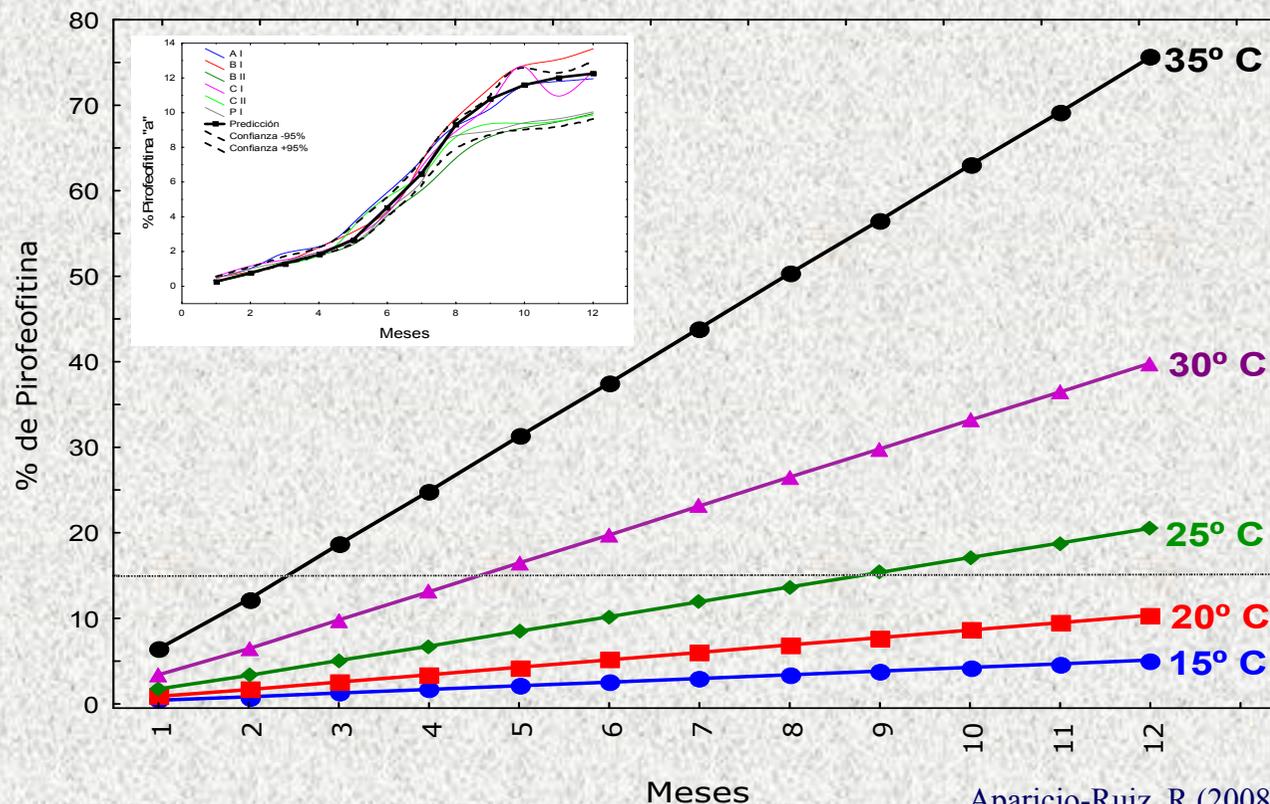
$$\% \text{ Pyropheophytin A} = \frac{\text{PPPA} \times 100}{\text{PPPA} + \text{PPA} + \text{PPA}'} \leq 17\%$$

Donde:

PPPA, Pyropheophytin A

PPA, Pheophytin A

PPA', Pheophytin A'



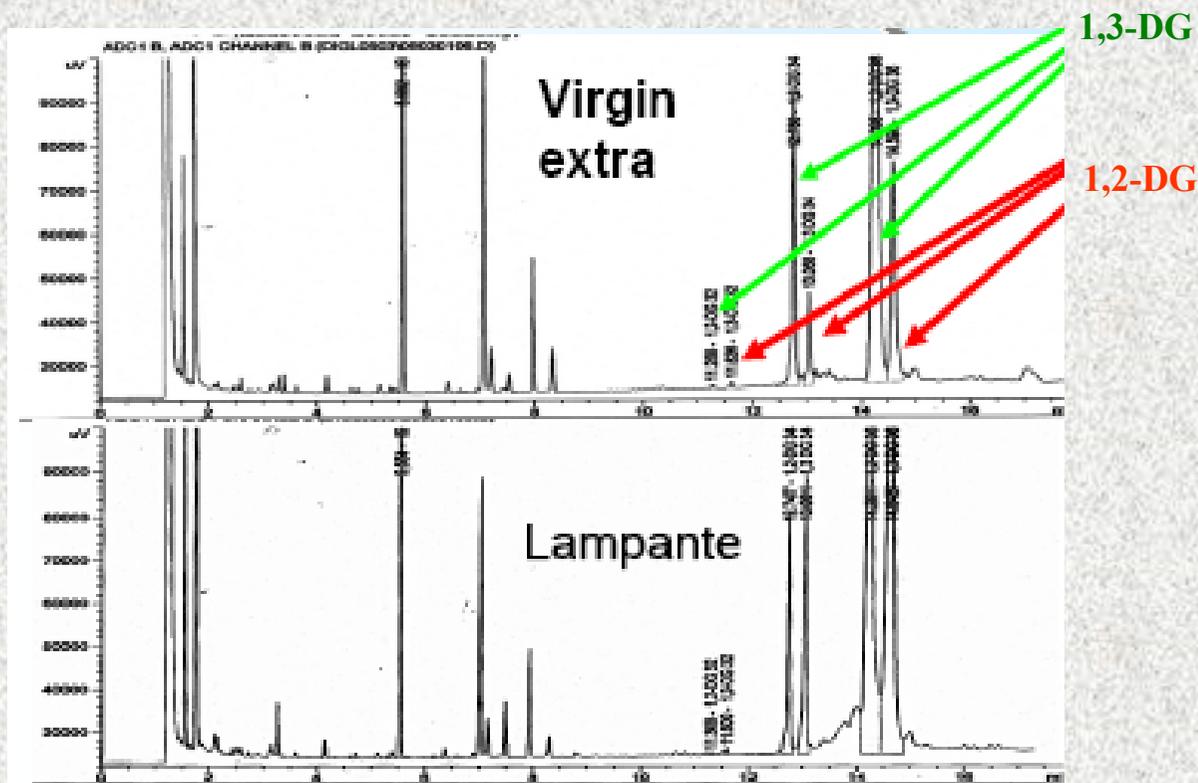
Aparicio-Ruiz, R (2008) PhD Dissertation Thesis (Sevilla Spain)

- **Ventaja:** Pirofeofitina A es un marcador de aceites calentados
- **Inconveniente:** Pirofeofitina A incrementa con el tiempo de vida también



Adición de aceite de oliva **desodorizado** a **AOVE**

Método: Razón isómeros 1,3-DG/1,2-DG mediante GC



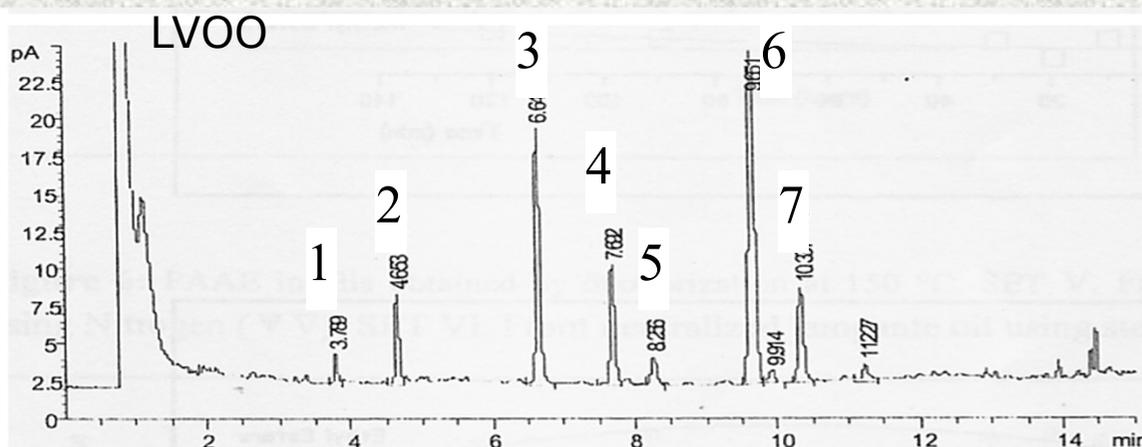
Razón 1,3-DG/1,2-DG
VOO con acidez:
0.3%-0.5% límite = 0.25
>0.5% no hay límite

- **Ventaja:** Informa sobre la frescura del AOV
- **Inconveniente:** Esta razón cambia con el tiempo de vida del aceite

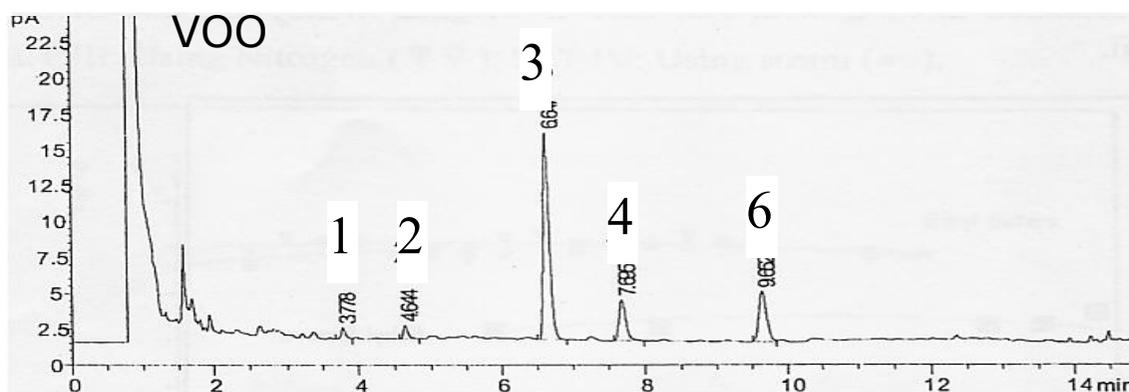


Adición de aceite de oliva **desodorizado** a **AOVE**

Método: Contenido de ésteres alquílicos (FAAE)



- 1: C16:0 ME
- 2: **C16:0 EE**
- 3: IS (C17:0 EE)
- 4: C18:1 ME
- 5: C18:2 ME
- 6: **C18:1 EE**
- 7: **C18:2 EE**



FAAE >35 ppm



Adición de aceite de oliva **desodorizado** a **AOVE**

Método: Contenido de ésteres alquílicos (FAAE)

OIL	FAAE (mg/kg)	FAEE/FAME	Waxes (mg/kg)	Panel test
1. C.V. (2005)	128	2.50	121	EV
2. C. H. (2006)	144	1.80	141	EV
3. C.M. (2005)	139	2.55	128	EV
4. Italia (2003)	136	1.38	448	EV
5. Arbequina (2005)	96	1.91	238	EV
6. Cornicabra (2005)	163	1.21	203	EV
7. 131/08	123	2.89	119	Virgin
8. 123/08-1	380	4.35	127	Lampant
9. 123/08-2	9	1.28	304	EV
10. 114/08	134	3.55	119	EV
11. 264/07-1	94	1.08	110	EV
12. 264/07-2	125	1.73	99	Lampant
13. 264/07-3	69	2.09	75	VE
14. 264/07-4 (trans isomers)	556	5.01	417	Virgin
15. 264/07-5	101	2.73	248	Virgin

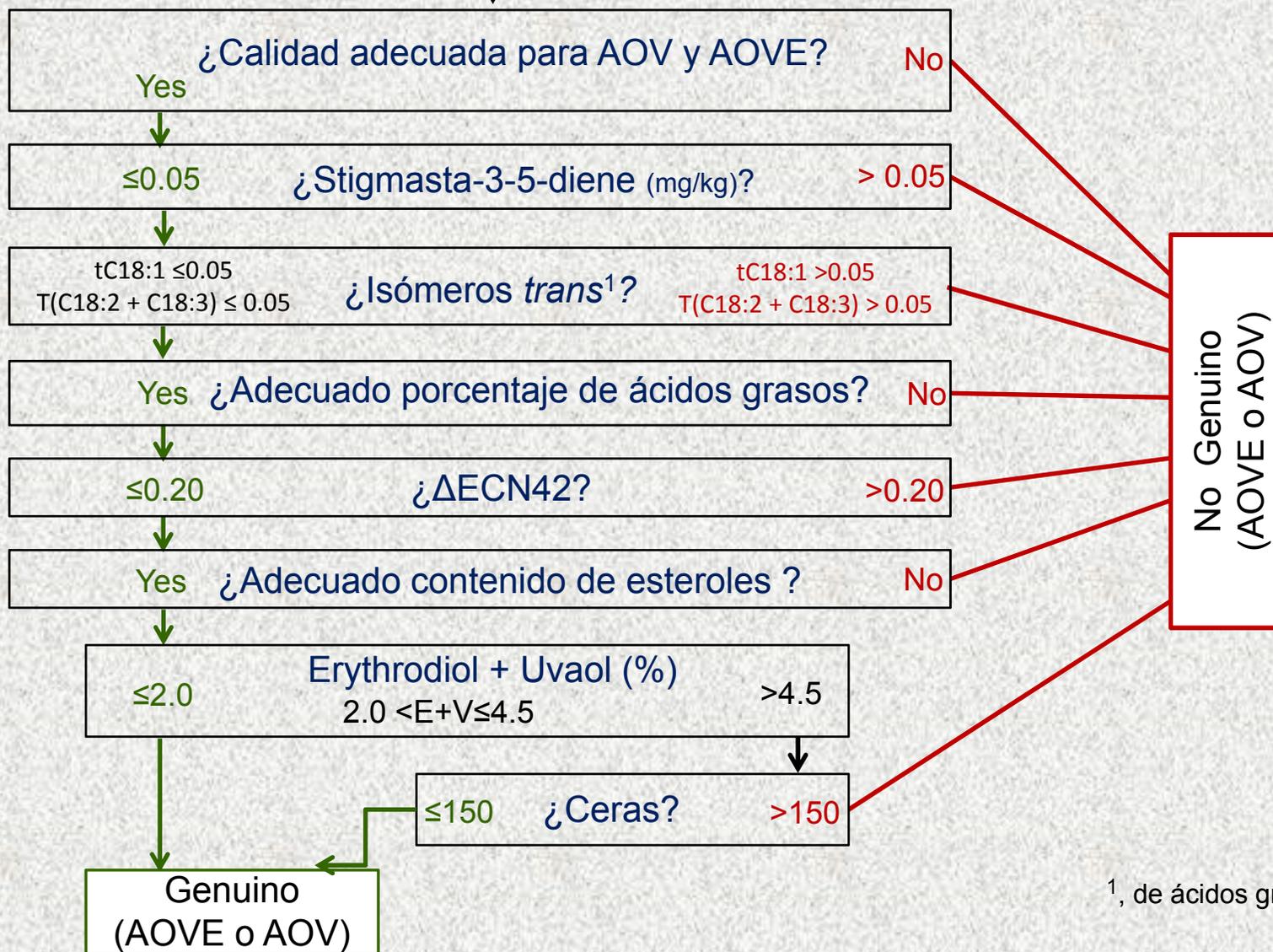
FAEE >35 ppm

Ventaja: Método fácil de implementar. Calidad tecnológica.

Inconveniente: Basado en una relación especulativa con la calidad
Los límites propuestos están basados en estudios parciales



Muestra desconocida



¹, de ácidos grasos



Adición de aceite de oliva **desodorizado** a **AOVE**



Grand National (UK)



Resumiendo

La identificación de un aceite adulterado entre cientos de miles de botellas de aceites que se venden cada día no es tarea fácil.

Teniendo que evitarse el calificar como adulterado un aceite genuino (Falso Positivo) o el calificar como genuino un aceite adulterado (Falso Negativo)



Conclusiones

- Los aspectos a autenticar en los aceites son cada vez más complicados. Las adulteraciones y sus posibles soluciones son cada vez más sofisticadas. La tendencia actual es la combinación de cromatografía y espectroscopía con la Quimiometría.
- El aceite de oliva virgen ha llegado a ser un alimento global. En consecuencia los límites legales de parámetros químicos deberían revisarse tras un estudio exhaustivo de aceites incluyendo los nuevos países productores y todas las variedades. Se necesitan bases de datos y usar procedimientos matemáticos.
- Los métodos basados en hechos casuales son el gran problema de hoy.
- La detección de aceites desodorizados, aceite de aguacate, y de avellana, están entre los mayores desafíos actuales.



Manuel León
Instituto de la Grasa (CSIC)
mleon@ig.csic.es