

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS NO DESTRUCTIVOS EN COMBINACIÓN CON QUIMIOMETRÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS: EL PIMENTÓN COMO ALIMENTO DE ESTUDIO

Olga Monago-Maraña<sup>1</sup>, Teresa Galeano-Díaz<sup>2</sup>, Arsenio Muñoz de la Peña<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research, Ås, Norway

<sup>2</sup>Departamento de Química Analítica, Universidad de Extremadura, Badajoz, España

Introducción

El pimentón es una especia de elevado consumo a nivel mundial. En España, su importancia deriva de la existencia de dos Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) como son la DOP "Pimentón de La Vera" y la DOP "Pimentón de Murcia". Específicamente, el pimentón de La Vera se obtiene en la Comarca de La Vera en el norte de Extremadura y se caracteriza por su sistema de secado al humo, el cual confiere un aroma y sabor característico.

Hoy en día, el uso de técnicas espectroscópicas no destructivas, en combinación con herramientas quimiométricas, en el campo del análisis de alimentos, está generando un elevado interés dado el beneficio que presenta este enfoque. Se trata del desarrollo de métodos analíticos más rápidos, económicos, no destructivos y no invasivos.

En la bibliografía se pueden encontrar varias revisiones recientes que dejan patente la importancia y el amplio uso de estos métodos en el estudio de la calidad de los alimentos, evaluación de su seguridad y su autenticidad, desde especias hasta productos cárnicos, pescado o frutas [1-4]. Además, estos métodos pueden emplearse con fines cuantitativos o cualitativos. Dentro del análisis cuantitativo pueden estar relacionados con la determinación de parámetros de calidad de los mismos, como pueden ser el color, la humedad, su contenido en proteínas o compuestos fenólicos, entre otros. Por su parte, en el campo de la seguridad alimentaria pueden ser útiles para determinar residuos que puedan ser perjudiciales para la salud humana. En cuanto al análisis cualitativo, su empleo se enfoca en la diferenciación de ciertos tratamientos, orígenes, o bien, para detectar diferentes tipos de fraude alimentarios.

Así, en este artículo se describen algunos métodos analíticos desarrollados por nuestro grupo de investigación dentro de esta línea de trabajo. Concretamente, en el caso del pimentón como alimento objeto de estudio, y empleando fluorescencia molecular, espectroscopía Raman y espectroscopía visible y de infrarrojo cercana (Vis-NIRS) como técnicas espectroscópicas no destructivas. Estas técnicas se han empleado con diferentes fines: cuantificación de parámetros de calidad y presencia de adulterantes, así como con el objetivo de clasificación y autenticación de pimentón.

Espectroscopía Raman

En lo que respecta a la espectroscopía Raman, nuestro grupo ha desarrollado un método para llevar a cabo la determinación de los grados ASTA (American Spices Trade Association) en muestras de pimentón [5]. Este parámetro de calidad permite determinar el grado de color extractable de una muestra y establece si un pimentón es de alta calidad o no, en función de su valor, siendo, por ejemplo, necesario un valor de al menos 90 grados ASTA para los pimentones pertenecientes a la DOP "Pimentón de La Vera".

Para llevar a cabo el desarrollo de este método se emplearon un total de 88 muestras (66 para calibración y 22 para validación) con variabilidad de grados ASTA, para lo cual tuvieron que utilizarse muestras almacenadas durante largo tiempo, con el fin de obtener muestras con un bajo valor de este parámetro. De todas ellas se obtuvieron tres espectros Raman utilizando un láser de excitación de 785 nm. Posteriormente, se llevó a cabo el tratamiento matemático de los espectros para corregir la línea base. Con ello, se consiguió obtener unos espectros con bandas más definidas y reproducibles, tal como se puede observar en la Figura 1.

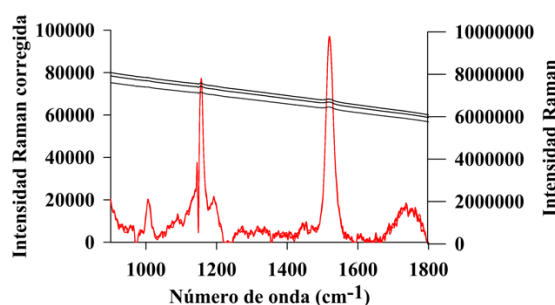


Figura 1. Espectros Raman de una muestra de pimentón antes (en negro) y después (en rojo) de la corrección de la línea base.

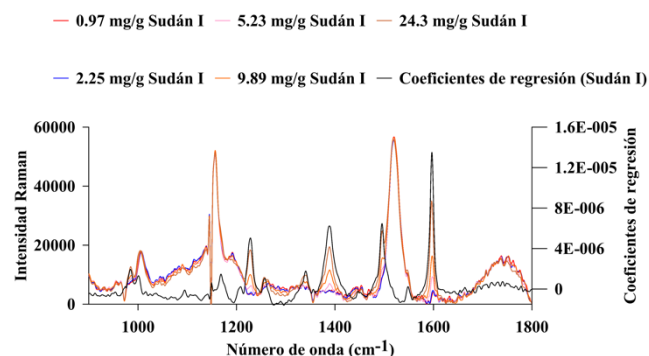
A continuación, empleando mínimos cuadrados parciales (PLS) se obtuvo un modelo de calibración de un solo componente que permitió cuantificar el valor de grados ASTA con un coeficiente de determinación de 0.943 para la calibración y de 0.954 para la validación. Por su parte, los errores de predicción fueron en ambos casos inferiores a 10 grados ASTA, por lo que puede decirse que el modelo de calibración ofreció unos buenos resultados para poder ser utilizado de forma on-line con fines industriales.

Cabe decir también, que los coeficientes de regresión obtenidos para el modelo mostraron que las variables que más afectaban al mismo eran aquellas que se correspondían con las bandas de los principales carotenoides presentes en pimentón:  $\beta$ -caroteno y capsantina.

Por otro lado, dado que uno de los problemas del color es que los compuestos responsables del mismo se pueden degradar durante el procesado y el tiempo de almacenamiento, podría caerse en la tentación de añadir colorantes ilegales que son más estables y dan una falsa apariencia de frescor a las muestras.

Utilizando el mismo procedimiento para la obtención y el tratamiento de espectros se emplearon 25 muestras adulteradas con Sudán I, un colorante ilegal, el cual ha sido añadido en ocasiones dado su bajo coste y su amplia disponibilidad. El rango de adulteración estudiado fue 0 - 25 mg/g.

En la Figura 2 se pueden observar los espectros obtenidos para una muestra adulterada a diferentes niveles de Sudán I.



**Figura 2.** Espectros Raman obtenidos para diferentes niveles de adulteración de Sudán I y coeficientes de regresión del modelo (eje derecho).

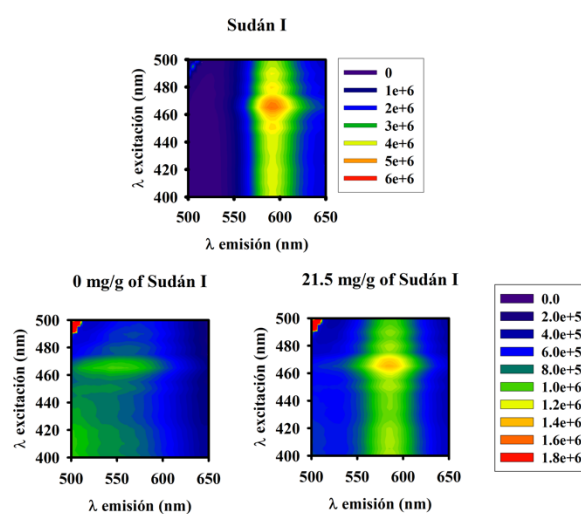
En este caso también fue posible obtener un modelo de calibración adecuado empleando PLS, siendo el coeficiente de determinación para las muestras de validación de 0.986 y el error de predicción de 1 mg/g. En la Figura 2 se puede observar el coeficiente de regresión obtenido para el modelo, cuyas variables se identificaron claramente con aquellas encontradas en la bibliografía para este compuesto, siendo las más características 1228, 1386, 1496 y 1598  $\text{cm}^{-1}$ .

Adicionalmente, empleando técnicas clasificatorias de análisis supervisado, como es el análisis discriminante mediante mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), fue posible clasificar las muestras adulteradas con un porcentaje de acierto superior al 89%. Las muestras erróneamente clasificadas fueron aquellas con un nivel de adulteración más bajo, siendo la capacidad de detección establecida de 5 mg/g.

### Fluorescencia molecular

En el caso de la fluorescencia molecular, el objetivo del método desarrollado fue la determinación de Sudán I en muestras de pimentón, como en el caso anteriormente descrito mediante espectroscopía Raman [6].

El Sudán I es un compuesto que presenta propiedades fluorescentes, sin embargo, hasta el momento no se había determinado de forma no-destructiva en ninguna matriz y tampoco se había empleado la fluorescencia de forma no-destructiva en muestras de pimentón. En la Figura 3 se pueden observar las matrices de excitación-emisión obtenidas para el patrón de Sudán I y dos muestras de pimentón, una adulterada y otra sin adulterar, todas ellas obtenidas directamente desde sólidos.



**Figura 3.** Matriz de excitación - emisión (EEM) para el patrón de Sudán I obtenida directamente desde el sólido (arriba) y dos muestras de pimentón, una adulterada (abajo a la derecha) y otra sin adulterar (abajo a la izquierda).

En este caso, uno de los retos a abordar fue la presencia de efecto de filtro interno por parte de los carotenoides presentes en pimentón, así como del propio Sudán I, ya que todos absorben en torno a 460 nm. Se observó que aquellas muestras más coloreadas presentaban una menor señal de fluorescencia (debido al mayor efecto de filtro interno por parte de los pigmentos) y, por tanto, esta señal interfería en menor medida a la señal de Sudán I. Por tanto, para resolver este problema y la falta de linealidad que esto producía en los datos, se diseñó una calibración, en la que uno de los factores a tener en cuenta fue la variación de los grados ASTA. Empleando un diseño experimental central compuesto, se variaron los grados ASTA entre 25 y 150 y la concentración de Sudán I entre 0.25 y 25 mg/g, resultando un total de 9 muestras para la calibración, a las que se añadieron 5 muestras de pimentón sin adulterar. Adicionalmente, se emplearon 9 muestras de validación con valores en el mismo rango empleado para la calibración.

A la hora de obtener un modelo de calibración se emplearon diferentes algoritmos. Por un lado, se extrajeron los espectros de emisión obtenidos a una longitud de onda de excitación de 465 nm y se empleó PLS y, por otro lado, se emplearon las EEMs completas y se utilizaron los algoritmos de mínimos cuadrados parciales desdoblados (U-PLS) y mínimos cuadrados parciales multi-vía (N-PLS). De los resultados derivados de estas estrategias se pudo observar que, a la hora de obtener buenos modelos de calibración, todos los algoritmos ofrecieron similares resultados. Sin embargo, a la hora de predecir las muestras de validación como muestras desconocidas, los errores obtenidos en el caso de PLS fueron más altos que en el caso de U-PLS y N-PLS que ofrecieron resultados similares, tal como se puede observar en la Tabla 1, demostrando así la utilidad de estos últimos para modelar la falta de linealidad en los datos.

**Tabla 1.** Resultados obtenidos para los diferentes modelos de calibración ensayados y la predicción de las muestras de validación.

Calibración				
Algoritmo	Comp.	R <sup>2</sup>	RMSEC (mg/g)	REP (%)
PLS	2	0.965	1.7	40
U-PLS	5	0.981	1.4	16
N-PLS	5	0.986	1.4	17
Validación				
PLS	2	0.798	5.1	45
U-PLS	5	0.885	3.0	26
N-PLS	5	0.847	2.5	25

Para los algoritmos que ofrecieron mejores resultados, se calcularon también los límites de detección (LODs), obteniéndose unos rangos de 0.4 – 3 mg/g y 0.5 – 3 mg/g para U-PLS y N-PLS, respectivamente.

Con estos resultados, se pudo demostrar, que a través de fluorescencia no-destruktiva, es posible determinar la concentración de Sudán I en muestras de pimentón. Además, se mostró también como, incluyendo la variabilidad de los grados ASTA en la calibración, fue posible modelar el efecto de filtro interno existente. Se trata de un método rápido y no destructivo, pudiéndose considerar una alternativa a otros. Sin embargo, sería necesaria la inclusión de más muestras, a la vez que sería interesante explorar la posibilidad de incluir mezclas de diferentes colorantes ilegales al mismo tiempo.

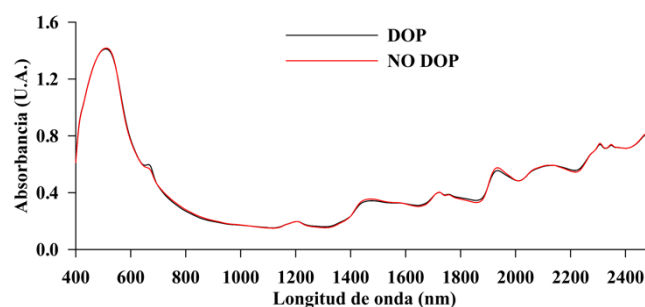
Aunque la obtención de las matrices de EEMs puede requerir un tiempo de análisis mayor que en el caso de la obtención de un espectro Raman, puede destacarse que con este método se obtuvo un límite de detección inferior que en el caso de la espectroscopía Raman, por lo que podría ser útil en casos en los que los niveles de adulteración sean inferiores. Por otro lado, la instrumentación requerida es más barata que en el caso anterior, lo cual también puede considerarse una ventaja para emplear la fluorescencia como alternativa.

### Espectroscopia visible y de infrarrojo cercano (Vis-NIRS)

Este estudio se encuentra actualmente en desarrollo y sus datos se han enviado recientemente para su publicación. Se ha centrado en el desarrollo de un método que permite la diferenciación de pimentón perteneciente a la DOP “Pimentón de La Vera” con respecto a otros pimentones que no pertenecen a dicha denominación [7].

Para ello, se han empleado un total de 99 muestras de pimentón, de las cuales 49 pertenecían a la DOP y 50 no pertenecían a la misma. Es importante destacar que las muestras pertenecientes a la DOP presentaban una gran variabilidad, comprendiendo muestras de tres tipos de pimentón, dulce, agridulce y picante; producidas por diferentes productores y almacenadas entre 2010 – 2020. Por su parte, las muestras no pertenecientes a la DOP fueron adquiridas en el mercado en 2017 y 2020, aunque su producción puede haberse producido hasta dos años antes. Como se describió anteriormente, el proceso de obtención de las muestras pertenecientes a la DOP, así como las variedades empleadas para tal fin, están perfectamente establecidas. Sin embargo, del resto de muestras no se conocían dichas características.

Para explorar las posibilidades que la espectroscopía Vis-NIR ofrecía a la hora de diferenciar ambos grupos de muestras, se obtuvieron los espectros de las mismas en triplicado en un rango de longitud de onda entre 400 – 2500 nm. En la Figura 4 se puede observar la media de los espectros correspondientes a ambos grupos después de que los espectros fueran pre-procesados mediante EMSC (Extended multiplicative signal correction).

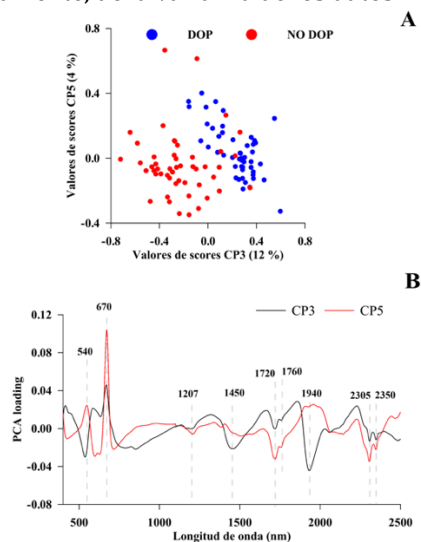


**Figura 4.** Espectro de absorción medio de ambos grupos pre-procesados mediante EMSC.

Se pudieron observar pequeñas diferencias entre ambos grupos entre 600 – 800 nm, 1200 – 1600 nm, 1700 – 2000 nm y 2200 – 2400 nm. Estas zonas están principalmente relacionadas con compuestos coloreados, el agua y la grasa presentes en las muestras.

Para llevar a cabo la diferenciación de las muestras se siguieron varias estrategias empleando técnicas supervisadas y no supervisadas. También, el análisis de los datos se llevó a cabo en tres regiones, la visible (400 – 800 nm), la región de infrarrojo cercano (800 – 2500 nm) y ambas (400 – 2500 nm). En primer lugar, se llevó

a cabo un análisis de componentes principales (PCA) considerando todas las muestras, observándose un claro agrupamiento de ellas en dos grupos en todos los rangos estudiados. Como ejemplo, en la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos para el rango completo. En este caso, las muestras mostraron el mejor agrupamiento para los componentes 3 y 5, que explicaban el 12 y 4 %, respectivamente, de la varianza de los datos.



**Figura 5.** Valores de scores (A) y loadings (B) obtenidos mediante PCA en el rango 400 – 2500 nm.

En cuanto a las técnicas de análisis supervisado, se emplearon diferentes algoritmos para obtener los modelos clasificatorios. Estos algoritmos fueron: PLS-DA, PCA- análisis lineal discriminante (LDA) y PCA – análisis cuadrático discriminante (QDA).

Todos los análisis se llevaron a cabo en las tres regiones descritas anteriormente y cabe destacar que los mejores resultados se obtuvieron en la región de infrarrojo cercano y cuando se empleó el algoritmo PLS-DA. En este caso, solo un 7% de las muestras estuvieron mal clasificadas dentro de las muestras de calibración ( $n = 59$ ) y un 5% de las muestras de validación ( $n = 40$ ), siendo el porcentaje de falsos positivos inferior al 5% en ambos casos. Algunas de las variables más influyentes en dicha clasificación fueron 1725, 2305, 2350 y 2490 nm y pueden ser asignadas a las grasas presentes en estas muestras, las cuales podrían ser diferentes en ambos grupos por diversas razones: la variedad de pimiento empleado, la adición de semillas, que no está permitido en el caso de la DOP, o bien, la adición de algún tipo de aceite vegetal, lo cual tampoco está permitido por la DOP.

Estos resultados ponen de manifiesto la posibilidad de poder diferenciar mediante este método las muestras pertenecientes a la DOP o no, con errores inferiores al 10%.

### Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estos métodos se deja patente la aplicabilidad que los mismos

podrían tener en la industria pimentonera a la hora de determinar los grados ASTA, parámetro de calidad de rutina determinado en las muestras, de detectar adulteraciones con colorantes ilegales o de demostrar la autenticidad de muestras pertenecientes a la DOP “Pimentón de La Vera”. Todos ellos a su vez tienen en común que no sería necesario ningún tipo de extracción, por lo que no se destruye la muestra, siendo así también respetuosos con el medio ambiente, ya que no se requiere del uso de disolventes. Además, podrían realizarse en la línea de producción, con lo que ahorraría mucho tiempo y una rápida detección en el caso de fraudes o muestras adulteradas y anómalas.

### Agradecimientos

Los autores agradecen financiación por parte de la Junta de Extremadura (Ayuda GR18041 - Grupo de Investigación ANAYCO – FQM003) y del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Proyecto CTQ2017-82496-P). Olga Monago Maraña agradece a la Fundación Ramón Areces por una beca postdoctoral para realizar estudios postdoctorales en el extranjero (XXXI convocatoria correspondiente al curso 2019/2020 del área de Ciencias de la Vida y la Materia).

### 5. Referencias

- [1] A. Hassoun, A. Sahar, L. Lakhal, A. Ait-Kaddour, Fluorescence spectroscopy as a rapid and non-destructive method for monitoring quality and authenticity of fish and meat products: Impact of different preservation conditions, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2019, 103, 279 – 292.
- [2] S. Li, H. Luo, M. Hu, M. Zhang, J. Feng, Y. Liu, Q. Dong, B. Liu, Optical non-destructive techniques for small berry fruits: A review, *Artif Intell J.*, 2019, 2, 85- 98.
- [3] K. Kucharska-Ambrozej, J. Karpinska, The application of spectroscopic techniques in combination with chemometrics for detection adulteration of some herbs and spices, *Microchem. J.*, 2020, 153, 104278.
- [4] X. Lin, D-W. Sun, Recent developments in vibrational spectroscopic techniques for tea quality and safety analysis, *Trends Food Sci. Technol.*, 2020, In Press.
- [5] O. Monago-Maraña, C. E. Eskildsen, N. K. Afseth, T. Galeano-Díaz, A. Muñoz de la Peña, J.P. Wold, Non-destructive Raman spectroscopy as a tool for measuring ASTA color values and Sudan I content in paprika samples, *Food Chem.*, 2019, 274, 187 – 193.
- [6] O. Monago-Maraña, C. E. Eskildsen, A. Muñoz de la Peña, T. Galeano-Díaz, J.P. Wold, Non-destructive fluorescence spectroscopy combined with second-order calibration as a new strategy for the analysis of illegal Sudan I dye in paprika powder, *Microchem. J.*, 2020, 154, 104539.
- [7] O. Monago-Maraña, C. E. Eskildsen, A. Muñoz de la Peña, T. Galeano-Díaz, J.P. Wold, Untargeted classification for paprika powder authentication using visible-near infrared spectroscopy, *Food Control*, 2020, In Press.