

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



UNIVERSIDAD DE BURGOS

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE CROCINAS EN
AZAFRÁN. ESTUDIO DE LA ADULTERACIÓN DE AZAFRÁN
CON COLORANTES ARTIFICIALES MEDIANTE TÉCNICAS
MULTIVARIANTES DE ANÁLISIS.**

Tutoras: Ana Herrero Gutiérrez y Celia Reguera Alonso

MÓNICA GOICOECHEA VICARIO

Junio 2017

ÍNDICE

1. ABSTRACT Y RESUMEN	1
2. OBJETIVOS	2
3. INTRODUCCIÓN	2
4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	6
4.1 Diseño de superficie de respuesta central compuesto	6
4.2 Análisis de componentes principales	7
4.3 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)	8
5. EXPERIMENTAL	9
5.1 Materiales, reactivos e instrumentación	9
5.2 Software.....	10
5.3 Procedimiento experimental.....	10
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
6.1 Influencia del pH en el color del extracto acuoso de azafrán.....	13
6.2 Optimización de las condiciones de extracción	14
6.3 Estudio de adulteración.....	17
7. CONCLUSIONS	23
8. BIBLIOGRAFÍA	24

1. ABSTRACT Y RESUMEN

ABSTRACT

Saffron is an spice which main compounds are picrocrocines, safranal, crocetines and crocins, being the last ones responsible of its characteristic color. Nowadays it is one of the most expensive spices and because of that it is a food susceptible of being adulterated. In this study, different chemometric tools have been used in order to optimize saffron extraction and to detect possible adulterations in different samples which all contain saffron.

First step of this study focused on pH influence on the spectrum of saffron aqueous extracts. From the results of this previous step, there were optimized the conditions of extraction process, it is said, extractant volume, time and temperature of extraction, through a central composite response surface design.

After that, using principal component and least squares regression techniques, there was approached the adulteration of different aqueous saffron extracts with small quantities of food colour E-102, E-110, E-122 and E-124. In addition, extracts of saffron threads, of a seasoning and of a paella powder (spice blend). Principal component analysis enabled one to determine differences between adulterated and non-adulterated samples, whereas partial least squares regression was only useful to detect the adulteration with E-122.

RESUMEN

El azafrán es una especia compuesta por picrocrocinas, safranal, crocetinas y crocinas, siendo éstas últimas las responsables de su color característico. Es una de las especias más caras existentes en el mercado y por ello muy susceptible a la adulteración. En este trabajo se han utilizado diferentes herramientas quimiométricas para optimizar la extracción del color del azafrán y estudiar posibles adulteraciones con colorantes artificiales.

Una primera etapa se centró en el estudio de la influencia del pH en el espectro de absorción molecular de extractos acuosos de azafrán. A partir de este estudio se llevó a cabo la optimización de las condiciones de extracción teniendo en cuenta volumen de extractante, tiempo y temperatura de extracción, mediante un diseño de superficie de respuesta central compuesto.

Posteriormente, mediante las técnicas de componentes principales y regresión por mínimos cuadrados parciales se abordó la detección de la adulteración de distintos extractos acuosos de azafrán con pequeñas cantidades de los colorantes E-102, E-110, E-122 y E-124. Además, se estudiaron también extractos de azafrán en hebras, de un sazónador y de un preparado para paellas. El análisis de componentes principales permitió diferenciar entre muestras adulteradas y no adulteradas, mientras que la regresión por mínimos cuadrados parciales únicamente resultó útil en la determinación de la adulteración con E-122.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo han sido:

Estudiar si existe efecto del pH en el color del extracto acuoso de azafrán.

Optimizar el proceso de extracción de los compuestos coloreados del azafrán siguiendo la metodología de diseño de experimentos utilizando un diseño de superficie de respuesta central compuesto.

Estudiar y evaluar la presencia de los colorantes E-102, E-110, E-122 y E-124 en distintas muestras problema utilizando los espectros obtenidos en la región del visible.

Utilizar las técnicas de análisis de componentes principales y regresión por mínimos cuadrados parciales para el análisis de mezclas multicomponentes mediante espectrofotometría de absorción molecular.

3. INTRODUCCIÓN

El azafrán, producto de la desecación de los estigmas de la planta *Crocus Sativus L*, tiene sabor amargo, irritante y un toque acre y es la especia más cara que existe [1,2]. *Crocus Sativus* pertenece a la clase de las monocotiledóneas y familia *Iridaceae*. Es una planta herbácea, bulbosa, perenne y de pequeño tamaño, entre 10 y 25 cm de altura. El bulbo está cubierto por una o más túnicas de distinta textura y color, las hojas oscilan entre 6 y 10 cm y son de color verde, lineales, estrechas y suelen crecer después o a la vez que las flores. Las flores están formadas por 6 pétalos de color violáceo y dentro de cada flor se encuentran los estigmas, que son de color amarillo-anaranjado y suele haber 3 estigmas por flor (Figura 1). Los estigmas después de secados constituyen el azafrán.



Figura 1. Flor y estigmas del azafrán.

El cultivo del azafrán comienza con la plantación de los bulbos en los meses de mayo o junio. A finales de agosto se lleva a cabo la nascencia. La floración se produce a mediados de octubre y marca el inicio del periodo de reproducción, y en noviembre se lleva a cabo la recolección [3].

El origen del azafrán es incierto, para algunos es originario de Asia Menor (actual Turquía) y Grecia y para otros procede de Egipto, pero las primeras evidencias del cultivo se remontan al 2300 a. C. Se sabe que el cultivo de azafrán se extiende de Oriente a Occidente. Los griegos lo emplearon como sustancia medicinal y los romanos como colorante textil y aromatizante en perfumes. Más tarde, los árabes cultivaron y consumieron esta planta y es muy probable que gracias a ellos se

mantenga la costumbre de su cultivo y consumo. Respecto a la Península Ibérica, unos aseguran que fue introducido por los fenicios de forma progresiva desde la costa mediterránea hacia el interior de la península, por otro lado, la mayoría de los historiadores afirman que fueron los árabes los que introdujeron el azafrán en el siglo VIII y desde donde se extendió al resto de Europa.

Sus principales zonas de distribución, ya sea por su rendimiento o por superficie de cultivo, son Asia suroccidental, India y la cuenca del Mediterráneo. España, por su calidad y cantidad, fue uno de los principales productores de azafrán, siendo Castilla La Mancha y Aragón las regiones con mayor producción durante el siglo XX. Destacan provincias como Albacete, Ciudad Real, Cuenca, Toledo, Teruel y Zaragoza [4].

El azafrán está compuesto por un 14-16% de agua, 11-13% de compuestos nitrogenados, 12-15% de azúcares, 41-44% de extracto soluble, 0,6-0,9% de aceite volátil y un 4-5% de fibra. Además, contiene dos vitaminas importantes, una de ellas es la riboflavina o vitamina B2, cuyo contenido oscila entre 56 y 138 $\mu\text{g/g}$ (porcentaje más elevado respecto a otros alimentos), y la otra es la tiamina o vitamina B1, cuyos porcentajes se encuentran entre 0,7 y 4,0 $\mu\text{g/g}$, valores normales dentro de los vegetales. También se encuentran ácidos grasos esenciales como el linoleico y linolénico.

Los componentes más importantes del azafrán, cuyas estructuras químicas se observan en la Figura 2, son:

- Las picrocrocinas ($\text{C}_6\text{H}_{26}\text{O}_7$) son las sustancias responsables del sabor amargo en el azafrán. Se encuentran en una cantidad del 4% y se localizan en los estigmas. Es un glicósido que, a causa de los álcalis y los ácidos, se transforma en una molécula de glucosa y en un aglicón denominado 4-hidroxi- β -ciclocitral. Tras un proceso de hidrólisis se convierte en safranal que es un compuesto volátil.
- El safranal ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$) constituye el 70% de la fracción volátil y es el responsable del aroma del azafrán que se produce durante las etapas de secado y de almacenamiento. Es un aldehído monoterpénico cíclico.
- La crocina ($\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_{24}$) es el principal componente activo del azafrán, es un carotenoide glicósido responsable del color.
- La crocetina ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$) es un carotenoide, pero no tiene función provitamínica, tiene estructura diterpénica y simétrica con 7 enlaces dobles y 4 grupos metilo. Es poco soluble en soluciones acuosas básicas y muy soluble en bases orgánicas como piridina. Se obtiene de la hidrólisis de la crocina y tiene propiedades antioxidantes [5].

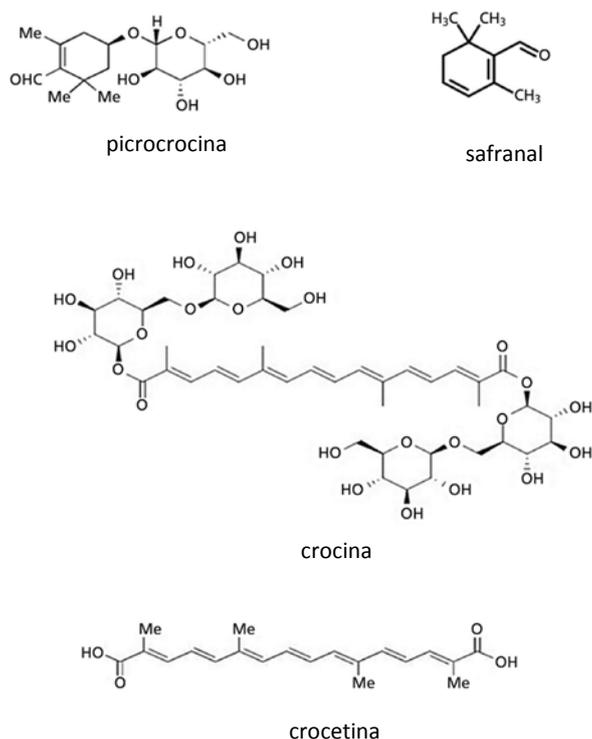


Figura 2. Estructuras químicas de los componentes principales del azafrán.

El Reglamento que recoge las especificaciones y los métodos de análisis sobre el azafrán es la Norma ISO 3632 que consta de dos partes diferentes, la parte 1 donde se encuentran las especificaciones sobre el azafrán (*Crocus Sativus Linnaeus*) y la parte 2 que detalla los métodos de análisis.

Las muestras de azafrán deben analizarse para garantizar que se cumplen todos los requisitos especificados en la Norma ISO 3632-1, llevando a cabo los métodos de análisis físicos y químicos descritos en la Norma ISO 3632-2 [6]. Uno de los análisis que se realiza es la determinación del poder colorante que es la absorbancia a una longitud de onda de 440 nm, a la que las crocinas alcanzan su máximo de absorción, de una disolución de 1g/100 mL utilizando una celda de cuarzo de 1 cm, ya que el color se debe principalmente al contenido en crocinas [7].

Además, la ISO 3632 certifica la calidad del azafrán a través del análisis del contenido en picrocrocinas, safranal y también la ausencia de colorantes artificiales. Esta normativa se encuentra en proceso de revisión ya que no tiene en cuenta las diferentes materias vegetales parecidas al azafrán con las que puede ser adulterado.

La espectroscopia UV-visible es la técnica elegida para los estudios de calidad y estabilidad del azafrán de acuerdo a la Norma ISO. Las absorbancias medidas a 250 nm para picrocrocina, 310 nm para safranal y 440 nm para crocinas son apropiadas para identificar el sabor, olor y color de esta especia [8]. Además, el análisis de los datos espectroscópicos con herramientas quimiométricas como análisis por componentes principales y análisis discriminante permite la caracterización geográfica del azafrán [9,10].

Sin embargo, la identificación y cuantificación de cada componente del extracto de azafrán requiere de otros métodos previos de separación como cromatografía de líquidos, manteniendo como sistema de detección la espectroscopía ultravioleta visible [10].

El azafrán es un ingrediente muy costoso y poco habitual y, por tanto, susceptible de ser adulterado. Los distintos tipos de adulteraciones que se pueden dar en el azafrán son: i) Añadir otras partes de la planta de azafrán: la normativa dicta que estas partes no deben superar el 0,6% del producto. Sin embargo, en algunos casos se ha superado el 40%. Con la adición de residuos se consigue mayor peso de producto, y por lo tanto, más margen de beneficios; ii) Mezclar con azafrán viejo: caracterizado por hilos blancos, vulgarmente llamados canas del azafrán; iii) Añadir grasa o aceite: para conseguir mayor peso de producto. Destaca por el color brillante de la especia; iv) Incrementar el grado de humedad: se utiliza para conseguir mayor peso de producto; v) Adulterar con minerales: en algunos casos, se han descrito adulteraciones con plomo u otros minerales, para aumentar el peso de la especia. Podemos distinguir esta adulteración cuando se mezcla la especia con agua. Si contiene minerales pesados, la hebra se sumergirá lentamente hasta el fondo del vaso; vi) Adulterar con otras plantas: se cortan y secan los pétalos u estigmas de las flores de otras plantas, de forma parecida a los estigmas de azafrán. Después se mezclan con azafrán auténtico, o directamente se venden como si fuese azafrán. Algunas de las plantas que se suelen utilizar son estigmas de cártamo, pétalos de adormidera, pétalos de cardamomo y pétalos de árnica. Se caracterizan porque no tienen poder colorante; vii) Añadir colorantes: se agrega colorante alimentario al azafrán, o mezclas de flores, para aumentar su peso o bien para aportar propiedades colorantes a aquellas plantas que no lo tienen. El más utilizado suele ser la tartracina. Se distingue porque tiñe al instante, a diferencia del azafrán, que tarda un tiempo hasta desprender todo su color [11].

En este trabajo, para estudiar diferentes adulteraciones que puede sufrir el azafrán por adición de colorantes, se considerarán diferentes colorantes sintéticos tales como el amarillo anaranjado (E-110), la tartracina (E-102), la azorrubina (E-122) y el Ponceau 4R (E-124).

El E-110 es un colorante azoico sintético y soluble en agua. Utilizado en la industria alimentaria, mezclado con otros aditivos puede acarrear reacciones de sensibilidad como enrojecimiento facial, picazón e hiperactividad en niños [12].

El E-102 es un colorante azoico producido sintéticamente por acoplamiento azoico del petróleo. Es hidrosoluble, estable al calor, los ácidos y la luz. Puede provocar reacciones alérgicas, asma, hipersensibilidad al ácido salicílico y los salicilatos si hay predisposición.

El E-122 también denominado “carmoisina” es un colorante sintético con una coloración entre rojo y marrón castaño, obtenido por acoplamiento azoico del petróleo, es hidrosoluble, termoestable y fotoestable, además es estable a los ácidos de la fruta. Puede provocar reacciones alérgicas a los ácidos benzoicos, y en las personas asmáticas, sensibles al ácido salicílico y silicatos, puede originar reacciones cutáneas y problemas respiratorios.

Por último, el E-124 es un colorante sintético azoico, de color rojo intenso, derivado del petróleo. En niños puede provocar hiperactividad, en grandes dosis es un liberador de histamina y puede aumentar los síntomas de asma, producir eczemas, urticaria e insomnio. Como es un colorante azoico puede provocar intolerancia en personas alérgicas al ácido salicílico. A largo plazo puede ser cancerígeno [13].

4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

4.1 DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA CENTRAL COMPUESTO

El diseño de experimentos es una metodología que permite la experimentación necesaria para conseguir de la manera más eficiente la optimización de un procedimiento dentro de una región experimental definida.

El objetivo de los diseños de superficie de respuesta es proporcionar los valores de las variables experimentales o factores que optimizan la variable respuesta [14].

Para llevar a cabo un diseño de experimentos se debe definir el dominio experimental, es decir, la región experimental donde varían los valores de los factores. Después, se propone un modelo matemático que relacione los factores o variables experimentales con la respuesta experimental que se desea optimizar. Los modelos matemáticos más utilizados son:

- Modelo lineal o de primer orden: Para dos factores experimentales, sin considerar interacciones y viene dado por la siguiente ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1^2 + \beta_2x_2^2 + \varepsilon$$

- Modelo cuadrático o de segundo orden: Para cuando se sospecha que puede existir una curvatura o interacción entre los factores, de manera que se ajusta a la siguiente ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1x_2 + \beta_4x_1^2 + \beta_5x_2^2 + \varepsilon$$

Los modelos de segundo orden estudian tanto los efectos lineales como los efectos cuadráticos y de interacción. Se utilizan para estudiar superficies más complejas, pero también cuando la región de la respuesta óptima se conoce y se quiere caracterizar. La superficie presentada en la Figura 3 permite observar de una manera visual las distintas zonas de respuesta e identificar las condiciones de operación óptimas.

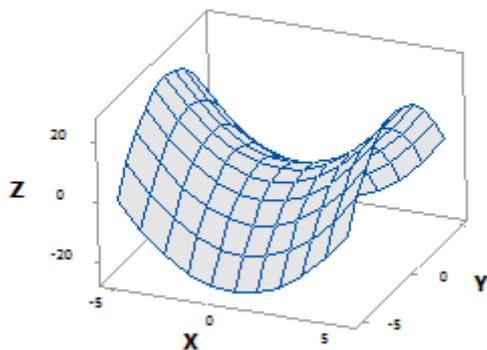


Figura 3. Representación tridimensional de una superficie de respuesta.

Cuando ya se ha fijado el dominio experimental y se ha propuesto el modelo polinomial, es necesario seleccionar el diseño de experimentos, es decir, seleccionar las diferentes condiciones experimentales que garanticen las estimaciones con menor varianza posible de los coeficientes del modelo y de la respuesta. Los diseños más utilizados para la optimización de procedimientos son el diseño Dohelert, el diseño de Box Benken y el diseño central compuesto.

Este último, el diseño central compuesto, es uno de los diseños de superficie de respuesta más usado debido a su gran flexibilidad. Consta de un diseño factorial que permite el estudio del efecto que tiene cada factor sobre la variable respuesta y el efecto que tienen las interacciones entre los factores sobre dicha variable. Además, se incorporan varias réplicas del punto central que permiten detectar la presencia de curvatura proporcionando información sobre los efectos cuadráticos y una estimación del error experimental. Por último, se encuentran los puntos axiales o estrella que permiten ajustar la curvatura a cada factor.

Una vez realizados los experimentos y obtenida la respuesta analítica, se debe ajustar el modelo propuesto y evaluar su adecuación a los datos experimentales obtenidos. Para validar el modelo se comprueba que explica de manera significativa la varianza de la respuesta mediante un test de significación y mediante el porcentaje de varianza explicada, R^2 . Se debe comprobar que no hay fallo de ajuste a través del test de hipótesis correspondiente, siendo para ello necesario hacer réplicas por lo menos en uno de los puntos del diseño. Finalmente, se comprueba que los residuos siguen una distribución normal y tienen una varianza homogénea en caso de que existan réplicas en varias de las condiciones experimentales estudiadas.

4.2 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis de componentes principales es una técnica de análisis de datos que facilita la búsqueda de posibles pautas o tendencias en un conjunto de datos multivariante, ya que reduce la dimensionalidad del sistema, y el establecimiento de relaciones entre objetos y variables. Se registran diversas variables en cada muestra, u objeto, de modo que las muestras se distribuyen en el espacio formando una nube de tantas dimensiones, como variables se estén considerando y mediante el análisis en componentes principales se reduce la dimensionalidad de ésta, para extraer su estructura propia [15].

La técnica consiste en crear un nuevo sistema de coordenadas en el que se sustituirán las variables originales (X_1, X_2, \dots), por las componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables originales:

$$CP_q = l_{q1}X_1 + l_{q2}X_2 + \dots + l_{qp}X_p$$

Los coeficientes o pesos (l_{ij}) indican la aportación de cada variable dentro de la combinación lineal de cada componente principal. Las coordenadas de cada muestra en el nuevo espacio vectorial se denominan *puntuaciones*.

Para evitar que las componentes principales se vean influenciadas por las diferentes escalas de las variables, es habitual estandarizar o autoescalar las variables, de modo que su varianza sea 1 y se encuentren centradas en el origen. Este proceso de escalado garantiza que las elongaciones de la nube de puntos no están causadas por un efecto de escala y no altera las relaciones internas existentes entre las variables.

La primera componente principal sigue la dirección en la que la variabilidad de los puntos que forman la nube es máxima, por lo que se buscan los coeficientes de la combinación lineal correspondiente a la dirección de máxima elongación de la nube de puntos.

La segunda componente principal se construye de modo que sea ortogonal a la primera y en la siguiente dirección de máxima varianza, es decir, es la variable no

correlacionada con la anterior que explica el mayor porcentaje de la varianza no explicada por la primera componente. De este modo se construyen las restantes componentes principales. El número de componentes principales que se pueden construir está limitado bien por el número de variables medidas o bien por el número de objetos disponibles.

$CP_1 = l_{11}X_1 + l_{12}X_2 + \dots + l_{1p}X_p$ tal que $\text{Var}(CP_1) = \lambda_1$ sea máxima

$CP_2 = l_{21}X_1 + l_{22}X_2 + \dots + l_{2p}X_p$ tal que $\text{Var}(CP_2) = \lambda_2$ sea máxima y con la restricción $\text{Corr}(CP_1, CP_2) = 0$

$CP_q = l_{q1}X_1 + l_{q2}X_2 + \dots + l_{qp}X_p$ tal que $\text{Var}(CP_q) = \lambda_q$ sea máxima y con la restricción $\text{Corr}(CP_q, CP_1) = \text{Corr}(CP_q, CP_2) = \dots = \text{Corr}(CP_q, CP_{q-1}) = 0$.

Si fuese posible describir con suficiente precisión los valores de las p variables por un pequeño subconjunto ($k < p$) de ellas, se conseguiría reducir la dimensión del problema, aunque suponga la pérdida de una pequeña parte de la información. Se asume que esa parte de la información no va a ser relevante.

Si realizamos m observaciones de p variables, se analiza si es posible representar adecuadamente esa información con un número menor de variables construidas como combinaciones lineales de las originales. Su utilidad es doble ya que, por un lado, permite representar un espacio de p -dimensiones observadas en un espacio con un menor número de dimensiones, es un primer paso para identificar o no posibles variables *latentes*, que generen los datos. Por otro lado, permite transformar las variables originales, muchas veces correlacionadas, en nuevas variables no correlacionadas, facilitando la interpretación de los datos.

4.3 REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)

La calibración en matrices complejas, como es el caso del extracto de azafrán, generalmente implica la aparición de señales espectrales no específicas que no se pueden abordar mediante un análisis univariante. Una alternativa consiste en recurrir a realizar una calibración multivariante indirecta, utilizando todo el espectro sin seleccionar longitudes de onda concretas.

Una regresión lineal múltiple de la concentración del analito de interés (*variable respuesta*) sobre las absorbancias registradas (*variables predictoras*) suele conducir a un sobreajuste al hacer máxima la correlación entre éstas última y la respuesta. Además, las altas correlaciones existentes habitualmente entre este tipo de variables predictoras y las posibles colinealidades originan modelos inestables y con poca capacidad de predicción.

Los modelos de regresión sobre variables latentes permiten llevar a cabo determinaciones utilizando múltiples variables predictoras aunque éstas no sean completamente específicas o estén altamente correlacionadas. Entre las técnicas de regresión utilizadas para construir estos modelos se encuentran la regresión sobre componentes principales (principal component regression, PCR) y la regresión por mínimos cuadrados parciales (partial least squares regression, PLS). Estas técnicas construyen modelos de regresión utilizando la información aportada por todas las variables predictoras para obtener unas nuevas variables, las variables latentes, buscando tener una alta capacidad predictiva.

La regresión sobre las componentes principales de las variables predictoras elimina los problemas derivados de la correlación y la colinealidad antes mencionados y, además, reduce la inclusión de ruido en el modelo de calibrado. Sin embargo, en este caso, al no existir ninguna relación entre el modo en que se obtienen las componentes principales y la variable respuesta se puede producir un subajuste y es posible que se pierda información útil para explicar la respuesta, no necesariamente relacionada con las componentes principales que expliquen más varianza.

Teniendo esto en consideración, se han desarrollado modelos de regresión PLS que construyen variables latentes buscando direcciones de máxima variabilidad en el espacio de las variables predictoras, pero evitando aquellas direcciones no correlacionadas con la respuesta [16]. Las variables latentes se obtienen también mediante combinaciones lineales de las variables originales.

La selección del número de variables latentes a considerar en el modelo es un punto crítico de este procedimiento de análisis. Uno de las estrategias desarrolladas para establecer cuántas variables latentes se deben tomar es la *validación cruzada*. Este método consiste en predecir la respuesta en alguna/s muestra/s con un modelo PLS construido con las muestras restantes, y este procedimiento se repite de forma que se predice la respuesta para todas las muestras. Las mejores predicciones sobre estas muestras indicarán el número de variables latentes óptimo. Cuando únicamente se deja fuera una muestra y la respuesta se predice con las demás, el método se denomina *leave-one-out*, y se utiliza cuando el número de muestras es reducido.

5. EXPERIMENTAL

5.1 MATERIALES, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

Para el estudio de la influencia del pH se utilizaron una disolución de HCl 0,01M y otra disolución de NaOH 0,01M. Para fijar el pH en el resto de la experimentación llevada a cabo se utilizó una disolución tampón pH 5,9, obtenida a partir de ácido acético 2M y acetato sódico 2M.

Las muestras de azafrán analizadas, tanto en polvo como en hebra, eran de la marca HACENDADO, siendo fabricadas por Jesús Navarro S.A. También se llevaron a estudio un preparado para paellas con azafrán de la marca HACENDADO, el cual contenía, según indicaciones del fabricante, azafrán al 1% y colorante E-102, y un sazónador para paellas de la marca HACENDADO, con un contenido en azafrán del 2,5% y con colorante E-102. Además, para el estudio de adulteración se utilizaron diferentes colorantes cuyas características se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los colorantes utilizados.

Colorante	Marca	Pureza
Tartrazina (E-102)	Fluka	100%
Amarillo-anaranjado (E-110)	Aldrich	90%
Azorrubina (E-122)	Aldrich	50%
Ponceau 4R (E-124)	Aldrich	100%

Las medidas del pH se llevaron a cabo con un pH-metro de la marca HANNA instruments, modelo HI 9025.

En la etapa de extracción se utilizó un equipo de ultrasonidos termostatzado de la marca ULTRASONIC CLEANER.

Los espectros de absorción molecular en el visible de las muestras se registraron cada 2 nm, entre 400 y 800 nm, utilizando una cubeta de vidrio, en un espectrofotómetro UV-visible Cary 50 Conc de Varian.

5.2 SOFTWARE

El análisis de los datos obtenidos tanto en el diseño de experimentos como en el análisis de las componentes principales y la regresión por mínimos cuadrados parciales se ha realizado mediante el programa informático Statgraphics [17].

La detección de datos anómalos en los modelos multivariantes se ha llevado a cabo utilizando el PLS Toolbox de Matlab 7.0 [18,19].

5.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En el estudio del efecto del pH en el color de diferentes extractos de azafrán se pesaron 20 mg de azafrán en polvo y se diluyeron con agua destilada en un matraz aforado de 250 mL. Esta disolución, protegida de la luz, se llevó al ultrasonidos durante 10 minutos a temperatura ambiente y se filtró con papel de filtro.

Sobre siete alícuotas de 10 mL del extracto obtenido se añadieron distintos volúmenes de las disoluciones de HCl 0,01 M y NaOH 0,01 M para alcanzar distintos pH. Una de las alícuotas se mantuvo a su pH natural. En otras tres alícuotas se añadieron 20 μ L, 100 μ L y 300 μ L de NaOH para alcanzar pH básicos, por último, en las tres alícuotas restantes se añadieron los mismos volúmenes de HCl para alcanzar pH más ácidos. Todas las muestras fueron diluidas para su análisis, se midieron sus pH a 22°C y se registraron sus espectros de absorción molecular en el visible.

En el estudio para comprobar qué volumen de extractante, tiempo y temperatura de extracción dan lugar a una mejor extracción de los compuestos colorantes del azafrán se realizó un diseño de experimentos de superficie de respuesta central compuesto. En cada una de las experiencias, 10 mg de azafrán se sometieron a las condiciones de extracción especificadas en el diseño y que se muestran en la Tabla 2. Una vez realizadas todas las experiencias propuestas, se filtraron las muestras, se añadieron 50 mL de tampón acético-acetato pH 5,9 para asegurar que todas las muestras están en las mismas condiciones y se enrasaron a un volumen de 250 mL para no tener que corregir la respuesta, ya que las concentraciones de los extractos están influenciadas por el volumen de extractante empleado en cada experiencia. Por último, se registró el espectro de absorción de las muestras.

Tabla 2. Plan experimental del diseño.

Experimento	Volumen agua (mL)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	50	10	30
2	150	10	30
3	50	30	30
4	150	30	30
5	50	10	45
6	150	10	45
7	50	30	45
8	150	30	45
9	16	20	37,5
10	184	20	37,5
11	100	3,2	37,5
12	100	36,8	37,5
13	100	20	25
14	100	20	50
15	100	20	37,5
16	100	20	37,5
17	100	20	37,5
18	100	20	37,5

Para el estudio de adulteración con diferentes colorantes sintéticos solubles en agua, se llevó a cabo la extracción del color de 10 mg de azafrán en polvo con 126 mL de agua a 50°C durante 3,2 minutos (condiciones óptimas obtenidas en el diseño de experimentos, Sección 6.2), se filtraron, se añadieron 50 mL de tampón pH 5,9 y se enrasaron a 250 mL. A continuación, alícuotas de 15 mL de esta última disolución fueron enriquecidas con distintos volúmenes de una disolución patrón de 1 mg/L de cada colorante, se añadieron 5 mL de tampón pH 5,9 y se completaron hasta 25 mL con agua destilada. En la Tabla 3 se muestran las concentraciones finales de los distintos colorantes artificiales estudiados como adulterantes en el extracto de azafrán. Las muestras están codificadas por cuatro dígitos, el primero relacionado con la concentración del E-102, el segundo con la de E-110, el tercero con la de E-122 y el cuarto con la de E-124. El valor 0 indica la ausencia de colorante en esa muestra y los valores 1, 2, 3 y 4 indican una concentración de 50, 100, 150 y 200 mg colorante/kg azafrán, respectivamente.

Tabla 3. Concentración de cada colorante (mg colorante/kg azafrán) en el diseño de mezclas y sus respectivos códigos.

Experimento	Muestras codificadas	E-102 (mg/kg)	E-110 (mg/kg)	E-122 (mg/kg)	E-124 (mg/kg)
1	2222	100	100	100	100
2	1111	50	50	50	50
3	3111	150	50	50	50
4	1311	50	150	50	50
5	3311	150	150	50	50
6	1131	50	50	150	50
7	3131	150	50	150	50
8	1331	50	150	150	50
9	3331	150	150	150	50
10	1113	50	50	50	150
11	3113	150	50	50	150
12	1313	50	150	50	150
13	3313	150	150	50	150
14	1133	50	50	150	150
15	3133	150	50	150	150
16	1333	50	150	150	150
17	3333	150	150	150	150
18	0222	0	100	100	100
19	4222	200	100	100	100
20	2022	100	0	100	100
21	2400	100	200	100	100
22	2202	100	100	0	100
23	2242	100	100	200	100
24	2220	100	100	100	0
25	2224	100	100	100	200

Se trataron como muestras problema una muestra de azafrán en hebra, un sazonador y un preparado para paellas. Se realizaron tres réplicas por cada muestra problema.

Tanto de las muestras de azafrán en hebra como de las del preparado y sazonador para paellas se extrajeron 10 mg en las condiciones óptimas, es decir, utilizando 126 mL de extractante a 50 °C durante 3,2 minutos, se filtraron las muestras una vez extraídas, se tamponaron y se diluyeron convenientemente.

Se analizaron otras 6 muestras que contenían distintas diluciones del extracto de azafrán en polvo, estas muestras se codificaron con dos dígitos, el cero indica la ausencia de los colorantes artificiales estudiados y los dígitos del 1 al 6 indican el volumen de extracto en 25 mL, como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones de los distintos extractos de azafrán diluidos.

Muestra	Muestras codificadas	Extracto (mL)	Tampón (mL)
1	0_1	1	5
2	0_2	5	5
3	0_3	7,5	5
4	0_4	10	5
5	0_5	12,5	5
6	0_6	15	5

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 INFLUENCIA DEL pH EN EL COLOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE AZAFRÁN

En esta etapa inicial se pretende estudiar la influencia del pH en diferentes extractos de azafrán y observar así la dependencia del color con el pH del medio. En la Tabla 5 se muestran los pH considerados y en la Figura 4 (a) se muestran las diferentes coloraciones de los extractos acuosos a esos pH. A simple vista no se aprecia gran cambio en la coloración a los distintos pH, ni cuando se acidifica el medio ni cuando se basifica. El pH natural de los extractos era 6,5.

En la Figura 4 (b) se muestran los espectros de absorción de las diferentes disoluciones. No se observan grandes desplazamientos, excepto en la disolución a pH 10,25 donde se aprecia un ligero desplazamiento a lo largo de todo el espectro registrado. Además, el máximo de absorción en la gran mayoría de las muestras se encuentra en 442 nm menos la muestra más básica que tiene el máximo de absorbancia a 430 nm. Por tanto, se concluye que el pH no influye en el espectro obtenido, excepto a valores más básicos donde se observa un ligero desplazamiento de todo el espectro a longitudes de onda más bajas.

Tabla 5. Volúmenes de NaOH y HCl añadidos y valores de pH en las diferentes alícuotas del extracto de azafrán.

Muestra	NaOH (μL)	HCl (μL)	pH
1	-	-	6,50
2	20	-	7,18
3	100	-	9,45
4	300	-	10,25
5	-	20	6,16
6	-	100	4,79
7	-	300	4,01

Aunque no se observa dependencia de las señales espectrales con el pH, en adelante se trabajará a pH 5,9, valor próximo al pH natural del extracto de azafrán, para evitar variaciones en el pH en muestras que contengan otros colorantes sobre los que no se ha estudiado el efecto del pH.

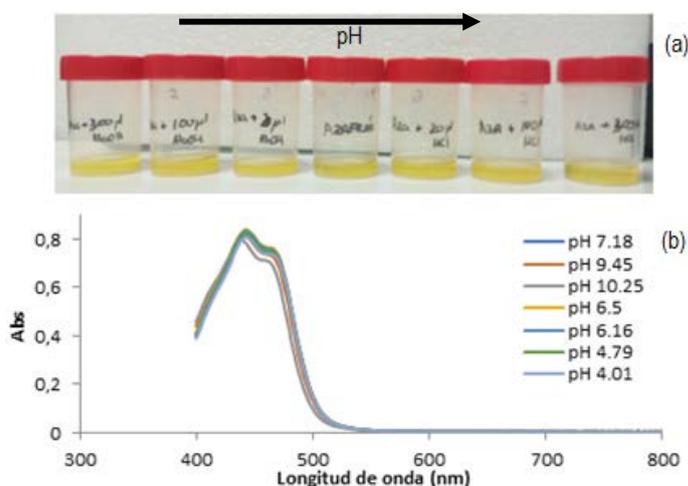


Figura 4. (a) Extractos de azafrán a diferentes pH. (b) Espectros de absorción de dichos extractos.

6.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

Son varios los factores que pueden afectar a un proceso de extracción líquido-líquido, entre ellos el tipo y volumen de disolvente empleado para una cantidad fija de analito, el tiempo de extracción y, en ocasiones, la temperatura de extracción. En el caso del azafrán, el compuesto responsable del color son las crocinas que se caracterizan por su solubilidad en agua, por lo que éste es el disolvente elegido en este trabajo para su extracción. El resto de factores experimentales como volumen de extractante, tiempo y temperatura de extracción se someten a un proceso de optimización mediante diseño de experimentos. Para ello, se extrajeron 10 mg de azafrán en polvo con distintos volúmenes de agua que variaron entre los 16 mL y los 184 mL, el tiempo estudiado fue de 3,2 minutos a 36,8 minutos y la temperatura varió de 25°C a 50°C.

Tras llevar a cabo las distintas extracciones indicadas en la Tabla 2 se registró el espectro de cada una de las disoluciones. En la Figura 5 se representan gráficamente los espectros de absorción obtenidos en las diferentes experiencias.

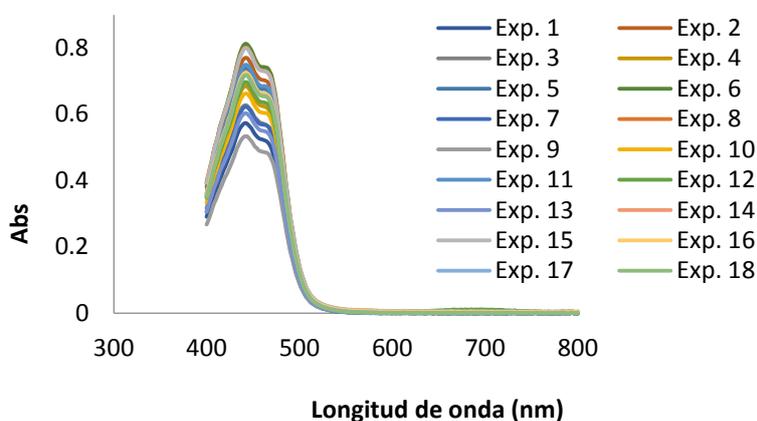


Figura 5. Espectros de las diferentes experiencias del diseño de experimentos.

Se consideró como respuesta analítica la absorbancia obtenida a 442 nm que coincide, en todas las experiencias, con el máximo de absorción (Tabla 6).

Tabla 6. Respuestas obtenidas en las experiencias del diseño de experimentos.

Experimento	Respuesta	Experimento	Respuesta
1	0,5734	10	0,6625
2	0,7703	11	0,7493
3	0,6273	12	0,6972
4	0,6843	13	0,6032
5	0,7395	14	0,7251
6	0,8128	15	0,7994
7	0,6227	16	0,7253
8	0,8017	17	0,7175
9	0,5334	18	0,7173

El modelo de segundo orden propuesto en este caso fue:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{22}x_2^2 + b_{23}x_2x_3 + b_{33}x_3^2$$

Donde x_1 hace referencia al volumen de extractante, x_2 al tiempo de extracción y x_3 a la temperatura de extracción.

Para validar el modelo ajustado se estudian los residuos mediante un ANOVA, es decir, mediante un análisis de varianza donde se muestra el nivel de significación de cada coeficiente. El coeficiente de determinación obtenido fue de 80% y al analizar los residuos estudentizados para localizar posibles puntos anómalos se comprueba que la experiencia 2 del plan experimental (Tabla 2) tiene un residuo estudentizado mayor de 2,5 en valor absoluto por lo que se considera ese punto como anómalo.

Una vez eliminado el punto anómalo se tiene un nuevo diseño experimental con el que se ajusta un nuevo modelo, con los puntos restantes, cuya calidad se evalúa a través de los factores de inflación de varianza (VIF) de los coeficientes. En el primer diseño, con todos los puntos, el valor VIF más alto era 1,08 y en el nuevo modelo los VIF no superan valores de 1,20. Puesto que se consideran valores adecuados de VIF entre 1 y 4, se concluye que el nuevo diseño permitirá obtener resultados de calidad suficiente.

El análisis de la varianza correspondiente al nuevo modelo, que tiene un coeficiente de determinación aproximadamente del 90%, se muestra en la Tabla 7. Para evaluar la significación de los coeficientes se considera como hipótesis nula H_0 : el coeficiente no es significativo, y como hipótesis alternativa H_a : sí que lo es. Con un nivel de confianza del 95%, si el nivel de significación es menor de 0,05 se rechaza la hipótesis nula, y si es mayor no existen evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula y, por tanto, se acepta la hipótesis alternativa.

Por tanto, solo serían significativos el coeficiente lineal de la temperatura y los coeficientes correspondientes a los términos lineal y cuadrático del volumen de extractante. Los coeficientes relacionados con el tiempo de extracción no son significativos en ningún caso, por lo tanto, este factor no tiene efecto sobre la respuesta analizada.

Se concluye que tanto el volumen de extractante como la temperatura de extracción son significativos y por tanto habrá que encontrar cuáles son las condiciones óptimas de estas variables que permitan extraer más crocinas. Por otra parte, el tiempo de extracción puede fijarse en cualquiera de los valores dentro de la región experimental para futuras experiencias.

En cuanto a la posible existencia de fallo de ajuste, éste se evalúa mediante el correspondiente test de hipótesis. En este caso, las hipótesis son las siguientes. H_0 : no existe fallo de ajuste y la H_a : el modelo no es adecuado. Como el nivel de significación en este test (Tabla 7) es mayor de 0,05 no se puede rechazar la hipótesis nula y por tanto se concluye que no hay fallo de ajuste y que el modelo es válido.

Tabla 7. Análisis de la varianza del modelo ajustado.

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Significación
x_1 : volumen	1,76E-02	1	1,76E-02	11,06	0,0449*
x_2 : tiempo	2,60E-04	1	2,60E-04	0,16	0,7130
x_3 : temperatura	3,00E-02	1	3,00E-02	18,91	0,0225*
$x_1 x_1$	2,48E-02	1	2,48E-02	15,63	0,0289*
$x_1 x_2$	1,97E-03	1	1,97E-03	1,24	0,3465
$x_1 x_3$	2,94E-03	1	2,94E-03	1,85	0,2667
$x_2 x_2$	4,83E-06	1	4,83E-06	0,00	0,9595
$x_2 x_3$	6,98E-03	1	6,98E-03	4,39	0,1271
$x_3 x_3$	5,70E-03	1	5,70E-03	3,59	0,1546
Fallo de ajuste	1,46E-03	4	1,46E-03	0,92	0,5491
Error puro	1,59E-03	3	1,59E-03		
Total (corr)	1,40E-01	16			

A continuación, en la Tabla 8 se muestran los coeficientes de la superficie de respuesta ajustada. Para encontrar las condiciones de los tres factores experimentales estudiados que optimizan la respuesta, es decir, que maximizan la absorbancia, se recurre a las gráficas de superficie de respuesta y curvas de nivel (Figuras 6).

Tabla 8. Coeficientes del modelo de regresión.

Nombre	Factor	Coefficiente
b_0	Constante	$-3,58 \cdot 10^1$
b_1	Volumen	$1,40 \cdot 10^3$
b_2	Tiempo	$1,34 \cdot 10^2$
b_3	Temperatura	$3,88 \cdot 10^2$
b_{11}	Volumen-volumen	$-1,80 \cdot 10^5$
b_{12}	Volumen-tiempo	$3,69 \cdot 10^5$
b_{13}	Volumen-temperatura	$6,00 \cdot 10^5$
b_{22}	Tiempo-tiempo	$-6,27 \cdot 10^6$
b_{23}	Tiempo-temperatura	$-4,62 \cdot 10^4$
b_{33}	Temperatura-temperatura	$-3,83 \cdot 10^4$

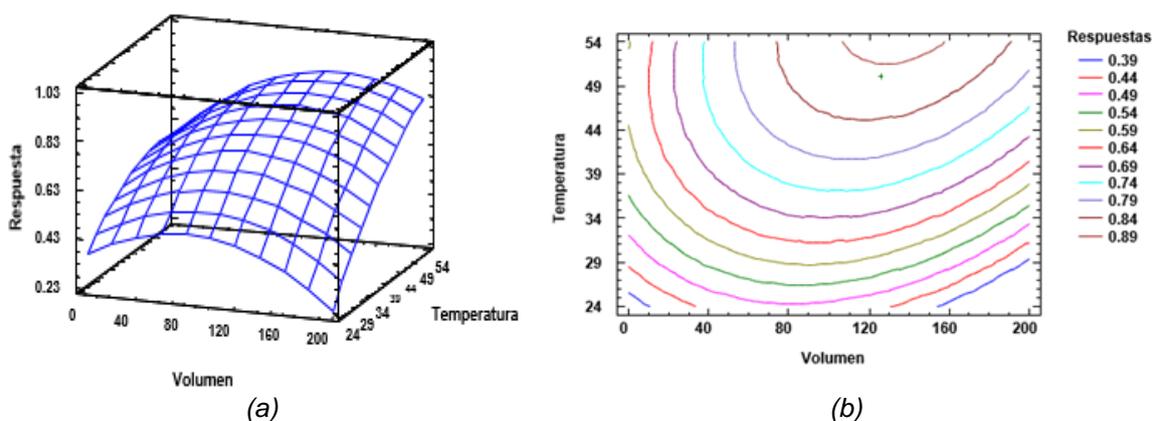


Figura 6. (a) Superficie de respuesta del modelo ajustado. (b) Curvas de nivel. Tiempo de extracción 3,2 min.

Como se tienen tres factores experimentales no es posible representar gráficamente la respuesta, por ello se fija el factor tiempo de extracción ya que no es un factor significativo y se representa la respuesta en función de los otros dos factores. El valor fijado para este factor fue de 3,2 min, que es el tiempo de extracción más bajo del dominio experimental considerado, lo que permite ahorrar tiempo de análisis.

En la superficie de respuesta de la Figura 6 (a) se observa un máximo de absorción en la frontera del dominio experimental. Este máximo, como puede observarse en las curvas de nivel en la Figura 6 (b) se corresponde con un volumen de extracción de 126 mL y una temperatura de 50 °C. Por tanto, las condiciones óptimas de extracción se fijan en 126 mL de volumen de extractante a 50°C de temperatura durante un tiempo de 3,2 min.

6.3 ESTUDIO DE ADULTERACIÓN

Para estudiar la adulteración del azafrán con colorantes sintéticos se eligieron los colorantes E-102, E-110, E-122 y E-124, cuya combinación puede dar lugar a una coloración similar a la propia del azafrán. En la Figura 7 se muestran los espectros de absorción individuales de estos colorantes para una concentración de 5 mg/L, excepto en el caso del E-122 cuya concentración fue de 0,5 mg/L. Se aprecia un alto solapamiento de las señales espectrales de estos colorantes con la región espectral de los extractos de azafrán (Figura 4 (b)). Se comprueba que la técnica es más sensible para el colorante E-122, puesto que se obtiene una señal casi doble cuando su concentración es diez veces más pequeña que la del resto de colorantes.

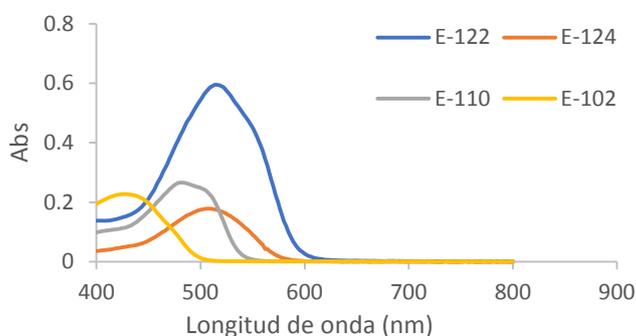


Figura 7. Espectros de los diferentes colorantes.

El rango de adulteración que se va a estudiar está comprendido entre 0 y 200 mg de colorante/kg de azafrán. Para ello se preparan 25 mezclas con un volumen fijo de extracto de azafrán y distintos volúmenes de los colorantes para alcanzar la concentración deseada (Tabla 3). Además, en el estudio también se incluyen las seis muestras que solo contienen extracto de azafrán en diferentes grados de dilución (Tabla 4). A continuación, se registra el espectro de las muestras resultantes entre 400 y 800 nm, en intervalos de 2 nm, lo que supone un total 201 variables.

Se realiza un primer análisis de componentes principales. El conjunto de aprendizaje está constituido por las 25 muestras de la Tabla 3 y por 4 muestras de la Tabla 4 (las muestras 0_3 y 0_5 se han considerado muestras test). Se tienen en cuenta las 201 variables, autoescalando los datos. Es decir, el conjunto de aprendizaje tiene de dimensión 29 x 201.

Se observa en la Tabla 9 que las tres primeras componentes principales explican el 95,21% de la varianza, aunque se debe tener en cuenta que la cuarta componente tiene un autovalor muy próximo a uno. Como los datos han sido autoescalados, puede ser indicativo de que esa componente principal también podría ser significativa.

Tabla 9. Porcentaje de varianza explicada y varianza acumulada de las componentes principales construidas con todas las variables y con una selección de las mismas. Con un asterisco se indican las componentes principales consideradas.

201 variables				101 variables			
C.P.	Autovalor	Varianza expl. (%)	Varianza acum. (%)	C.P.	Autovalor	Varianza expl. (%)	Varianza acum. (%)
1	141,04*	70,17	70,17	1	84,88*	84,04	84,04
2	47,92*	23,84	94,01	2	14,74*	14,60	98,64
3	2,41*	1,20	95,21	3	0,72	0,71	99,35
4	0,99	0,49	95,70				

Se ha llevado a cabo un estudio análogo con un número más reducido de variables, las absorbancias registradas en una ventana espectral más centrada en las señales de interés, entre 400 y 600 nm (101 variables). Los resultados obtenidos en este análisis de componentes principales indican que con dos componentes principales se explica el 98,64% de la varianza (Tabla 9). En este caso, con dos componentes principales se alcanza un porcentaje de varianza explicada mayor que en el caso anterior con tres componentes principales, esto puede deberse a que las longitudes de onda que se han excluido en el segundo caso únicamente aportaban ruido al modelo.

Para analizar la posible presencia de muestras anómalas se realiza un estudio de los índices Q y T² de Hotelling de los objetos, a un nivel de confianza del 95%. Para una muestra, un valor alto de estos estadísticos, por encima de los valores umbral para ambos índices, indica que ésta se encuentra fuera del hiperplano formado por el conjunto de muestras (Q alto) y alejada del centroide del mismo (T² de Hotelling alto). Por tanto, esta muestra debe ser eliminada porque hay indicios para asegurar que es anómala respecto del resto.

En la Figura 8 (b) se puede observar que ninguna de las muestras de conjunto de aprendizaje (en gris) supera de forma simultánea los valores umbral de los índices Q y T² de Hotelling, por lo tanto, no hay datos anómalos en dicho conjunto.

A continuación, se consideran como conjunto test las muestras 0_3 y 0_5 indicadas anteriormente, así como los extractos obtenidos de las hebras de azafrán y del preparado y del sazónador para paellas.

En la Figura 8 (a) se observa, teniendo en cuenta los criterios mencionados anteriormente, que las muestras del sazónador (s1, s2 y s3) son muestras anómalas. Esto es debido a que estas muestras en su composición carecen prácticamente de azafrán y están compuestas principalmente por colorantes artificiales y otros ingredientes colorantes potenciadores del sabor.

A continuación, se llevó a cabo el análisis de componentes principales con las 101 variables, pero considerando en el conjunto de aprendizaje únicamente las mezclas que contenían colorantes, junto con la muestra 0_6 (muestra que tiene la misma dilución de azafrán que éstas). Se observa que, en este caso, con cuatro componentes principales se explica el 97,8% de la varianza, recogiéndose los datos obtenidos en la Tabla 10.

Tabla 10. Porcentaje de varianza explicada y varianza acumulada de las componentes principales construidas con una selección de variables y el conjunto de aprendizaje reducido.

C.P.	Autovalor	Varianza expl. (%)	Varianza acum. (%)
1	62,42*	61,81	61,81
2	31,94*	31,62	93,43
3	2,93*	2,90	96,34
4	1,44*	1,43	97,77
5	0,38	0,38	98,15

Mediante el estudio de los índices Q y T^2 de Hotelling de los objetos, con un nivel de confianza del 95%, se analiza la presencia de muestras anómalas, teniendo en cuenta los criterios descritos anteriormente. En la Figura 10, donde se representan estos índices, las muestras tanto del sazonador como del preparado para paellas, Figura 10 (a), se consideran muestras anómalas ya que superan los valores umbral de ambos índices, lo que puede ser debido a que en su composición carecen prácticamente de azafrán. En la Figura 10 (b) se observa que las muestras de azafrán en hebra también son muestras anómalas y esto puede deberse a que estas muestras únicamente contienen azafrán, pero en una dilución distinta a la de las muestras del conjunto de aprendizaje.

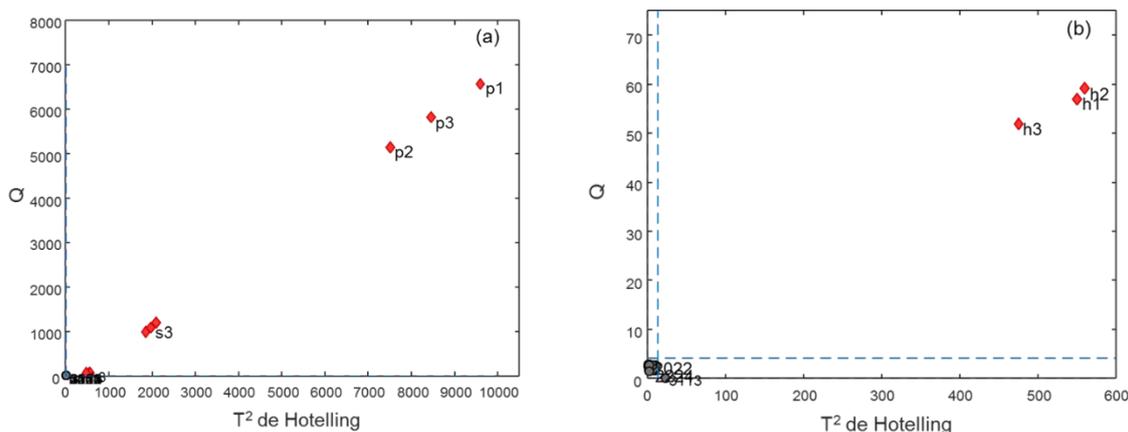


Figura 10. (a) Índices Q y T^2 de Hotelling (valores umbral a un nivel de confianza del 95%) obtenidos en el análisis de componentes principales con cuatro componentes. (b) Ampliación de la parte inferior del gráfico de la figura (a). Círculos grises: conjunto de aprendizaje. Rombos rojos: conjunto test.

En la Figura 11, se representan las puntuaciones de la primera y segunda componente del conjunto de aprendizaje. No se observa una distribución clara de las distintas mezclas de colorantes, excepto las muestras que contienen la máxima concentración de alguno de los colorantes, (incluyen el valor 4 en su codificación) que se encuentran en valores positivos de la primera componente.

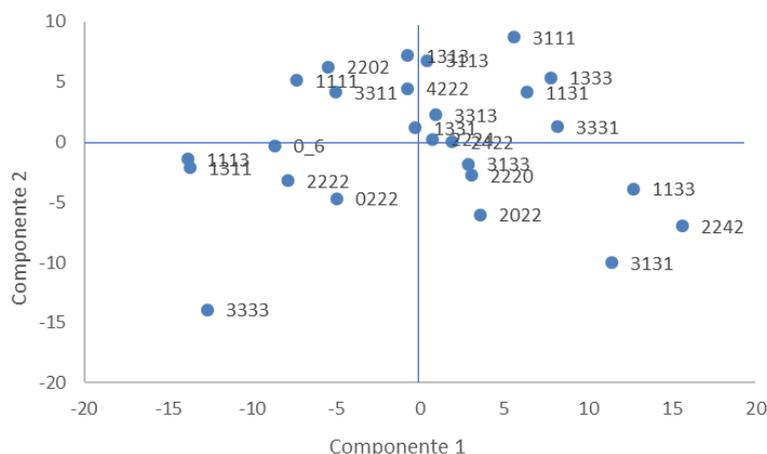


Figura 11. Puntuaciones de las muestras del conjunto de aprendizaje en las dos primeras componentes principales del modelo construido con 101 variables predictoras.

En vista de estos resultados, se concluye que el análisis de componentes principales no permite diferenciar las distintas adulteraciones del azafrán con colorantes artificiales por lo que se recurre a utilizar la regresión por mínimos cuadrados parciales, técnica en la que las variables latentes se construyen teniendo en cuenta la respuesta. Se construye un modelo PLS para cada colorante considerando como respuesta la concentración del mismo.

Los modelos construidos para el E-102, E-110 y E-124, con los datos autoescalados (101 variables) y con el método *leave-one-out* de validación cruzada, no explican valores aceptables de la varianza en predicción, por lo que se desechan. Sin embargo, para el E-122 se construye un modelo con cuatro variables latentes, que explica el 96% de la varianza de la respuesta y casi un 88% de varianza en predicción, como se indica en la Tabla 11.

Tabla 11. Porcentaje de varianza acumulada en el bloque X (absorbancia), en el bloque Y (concentración) y en predicción.

Variable latente	Varianza acum. de X (%)	Varianza acum. de Y (%)	Varianza en predicción
1	82,99	51,61	36,74
2	98,59	68,80	62,72
3	99,35	90,43	86,70
4	99,43	95,68	87,61
5	99,48	97,48	82,92

El análisis de los índices Q y T² de Hotelling, Figura 12, indica que tanto las muestras del sazoador como del preparado para paellas son muestras anómalas y, por tanto, no es aplicable el modelo PLS estimado. Las muestras de azafrán en hebra se

encuentran por debajo de los valores umbral de Q y T^2 de Hotelling por tanto estas muestras no se consideran anómalas.

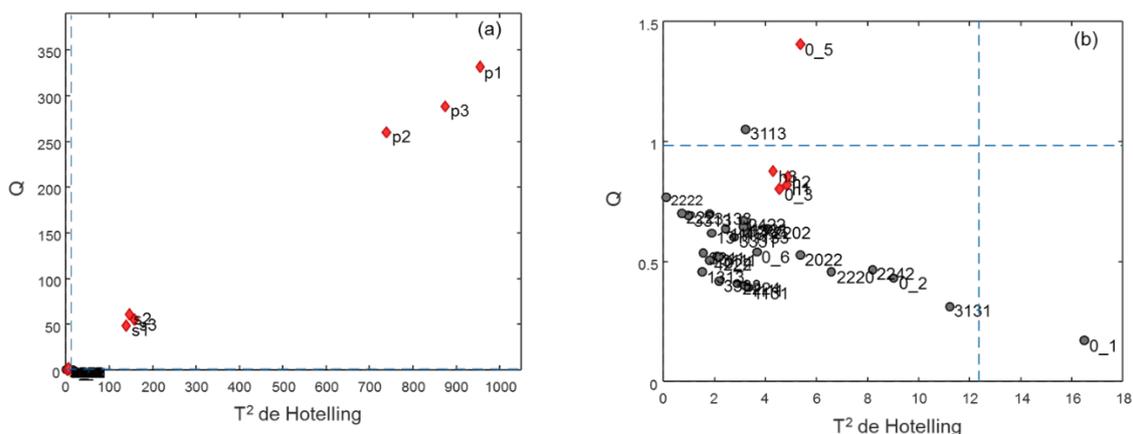


Figura 12. (a) Índices Q y T^2 de Hotelling (valores umbral a un nivel de confianza del 95%) obtenidos mediante la regresión por mínimos cuadrados parciales con cuatro variables latentes. (b) Ampliación de la parte inferior del gráfico de la figura (a). Círculos grises: conjunto de aprendizaje. Rombo rojo: conjunto test.

La Figura 13 representa las dos primeras variables latentes, que acumulan prácticamente un 70% de la varianza de la respuesta. Se observa que las muestras que contienen únicamente concentraciones diferentes del extracto de azafrán adquieren valores negativos para la primera variable y van incrementado el valor de la segunda variable a medida que se incrementa el grado de dilución.

En cuanto al nivel de concentración del E-122 se observan, en general, valores positivos en la primera variable y valores crecientes en la segunda variable a medida que aumenta la concentración. Los valores de concentración calculados tanto para las hebras como las diluciones del conjunto test son prácticamente despreciables.

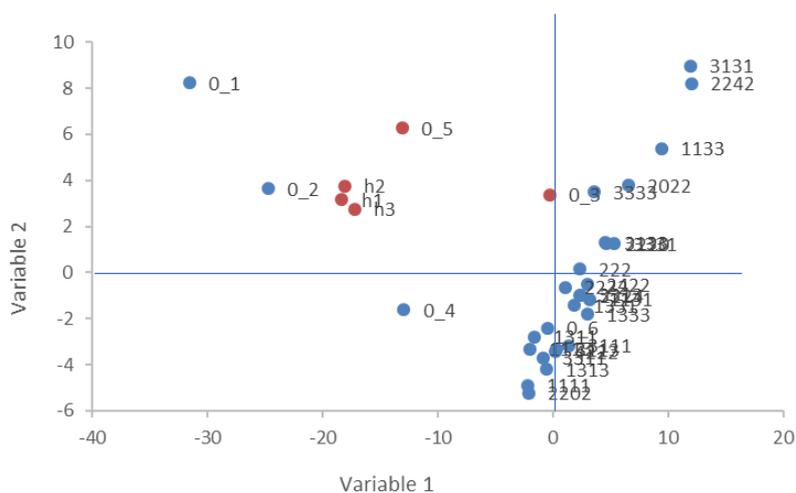


Figura 13. Puntuaciones de la primera y segunda variables latentes del modelo PLS para el E-122.

El modelo de regresión PLS permitiría determinar la adulteración de un azafrán con colorante E-122 dentro de los rangos considerados. Sin embargo, para el resto de los colorantes esto no sería posible probablemente debido a que la técnica de análisis no es suficientemente sensible para los niveles de adulteración considerados.

7. CONCLUSIONS

pH of the medium has no influence on the color of the saffron extracts, or on the molecular absorption spectra in the UV-visible region. Only a light shift of the spectral signals to smaller wavelengths is observed at the most basic pH considered.

The fit of a quadratic model using a central composite design has led us to establish that the significant factors in extracting the color of saffron by ultrasound are extractant volume and temperature, while effect of extraction time is not significant. In the optimum conditions found, 20 mg of saffron should be extracted with 126 mL of extractant at a temperature of 50 ° C for 3,2 minutes.

The principal component analysis carried out allows one to differentiate the samples adulterated with artificial colours from the non-adulterated ones. A simpler model is obtained, with fewer latent variables and that explains more variance when considering a smaller window of wavelengths, since it avoids variables that only add noise to the model.

Partial least squares regression has only been useful to determine the level of adulteration of the saffron extracts with the E-122 colour. For the remaining colours, the sensitivity of the method of analysis has been insufficient at the levels of adulteration considered.

Samples of seasoning and paella powder analyzed have not been compatible with the multivariate models fitted. This is because they contain other ingredients, which also contribute color, which have not been considered in this study. The indices used for the study of outlier data have allowed their detection.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Fernández Pérez, J.A., Escribano Martínez, J. *Bioteconología del azafrán*. Cuenca. Universidad de Castilla La Mancha. 2000.
- [2] Pierre Arvy, M., Gallouin, F. *Espicias, aromatizantes y condimentos*. Madrid. Mundi-Prensa. S. A. 2007.
- [3] Pérez Bueno, M. *El azafrán: Historia, Cultivo, Comercio y Gastronomía*. Madrid. Agrotécnica S.L. 1995.
- [4] Rubio Terrado, P. *El azafrán y la comarca del Jiloca*. Zaragoza. Centro de estudios del Jiloca. 1997
- [5] Christodoulou, E., Kadoglou, N.P., Kostomitsopoulos, N., Valsami, G. *A natural product with potential pharmaceutical applications*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2015, 67, 1634-1649.
- [6] AENOR. *Azafrán (Crocus Sativus Linnaeus). Especificaciones*. UNE-ISO 3632-1. Madrid: AENOR. 2012.
- [7] AENOR. *Azafrán (Crocus Sativus Linnaeus). Métodos de análisis*. UNE-ISO 3632-2. Madrid: AENOR. 2011.
- [8] Sánchez, A.M., Carmona, M., Zalacain, A., Carot, J.M., Jabaloyes, J.M., Alonso, G. *Rapid determination of crocetin esters and picrocrocin from saffron spice (Crocus sativus L.) Using UV-visible Spectrophotometry for quality control*. J. Agric. Food Chemistry. 2008, 56, 3167-3175.
- [9] D'Archivio, A.A., Maggi, M.A. *Geographical identification of saffron (Crocus sativus L.) by linear discriminant analysis applied to the UV-visible spectra of aqueous extracts*. Food Chemistry. 2017, 219, 408-413.
- [10] D'Archivio, A.A., Giannitto, A., Maggi, A.A., Ruggieri, F. *Geographical classification of Italian saffron (Crocus sativus L.) base don chemical constituents determined by high-performance liquid-chromatography and by using linear discriminant analysis*. Food Chemistry. 2016, 212, 110-116.
- [11] http://www.botanical-online.com/azafran_adulterado.htm (última revisión 05/05/2017).
- [12] Kobun, R., Ling Anak, A., Shafiquzzaman, S., Jahurul Haque, A., Sharifudin, S. *Extraction and Analytical Methods for Determination of Sunset Yellow (E-110)*. Food Analytical Methods. 2017, 10, 773-787.
- [13] Emadfa, I., Mustak, E., Fritzsche, D. *Tabla de aditivos los números E*. Madrid. Hispano Europea. 2011.
- [14] Sarabia, L.A., Ortiz, M.C. Response surface methodology. En: S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Editores), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 1. Amsterdam. Elsevier. 2009.
- [15] Massart, D.L., Vandeginste, B. G. M., Buydens, L. M. C., Jong, S., Smeyers-Verbeke, P. J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Parte A, en *Data Handling in Science and Technology*. Amsterdam. Elsevier. 1997.

- [16] Martens, H., Naes, T. *Multivariate calibration*. Nueva York. JohnWiley & Sons. 1989.
- [17] STATGRAPHICS Centurion XVII (versión 17.1.12), Statpoint Technologies, Inc. Herndon, VA, 2017.
- [18] Wise, B. M., Gallagher, N. B., Bro, R., Shaver, J. M., PLS Toolbox 7.9.5.19417, eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA, 2015.
- [19] MATLAB versión 8.4.0.150421 (R2014b), The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA, 2014.