

UNA VISIÓN MULTIVARIABLE PARA APLICAR EN LA MEJORA DE LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y AUTENTICIDAD ALIMENTARIA

ANA MARÍA JIMÉNEZ CARVELO

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada (España)

Desde las primeras etapas de mi carrera investigadora, siempre me ha motivado la firme voluntad de garantizar la calidad y la autenticidad de los alimentos, salvaguardando así la salud de humanos, animales y plantas, y evitando el fraude al consumidor. Dentro de este amplio campo de investigación, me ha interesado especialmente el desarrollo de métodos analíticos enfocados en el control de los alimentos mediante la aplicación de nuevas metodologías innovadoras.

La realización del trabajo fin de máster (TFM), en el marco del Máster en Avances en Calidad y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada (UGR) en 2014, así como la obtención de una beca de la UGR orientada a la investigación llevada a cabo en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias fueron el estímulo que me impulsó a iniciar mis estudios de doctorado en temas relacionados con la calidad y autenticidad alimentaria, siendo en la actualidad mi línea de investigación.

'Autenticar/asegurar un alimento' implica generalmente comprobar lo que se declara en su etiqueta, verificar la propia naturaleza del mismo (por ejemplo, la especie o variedad de la que procede), su procedencia geográfica, así como la ausencia de adulteraciones de cualquier tipo. Hasta la fecha la vía analítica convencional de autenticación alimentaria se ha centrado en la cualificación y/o cuantificación de componentes específicos, que generan datos multiparamétricos y/o composicionales de fracciones específicas obtenidos a partir de numerosos análisis químicos, es decir, que para verificar que un alimento no ha sido adulterado o que cumple la legislación vigente se deben realizar múltiples medidas aplicando diversas técnicas y plataformas analíticas.

Dado que hasta el alimento más sencillo es una compleja matriz multicomposicional, la forma de asegurar su calidad/autenticidad debería llevarse a cabo aplicando un enfoque multivariable. De hecho este enfoque es aplicado en nuestro día a día por nuestro cerebro, sin embargo curiosamente pasa casi inadvertido. Por ejemplo a la hora de considerar la belleza de un monumento o en una persona no existen 'unos marcadores' que nos indiquen que cumpliendo ciertas características podemos decir que el monumento o la persona poseen más o menos belleza, sino que es el 'análisis' de su conjunto y la 'armonía' de características (enfoque multivariable) lo que nuestro cerebro analiza y posteriormente nos proporciona 'un resultado': bello o no bello (enfoque univariable).

En el ámbito de la química analítica la aplicación de dicho enfoque implica modificar los esquemas convencionales

de los métodos analíticos, donde prevalecen la identificación y cuantificación de compuestos químicos (marcadores), y sustituirlos por nuevos métodos analíticos basados en la aplicación de métodos 'no selectivos' capaces de analizar el producto y producir una huella instrumental inespecífica pero característica de cada tipo de alimento, que incorpora la información sobre la calidad y la autenticidad del mismo. Ésta metodología aplica el mismo fundamento de identificación de personas por medio de la huella dactilar, brevemente consiste en considerar en todo su conjunto el perfil de la señal instrumental inespecífica registrada por un instrumento analítico sin necesidad de identificar ni cuantificar ningún compuesto, ya que cada señal refleja de forma implícita la composición química del alimento. Para una mejor aplicación de las huellas instrumentales se recurre a las técnicas de minería de datos (en el contexto analítico, quimiometría). Estas técnicas aportan las herramientas necesarias para extraer la información de interés de un gran conjunto de datos, aunque ésta no aparezca de forma evidente o explícita [1,2,3].

En esta línea, durante la realización de mi tesis doctoral, se pudo verificar la pureza del aceite de oliva llevando a cabo un único análisis aplicando el enfoque multivariable. La legislación actual sobre a los métodos de análisis de aceite de oliva relativos a la pureza del mismo, recoge que para verificar que un aceite virgen de oliva no está mezclado (adulterado) con otros aceites vegetales se deben determinar: el contenido de ácidos grasos (englobándose dentro de éste la determinación de 6 ácidos grasos), el contenido en estigmastadienos, el valor ECN42, el contenido en ceras, en eritrodioleína, en ácido linoleico, la proporción del 2 glicerol monopalmitato y la composición total en esteroides que al igual que en el caso de los ácidos grasos, engloba la determinación de 6 esteroides. En total más de 20 parámetros para verificar la NO adulteración del aceite de oliva. En este sentido se pudo verificar la pureza del aceite de oliva obteniendo la huella instrumental cromatográfica de la fracción transesterificada, la cual es única para cada aceite vegetal, permitiendo diferenciarlo de forma inequívoca, sin la necesidad de recurrir a la identificación y cuantificación de compuestos [4]. Tras comprobar durante la tesis que el enfoque multivariable permite evaluar la calidad/autenticidad del aceite de oliva en un único análisis, así como reducir drásticamente el uso de disolventes, reactivos químicos y tiempos de análisis, en la etapa postdoctoral se decidió seguir investigando para la implementación de los métodos analíticos multivariable en análisis de rutina como métodos de vanguardia y su aplicación en otras

matrices alimentarias como tequila, queso, margarinas y vainilla.

En este contexto se establecieron por primera vez dos índices de aplicabilidad para los métodos analíticos cualitativos de cribado basados en un enfoque multivariable denominados 'índice de ahorro' (1) e 'índice de error' (2), a través de los cuales se establecen los requisitos mínimos (precisión y sensibilidad) que debe cumplir el método analítico para ser apto para su uso, los cuales fueron nuevamente aplicados para llevar a cabo la evaluación de la autenticidad de aceites de oliva [5,6].

$$I_{\text{AHORRO}} (\%) = \frac{\text{Assig T}}{\text{TOTAL}} \times 100 \quad (1)$$

Donde "Assig T" es el número total de muestras asignadas como pertenecientes a la clase objetivo (la clase que recoge los objetos conformes (muestras)) y "TOTAL" es el número de muestras analizadas.

$$I_{\text{ERROR}} (\%) = \frac{e_{nT}}{\text{TOTAL}} \times 100 \quad (2)$$

Donde "enT" es el número de muestras asignadas erróneamente a la clase objetivo.

De forma que la aplicación analítica real del método implica el establecimiento previo de los requisitos de validación para evaluar si el método se ajusta a su finalidad. En este sentido es necesario decidir: (i) el índice de ahorro, que significa la tasa de muestras que no serán analizadas por el método de retaguardia considerando una asignación fiable, y (ii) el índice de error de asignación, es decir, el riesgo que se está dispuesto a asumir de presencia de alimentos adulterados o no conformes en el mercado. Así, se requiere estimar qué valores de precisión (3) y sensibilidad (4) serán coherentes con los índices de aplicabilidad decididos, pero además teniendo en cuenta un parámetro nunca antes considerado en el análisis cualitativo: 'la ocurrencia' (OCURR). La ocurrencia es un parámetro poblacional que representa la tasa de muestras que presentan una propiedad de interés con respecto a la población de muestras que se someten a análisis en el laboratorio. De esta forma el desarrollo del método analítico multivariable de cribado se establece acorde al propósito final previsto.

$$\text{Precisión} = 1 - \frac{I_{\text{ERROR}}}{I_{\text{AHORRO}}} \quad (3)$$

$$\text{Sensibilidad} = (I_{\text{AHORRO}} - I_{\text{ERROR}}) \times \frac{1}{\text{OCURR}} \quad (4)$$

Después de establecer cuál sería el procedimiento de desarrollo de este tipo de métodos nos encontramos con otro hándicap que tienen los métodos analíticos desarrollados desde un enfoque multivariable y es ¿cómo llevar a cabo la transferencia de los mismos a diferentes laboratorios? Y ¿cómo se podría aplicar un método multivariable ya desarrollado a nuevas muestras analizadas? En otras palabras, los métodos propuestos hasta la fecha se basan en las huellas instrumentales adquiridas por un solo instrumento analítico generando uno de los principales problemas para su expansión,

siendo especialmente crítico en los sistemas cromatográficos. Recordemos que en los esquemas convencionales (enfoque univariable) de la cromatografía, el cromatograma se transforma en áreas de pico, lo que supone una normalización de la señal, y el alineamiento o la estandarización de los tiempos de retención entre métodos cromatográficos se ha basado en usar los tiempos de retención relativos con el único fin de identificación de compuestos. Sin embargo, en el enfoque multivariable la perspectiva de aplicación del método es complemente distinta y por tanto supone que la transferencia de estos modelos para ser aplicados sobre muestras analizadas por un instrumento similar, pero en otro estado de mantenimiento o de un fabricante diferente, no es posible, incluso con el mismo equipo instrumental en el mismo laboratorio, ya que pasado un tiempo entre las medidas, la experiencia nos ha enseñado que no tiene éxito.

Tras comprobar el potencial del tándem formado por la quimiometría y la cromatografía para el desarrollo de métodos analíticos multivariables, dirigí mi investigación hacia la estandarización de las señales cromatográficas para que los métodos analíticos multivariables pudieran ser transferidos a la industria y a los laboratorios de rutina. Para ello, se propuso una innovadora metodología de 'agnostización' a partir de la cual se pueden obtener señales cromatográficas estandarizadas (denominadas señales 'agnostizadas', es decir, independientes del instrumento) con el fin de obtener huellas comparables independientemente del tiempo, del estado de la columna e incluso del equipo convencional de LC y GC utilizado. Esta metodología se basa en realizar en una primera etapa el establecimiento de un conjunto de valores constantes independientes del sistema ('Standard Retention Scores', SRS) obtenido a partir del análisis de estándares externos, a continuación, se realiza la etapa de agnostización en la que se estandarizan tanto las intensidades como los tiempos de retención de la señal utilizando los SRS previamente establecidos [7,8].

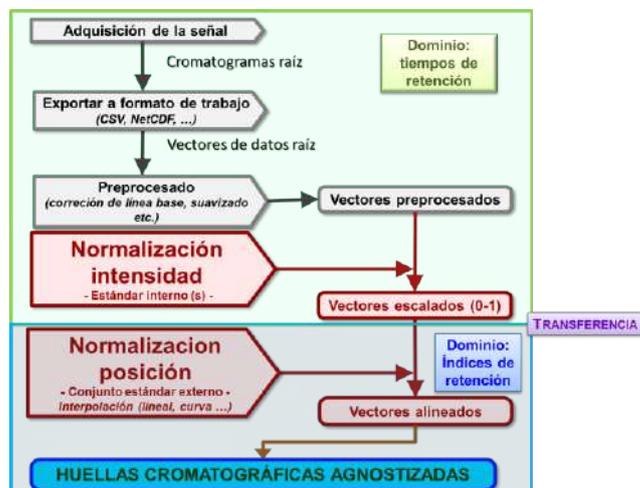


Fig. 1. Proceso de agnostización de señales cromatográficas [7]

Con objeto de comprobar que la metodología de agnostización de señales propuesta arrojaba resultados

similares a la tradicional metodología de alineamiento de señales cromatográficas se llevó a cabo un estudio comparativo entre ambas metodologías. Dicha investigación se centró en el desarrollo de dos modelos multivariados para la detección de mezclas de aceite de oliva con aceite de orujo de oliva. Uno de ellos generado a partir de huellas instrumentales procesadas con el algoritmo 'icoshift' [9] y otro a partir de huellas instrumentales agnostizadas dando lugar a un 'modelo multivariable agnostizado', aplicando como técnica analítica la cromatografía de líquidos acoplada a un detector ultravioleta-visible en su modalidad de fase normal [10]. De este estudio se concluyó que la metodología de agnostización de señales cromatográficas daba lugar a los mismos buenos resultados pero con la ventaja de que ahora cualquier método multivariable sí se podría transferir a un laboratorio de análisis de rutina, pero además siembra las semillas para poder establecer una base de datos de huellas cromatográficas de alimentos y cuya investigación se está llevando a cabo en la actualidad sobre otras modalidades de cromatografía de líquidos y de gases.

Por último quisiera resaltar que gracias a todos los estudios realizados en esta dirección, tengo la oportunidad de participar en un acción COST Europea (SensorFINT; ref: CA19145) cuyo objetivo es desarrollar soluciones a problemas existentes y emergentes para el control no invasivo en la industria alimentaria desarrollando un "sistema inteligente de control de alimentos" aplicando métodos analíticos no destructivos y herramientas quimiométricas. Y además he podido establecer colaboraciones internacionales con el objetivo de aplicar el enfoque multivariable con señales obtenidas por diferentes plataformas analíticas para la evaluación de calidad y autenticidad de diferentes alimentos.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA) por la concesión de este premio, el cual supone un aliciente para seguir en el camino de la investigación que tanto me apasiona, y a los miembros del grupo de investigación de Análisis en Alimentación y Medio Ambiente (AnAMA) de la Universidad de Granada por su apoyo durante todos estos años, donde he realizado y realizo en la actualidad mis actividades docentes e investigadoras.

Referencias

- [1] Cuadros Rodríguez, L.; Ruiz Samblás, C.; Valverde Som, L.; Pérez Castaño, E.; González Casado, A. Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food 'identification' and food authentication - A tutorial. *Anal. Chim. Acta.*, 2016, 909, 9-23.
- [2] Jiménez Carvelo, A.M.; González Casado, A.; Bagur González, M.G.; Cuadros Rodríguez, L. Alternative data mining/machine learning methods for the analytical evaluation of food quality and authenticity - A review. *Food Res. Int.*, 2019, 122, 25-39.
- [3] El Orche, A.; Elhamdaoui, E.; Cheikh, A.; Zoukeni, B.; El Karbane, M.; Mbarki, M.; Bouatia, M. Comparative study of three fingerprint analytical approaches based on spectroscopic sensors and chemometrics for the detection and quantification of argan oil adulteration. *J. Sci. Food Agric.*, 2021, 102, 95-104.
- [4] Jiménez Carvelo, A.M.; Pérez Castaño, E.; González Casado A.; Cuadros Rodríguez, L. One-input and two-input-class classifications for differentiating olive oil from other edible vegetable oils by use of the normal-phase liquid chromatography fingerprint of the methyl-transesterified fraction. *Food Chem.*, 2017, 221:1784-1791.
- [5] Cuadros Rodríguez, L.; Valverde Som, L.; Jiménez Carvelo, A.M.; Delgado-Aguilar, M. Validation requirements of screening analytical methods based on scenario-specified applicability indicators. *TrAC*, 2020, 122:115705.
- [6] Jiménez Carvelo, A.M.; Cuadros Rodríguez, L. The occurrence: a meaningful parameter to be considered in the validation of multivariate classification-based screening methods - Application for authenticating virgin olive oil. *Talanta*, 2020, 208:120467.
- [7] Cuadros Rodríguez, L.; Ortega Gavilán, F.; Martín-Torres, S.; Medina Rodríguez, S.; Jiménez Carvelo, A.M.; González-Casado, A.; Bagur-González, M.G. Standardization of instrumental fingerprints - Standardization of chromatographic signals - Part I: Towards obtaining instrument-agnostic fingerprints in gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2021, 1641: 461983.
- [8] Cuadros Rodríguez, L.; Martín Torres, S.; Ortega Gavilán, F.; Jiménez Carvelo, A.M.; López-Ruiz, R.; Garrido-Frenich, A.; Bagur-González, M.G.; González-Casado, A. Standardization of instrumental fingerprints - Standardization of chromatographic signals - Part II: Expanding instrument-agnostic fingerprints to reverse phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2021, 1641: 461973.
- [9] Tomasi, G.; Savorani, F.; Engelsen, S.B. Icoshift: An effective tool for the alignment of chromatographic data. *J. Chromatogr. A*, 2011, 1248(43): 7832-7840.
- [10] Pérez-Beltrán, C.H.; Jiménez Carvelo, A.M.; Martín Torres, S.; Ortega Gavilán, F.; L. Cuadros Rodríguez. Instrument-agnostic multivariate models from normal phase liquid chromatographic fingerprinting. A case study: authentication of olive oil. *Food Control*, 2022, 137: 108957.