

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



UNIVERSIDAD DE BURGOS

**OPTIMIZACIÓN DE LA PRECIPITACIÓN DE
CROCETINAS EN AZAFRÁN. ESTUDIO DE LA
ADULTERACIÓN CON COLORANTES ARTIFICIALES
MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS Y
TÉCNICAS MULTIVARIANTES**

Tutoras: Ana Herrero Gutiérrez y Celia Reguera Alonso

LAURA SANTAMARÍA LUIS

Marzo de 2018



**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN: CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
CURSO: 2017-18**

Dña. Ana Herrero Gutiérrez y Dña. Celia Reguera Alonso informan de que el alumno Dña. Laura Santamaría Luis, ha realizado el trabajo "Optimización de la precipitación de crocetas en azafrán. Estudio de la adulteración con colorantes artificiales mediante espectrofotometría UV-VIS y técnicas multivariantes" bajo su tutela, y consideran que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 20 de marzo de 2018

Fdo.: Ana Herrero

Fdo.: Celia Reguera

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

Dña. Laura Santamaría Luis y Dña. Ana Herrero Gutiérrez y Dña. Celia Reguera Alonso, autora y tutoras del Trabajo Fin de Grado autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto

Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 20 de marzo de 2018

Fdo.: Laura Santamaría

Fdo.: Ana Herrero

Fdo.: Celia Reguera

ÍNDICE

1. RESUMEN Y ABSTRACT	1
2. OBJECTIVES	2
3. INTRODUCCIÓN	2
4. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
4.1. Diseño de superficie de respuesta: Diseño central compuesto	5
4.2. Análisis de componentes principales	6
4.3. Regresión de componentes principales	6
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	7
5.1. Muestras, reactivos e instrumentos	7
5.2. Procedimiento experimental	8
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
6.1. Estudios previos de hidrólisis ácida de crocinas	8
6.2. Optimización de las condiciones de hidrólisis ácida	10
6.3. Estudio de adulteración de azafrán con colorantes artificiales	13
6.4. Regresión de componentes principales	20
7. CONCLUSIONES	23
8. BIBLIOGRAFÍA	24

1. RESUMEN Y ABSTRACT

Dado que el azafrán es una de las especias más caras a nivel mundial, su adulteración se encuentra documentada desde la edad media. La adulteración puede consistir en la adición de colorantes artificiales con el objetivo de imitar la apariencia del producto auténtico y/o aumentar el poder de coloración del extracto acuoso, que es debido a la presencia de crocinas. Estos compuestos del azafrán suponen un interferente en la detección espectrofotométrica de la adulteración del mismo con colorantes artificiales. En este trabajo se ha abordado el estudio de la adulteración del azafrán eliminando previamente las crocinas mediante la hidrólisis ácida de las mismas.

En una primera etapa, se comprobó la efectividad de la hidrólisis ácida en la eliminación de las crocinas del extracto acuoso del azafrán y la no influencia del mismo en la señal espectral de los colorantes E-102, E-110, E-122 y E-124.

Mediante un diseño de superficie de respuesta central compuesto se optimizaron las condiciones de hidrólisis, considerando como factores experimentales el pH, la temperatura y el tiempo de tratamiento. Posteriormente, mediante análisis de componentes principales, se estudiaron muestras de azafrán hidrolizado y adulterado con pequeñas cantidades de los colorantes E-102, E-110, E-122 y E-124, y extractos hidrolizados de un sazónador y de un preparado para paellas. Este análisis permitió diferenciar entre muestras adulteradas y no adulteradas. Además, se encontró un fuerte efecto matriz que anulaba la señal de los colorantes y que hizo imposible detectar el colorante responsable de la adulteración y la concentración del mismo en el azafrán. La regresión de componentes principales únicamente resultó útil en la determinación de estos colorantes en medio acuoso.

Since saffron is one the most expensive species in the world, its adulteration is documented as long as the Middle Ages. Adulteration may consist of adding artificial colours with the aim of imitating the appearance of the genuine product and/or increasing the colouring strength of the aqueous extract, which is due to the presence of crocins. These components of saffron interfere in the spectrophotometric detection of its adulteration with artificial colours. The study of adulteration of saffron is performed in this work by removing previously crocins by acid hydrolysis.

Firstly, the efficiency of the acid hydrolysis on the precipitation of crocins in aqueous extracts of saffron is verified, together with the no influence on the spectral signal of colours E-102, E-110, E-122 and E-124.

The hydrolysis conditions are optimised by means of a central composite response surface design; pH, temperature and time of treatment are taken as experimental factors. Next, hydrolysed and adulterated (with small quantities of E-102, E-110, E-122 and E-124) saffron extract samples, and hydrolysed extract of seasoning and paella powder (spice blend) samples, are studied using principal component analysis. This technique allows one to differentiate between adulterated and non-adulterated samples. In addition, a strong matrix effect that supresses the signals of colours are found, which makes the detection and quantification of the colour responsible of adulteration impossible. The principal component regression analysis is only suitable for determining these colours in an aqueous medium.

2. OBJECTIVES

The objectives of this work have been:

- To study the effect of the acid treatment at a high temperature on the spectrophotometric signal of an aqueous extract of saffron and of aqueous solutions of dyes E-102, E-110, E-122 and E-124.
- To optimize the precipitation process of crocetins through the design of experiments methodology, using a central composite response surface design.
- To study and evaluate the presence of dyes E-102, E-110, E-122 and E-124 in hydrolysed saffron extracts using the spectra obtained in the visible region.
- To use the principal component analysis techniques for the analysis of multi-component mixtures.
- To develop a quick, with little pretreatment and low cost method for the detection and quantification of adulterants in saffron, so it can be applied routinely in food industries.

3. INTRODUCCIÓN

El Códex Alimentarius [1] define al Azafrán como la especia que se compone de “los estigmas desecados de entre 20 y 40 mm de la parte aérea de los pistilos de *Crocus sativus L.*, con las tolerancias máximas de estilos y restos florales que se especifiquen para las diversas calidades en la reglamentación correspondiente”. La normativa de referencia aceptada en el control de calidad del azafrán a nivel internacional es la especificación técnica ISO 3632-2:2011 [2] que incluye en su alcance el azafrán en filamentos, en filamentos cortados y en polvo.

El azafrán se comercializa en función de criterios como la pureza, la calidad y la forma (filamentosa o en polvo). Se considera puro siempre que cumpla con los requisitos de la parte 1 de Especificaciones de la norma ISO 3632-1:2012 [3], y que no se le haya añadido ninguna sustancia diferente del producto natural.

Los metabolitos secundarios de mayor interés en el azafrán son los ésteres de crocetina, debido principalmente al papel que desempeñan en el color y las propiedades medicinales; la picrocrocina, por su aportación al sabor amargo, y el safranal, compuesto mayoritario en la fracción aromática de la especia, cuya síntesis depende de la concentración de picocrocinas y de ésteres de crocetas. Debido a la poca solubilidad en agua del safranal, en los extractos acuosos son los ésteres de crocetina y la picrocrocina los compuestos más destacables. Además, en los extractos acuosos se encuentran flavonoides del grupo de los kaempferoles que son interesantes por su posible contribución a las propiedades y atributos del azafrán especia, a pesar de encontrarse en el azafrán en menores proporciones que el resto de los compuestos mencionados.

Las sustancias responsables del color que tiene y que proporciona el azafrán especia a soluciones acuosas pertenecen al grupo de los pigmentos carotenoides. En los extractos acuosos de azafrán se encuentra una mezcla de diferentes ésteres glicosilados del ácido 8,8'-diapo- Ψ,Ψ' -carotenedioico, denominado crocetina (*Figura 1*). Los azúcares que esterifican los extremos de la crocetina son glucosa, gentiobiosa

y neapolitanosa. A diferencia de la mayoría de los carotenoides, estos ésteres tienen la particularidad de ser hidrosolubles y generar una gama de tonos amarillos anaranjados en función de la concentración. Se les conoce también con el nombre de crocinas.

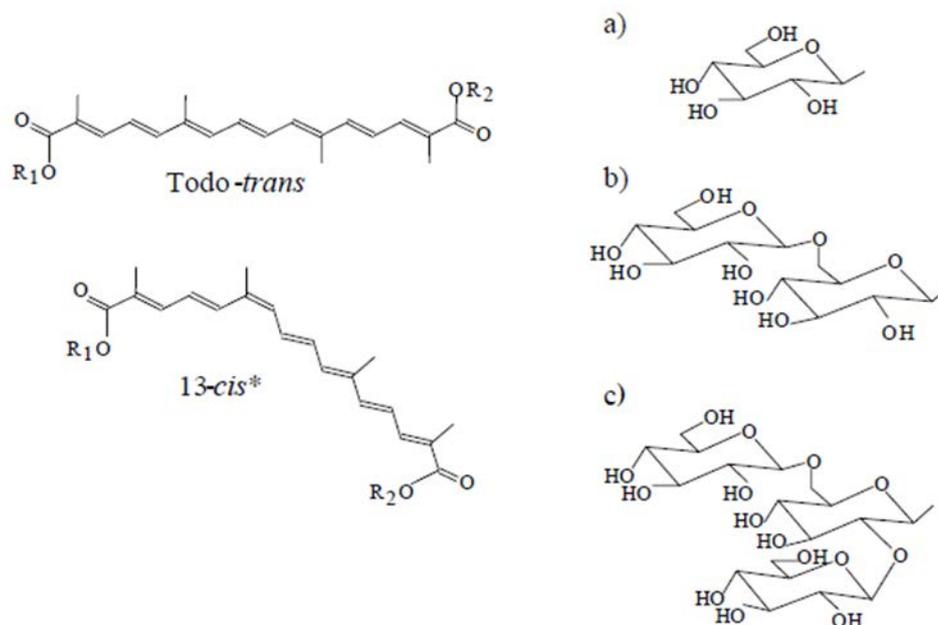


Figura 1. Conformación química de las crocetas del azafrán especia (izquierda) y azúcares que esterifican los extremos de la crocetina; a) glucosa, b) gentiobiosa y c) neapolitanosa.

Los ésteres de crocetina o crocinas son los responsables del poder colorante del azafrán que se define como el valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 440 nm para los extractos acuosos de la especia. Son numerosos los trabajos sobre el color del azafrán y los ésteres de crocetina centrados en desarrollar métodos analíticos basados en espectrofotometría [4] y HPLC [5] para separar, identificar y/o cuantificar estos carotenoides y proponer su estructura.

El problema de la adulteración ha estado históricamente presente en el azafrán, pues es y ha sido una de las especias más valoradas en el mercado mundial, alcanzando en muchas épocas precios realmente altos. La mayoría de las prácticas fraudulentas aplicadas en la producción y la comercialización del azafrán se centran en la ganancia económica y la evasión de la legislación que regula los sistemas de control de calidad (Tabla 1).

La adulteración mediante adición de colorantes artificiales tiene como objetivo imitar la apariencia del producto auténtico y/o aumentar el poder de coloración del extracto acuoso, que se utiliza para satisfacer las especificaciones comerciales. Sin embargo, puede tener un impacto toxicológico serio para la salud pública dependiendo del adulterante utilizado y la cantidad añadida en exceso; es el caso del E-102, cuya inclusión en un preparado obliga a notificarse en el etiquetado del producto por estar demostrado que causa hiperactividad en niños.

Tabla 1. Formas de adulteración del azafrán.

A	<ul style="list-style-type: none"> • Sin adición de sustancias extrañas: -Mezcla con azafrán extractado o viejo.
B [6]	<ul style="list-style-type: none"> • Adición de otras partes de la planta de azafrán: <ul style="list-style-type: none"> - Adicción de estambres o del perigonio cortado en tiras y teñido.
C	<ul style="list-style-type: none"> • Adición de sustancias que aumentan la masa: <ul style="list-style-type: none"> - Incremento de la humedad - Impregnación con jarabes, miel o glicerina • Adición a los jarabes anteriores de sulfato de bario, sulfato de sodio, sulfato de calcio, carbonato de calcio, hidróxido de potasio, nitrato de potasio, tartrato doble de potasio y sodio, borato de sodio, lactosa, almidón o glucosa.
D [7]	<ul style="list-style-type: none"> • Adición de partes de otras plantas: <ul style="list-style-type: none"> - Flores de <i>Carthamus tinctorius</i>, <i>Calendula officinalis</i>. - Estigmas de otras especies de <i>Crocus</i>, generalmente más cortos y sin propiedades tintóreas (<i>Crocus vernus</i>, <i>Crocus speciosus</i>, etc.). - Flores de <i>Papaver rhoeas</i>, <i>Punica granatum</i>, <i>Arnica montana</i> y <i>Scolimus hispanicus</i> cortadas en tiras. - Estambres de algunas especies de clavel - Pimiento rojo molido - Plantas herbáceas cortadas en trozos y coloreadas con un colorante azoico. - Raicillas de <i>Allium porrum</i>. - Cúrcuma
E	<ul style="list-style-type: none"> • Adición de sustancias animales: -Fibras de carne salada y desecada.
F	<ul style="list-style-type: none"> • Adición de productos artificiales: -Hilos de gelatina coloreados.
G	<ul style="list-style-type: none"> • Adición de colorantes orgánicos: <ul style="list-style-type: none"> - Amarillo de martins, tropeolina, fucsina, ácido pícrico, tartracina, eritrosina, ponceau 4R, azorrubina, amarillo anaranjado, etc.

En el estudio de colorantes artificiales como adulterantes del azafrán se han utilizado diversas técnicas, entre ellas, cromatografía líquida con distintos sistemas de detección [8-11]. Sin embargo, la bibliografía referida a este tipo de estudios mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-visible es más escasa [12,13].

Este trabajo se presenta como una continuación de otro trabajo previo [14] en el que se abordó el estudio de colorantes artificiales en azafrán mediante espectrofotometría de absorción molecular y se concluyó que la señal de las crocinas interfería en las de los colorantes haciendo imposible la detección de los mismos sin una etapa previa de separación o una etapa de eliminación de las crocinas del azafrán. En este sentido, en bibliografía se cita la hidrólisis ácida de los ésteres de crocetina como un método de precipitación de las mismas de manera que puedan ser eliminadas del medio favoreciendo la detección y cuantificación de los colorantes artificiales presentes en dicho medio [15,16]. Aunque existen numerosos métodos de análisis de los principales componentes del azafrán que utilizan HPLC y que han demostrado su capacidad de resolución, el problema es que, a diferencia de lo que ocurre con los espectrofotómetros, pocas empresas disponen de un cromatógrafo de líquidos.

4. FUNDAMENTO TEÓRICO

4.1. Diseño de superficie de respuesta: Diseño central compuesto

La metodología de diseño de experimentos permite optimizar un procedimiento de forma eficiente. En este contexto, los diseños de superficie de respuesta se utilizan para encontrar las condiciones experimentales que optimizan la variable respuesta, reduciendo, en la medida de lo posible, la experimentación necesaria [17].

Para aplicar esta metodología, se debe definir, en primer lugar, el dominio experimental de trabajo, dado por el espacio en el que varían las variables experimentales. Después, se plantea un modelo matemático que relacione la respuesta a optimizar con los factores o variables experimentales. Se suelen utilizar modelos de primer (lineal) y segundo (cuadrático) orden. Los primeros permiten estudiar los efectos lineales y de interacción entre factores sobre la respuesta, mientras que los segundos permiten estudiar, además, los efectos cuadráticos.

El modelo de segundo orden para tres factores experimentales viene dado por la ecuación (1). Este modelo sirve para caracterizar una superficie de respuesta y localizar la región de respuesta óptima (máximo o mínimo).

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1 X_2 + \beta_5 X_1 X_3 + \beta_6 X_2 X_3 + \beta_7 X_1^2 + \beta_8 X_2^2 + \beta_9 X_3^2 + \varepsilon \quad (1)$$

A continuación, una vez establecido el dominio experimental y propuesto un modelo, se selecciona el diseño experimental, es decir, el conjunto de condiciones experimentales en las que se obtendrá la respuesta. Estos puntos experimentales deben ser tales que se tengan las estimaciones de los coeficientes y de la respuesta con menor varianza.

Entre los diseños de superficie de respuesta, el diseño central compuesto está entre los más utilizados. Incluye los puntos de un diseño factorial en el que cada factor se encuentra a dos niveles, para estudiar el efecto de cada factor, así como el efecto de las interacciones. También consta de un punto central replicado para evaluar la existencia de curvatura y estimar la magnitud del error experimental. Y, por último, incluye los puntos axiales o estrella, que permiten ajustar la curvatura respecto a cada factor. La *Figura 2* muestra un diseño central compuesto rotable para tres factores, en el que todos los puntos, salvo el punto central, se encuentran dispuestos sobre la superficie de una esfera.

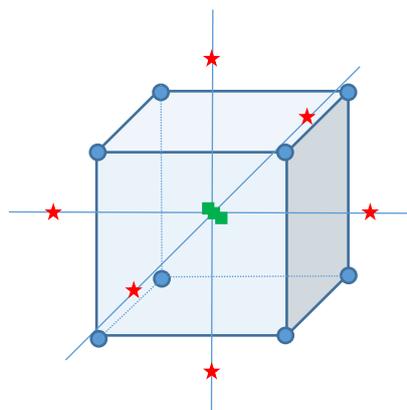


Figura 2. Puntos de un diseño central compuesto para tres factores (con tres réplicas en el punto central).

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 y establecer relaciones entre objetos y variables. Se dispone de múltiples variables (variables predictoras) en cada muestra, u objeto, de modo que las muestras se encuentran distribuidas en un espacio de tantas dimensiones como variables se hayan considerado. El análisis de componentes principales reduce la dimensionalidad de ese espacio, lo cual permite extraer su estructura propia [18].

Esta técnica se basa en construir las componentes principales como combinaciones lineales de las variables originales de la siguiente manera. La primera componente principal se construye en la dirección de mayor varianza de la nube de objetos; la segunda, en la siguiente dirección de máxima varianza no correlacionada con la anterior, y así sucesivamente.

Los coeficientes de la combinación lineal se denominan pesos e indican la participación de cada variable predictora en cada componente principal. Por otro lado, las coordenadas de cada muestra en el espacio vectorial definido por las componentes principales se conocen como puntuaciones. Para evitar el efecto de diferentes escalas de las variables predictoras, es habitual autoescalar previamente los datos, de modo que las variables tengan media 0 y desviación típica 1.

Las componentes principales se construyen en orden decreciente de varianza, por lo que se supone que las primeras componentes, relacionadas con las fuentes de varianza más importantes, serán las más útiles para describir la estructura interna de los datos. Las restantes, que no se podrían obviar, contendrían información no relevante. De este modo se reduce la dimensionalidad de los datos, lo que facilita la interpretación de la información que contienen.

4.3. Regresión de componentes principales

Cuando se desea relacionar una variable respuesta con un conjunto de variables predictoras registradas en cada muestra, es necesario recurrir a métodos de regresión multivariantes. Si éstas no son específicas, existen altas correlaciones o colinealidades entre ellas, o si se tienen más variables que muestras, no es posible utilizar la regresión lineal múltiple ya que los modelos ajustados tendrían estimaciones de los coeficientes y de la respuesta poco precisas. En estos casos, resultan de gran utilidad los modelos de regresión basados en variables latentes, modelos sesgados con alta capacidad de predicción, como la regresión de componentes principales [19].

Esta técnica de regresión se basa en establecer un modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados múltiple entre la variable respuesta y las puntuaciones de las componentes principales que se consideran significativas. De este modo, se solventan las limitaciones anteriores; por construcción, las componentes principales no están correlacionadas. Además, al considerar únicamente las componentes principales que explican más varianza, se dispone de una información de mayor calidad para establecer la relación entre las variables predictoras y la respuesta.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. Muestras, reactivos e instrumentos

El azafrán analizado es azafrán en polvo, de la marca Hacendado, cuyo fabricante es *Jesús Navarro S.A.* Se presenta envasado en bolsas de plástico de 0.1g. Se mantuvo a temperatura ambiente en la oscuridad hasta su análisis.

Los colorantes artificiales utilizados son de formato en polvo, y presentan las características indicadas en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Características de los colorantes artificiales 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%

De igual modo, se llevaron a estudio muestras de diferentes aditivos: Preparado para paellas y Sazonador para paellas; ambos de marca *Hacendado* y con diferentes proporciones de azafrán que el fabricante indica en el envase. El contenido en colorante E-102 no es especificado. La *Tabla 3* indica las características de los aditivos analizados en el estudio de adulteración.

Tabla 3. Características de los aditivos utilizados.

Aditivo	Contenido en azafrán (%)	Contenido en colorante E-102 (%)
Preparado de paella	1%	No especificado
Sazonador de paella	2.5%	No especificado

Los reactivos utilizados en este trabajo han sido H_2SO_4 1 M y NaOH 10 M de las casas comerciales *PROLABO* y *ERCROS*, respectivamente. Con ayuda de la disolución tampón pH 5.9 se ha podido fijar el pH durante toda la experimentación. Dicha disolución se ha preparado con ácido acético 2 M y acetato de sodio 2 M, ambos de *PROLABO*.

Se prepararon disoluciones madre de los colorantes artificiales E-102, E-110, E-122 y E-124 de concentraciones 62 mg/L, 68 mg/L, 56 mg/L y 48 mg/L, respectivamente; utilizadas para preparar las disoluciones de trabajo por dilución en agua de 5 mg/L cada una. Estas últimas, fueron utilizadas para adulterar varias muestras de azafrán previamente hidrolizado, con concentraciones conocidas de colorante artificial.

Se utilizó un espectrofotómetro UV-visible *CARY 50 Conc de Varian*, para la obtención de la medición de los espectros de absorción molecular de las muestras cada 5 nm en una franja de 200 a 800 nm. Las cubetas empleadas eran de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

La medida del pH se llevó a cabo con el pH-metro de la marca *HANNA INSTRUMENTS*, modelo *HI 9025*; calibrado antes de cada uso con disoluciones patrón de pH=4 y pH=7.

El tratamiento térmico se aplicó en una estufa eléctrica *SELECTA*, modelo 310.

En la etapa de extracción del azafrán, se utilizó un equipo de ultrasonidos termostatzado de la marca *ULTRASONIC CLEANER*.

El análisis de los datos del diseño de experimentos y de las componentes principales del estudio de adulteración se ha llevado a cabo con el programa informático *STATGRAPHICS Centurion XVII*.

5.2. Procedimiento experimental

Para llevar a cabo la extracción de las crocinas del azafrán, se pesaron 10 mg de azafrán en polvo y se añadieron 126 mL de agua destilada, sometiéndose la mezcla a un tratamiento con ultrasonidos durante 3.2 minutos y 50 °C de temperatura, que son las condiciones óptimas de extracción encontradas en estudios anteriores [14]. A continuación, se filtra para eliminar impurezas o partículas sólidas que puedan quedar, y se almacena en refrigeración y protegido de la luz.

La precipitación de crocetas por hidrólisis ácida se llevó a cabo sometiéndolo 20 mL de extracto acuoso de azafrán, a un pH ácido determinado con H_2SO_4 concentrando, y aplicando un tratamiento térmico en estufa durante un tiempo determinado. Finalizado ese tiempo, el extracto se enfrió hasta temperatura ambiente unos minutos y se filtró para eliminar las crocetas precipitadas, llevándose hasta un pH mayor, en torno a 4, con NaOH 10 M con el fin de estabilizar el proceso de hidrólisis.

Para llevar a cabo el estudio de adulteración con colorantes artificiales, se ajustó el pH de 20 mL de extracto acuoso de azafrán a 1.7 y se sometió a tratamiento térmico en estufa a 30 °C de temperatura durante un tiempo de 5 minutos, siendo las condiciones óptimas obtenidas en el diseño de experimentos para la precipitación de crocetas por hidrólisis ácida. Al cabo de este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente el extracto acuoso de azafrán hidrolizado y se filtró. A 15 mL de extracto acuoso hidrolizado se añadieron diferentes volúmenes de disoluciones de trabajo de 5 mg/L de cada colorante, con el fin de obtener extracto con distinto grado de adulteración. Al matraz se añadieron también 5 mL de tampón pH 5.9 completando hasta 25 mL con agua destilada.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estudios previos de hidrólisis ácida de crocinas

En el estudio de la adulteración de azafrán con colorantes artificiales por espectrofotometría de absorción molecular, la señal correspondiente a las crocinas del azafrán solapaba completamente la de los colorantes [14]. Por ello se quiere estudiar el procedimiento de precipitación de crocetas del azafrán por hidrólisis ácida como una alternativa a la eliminación de las mismas.

Con objeto de comprobar cómo influye este procedimiento en la señal de los colorantes artificiales estudiados en este trabajo, se desarrollan una serie de estudios previos sometiéndolo a los extractos de dichos colorantes al proceso de hidrólisis ácida descrito en el apartado *Procedimiento experimental*. Para ello, se toman alícuotas de

20 mL de extracto acuoso de azafrán y de la disolución de trabajo de los colorantes artificiales, excepto para el E-122 que se utilizó una alícuota de 0.5 mg/L ya que la técnica es más sensible para este colorante [14]; se reduce el pH hasta 0.3 con H_2SO_4 concentrado y se someten a un tratamiento térmico en estufa a 60 °C durante 10 minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente, se filtra el extracto y se eleva a pH 4 con NaOH 10 M. A continuación, se toman 15 mL de extracto acuoso hidrolizado, se tampona con 10 mL de tampón pH 5.9 enrasándose a un matraz de 50 mL con agua destilada, y se obtiene el espectro de absorción entre 300 y 650 nm.

En la *Figura 3* se muestran los espectros de absorción molecular individuales de los colorantes seleccionados, sometidos a hidrólisis ácida y sin hidrolizar. Se hace evidente que el colorante E-110 queda ligeramente afectado por la hidrólisis al observarse una disminución de su señal en 0.02 unidades de absorbancia, mientras que al resto de colorantes comerciales no parece afectarles el tratamiento ácido. El E-122 presenta absorbancias muy bajas debido a la propia dilución que tiene lugar en la preparación de la disolución de medida.

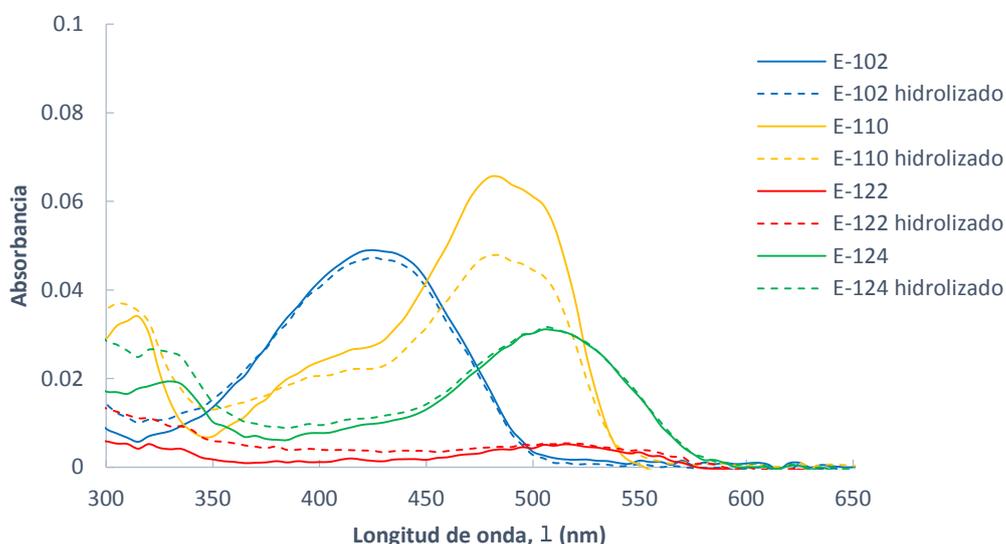


Figura 3. Espectros de absorción de los extractos acuosos (línea continua) y extractos hidrolizados (línea discontinua) de colorantes con concentraciones finales en la disolución medida de 1.5 mg/L para E-102, E-110 y E-124 y de 0.15 mg/L para E-122.

Tal y como muestra la *Figura 4*, se observa en el extracto acuoso de azafrán una banda de absorción con un máximo a 425 nm que se debe a la presencia de crocinas en dicho extracto. Sin embargo, cuando se somete a hidrólisis ácida esta banda desaparece completamente; lo que nos permite afirmar que la hidrólisis ácida elimina las crocinas del azafrán precipitando las crocetas liberadas en la hidrólisis.

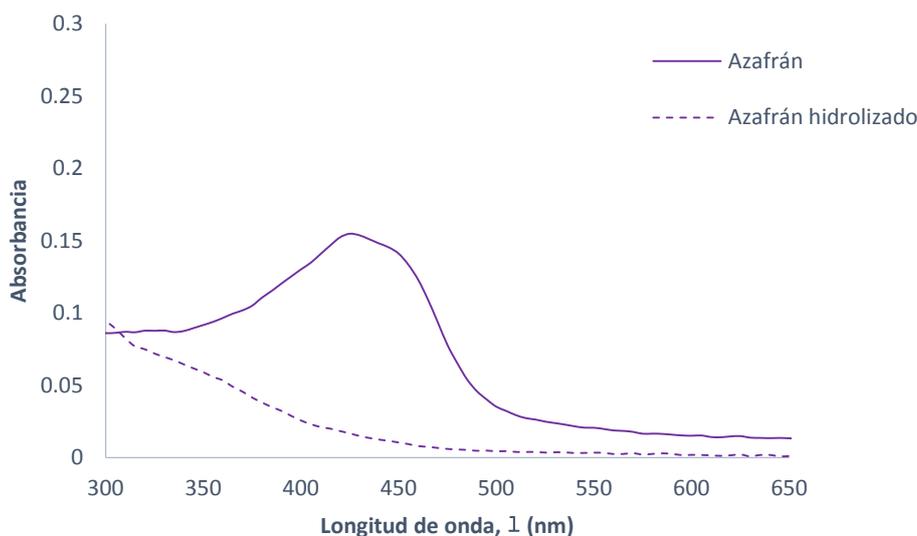


Figura 4. Espectros de absorción del extracto acuoso (línea continua) y extracto hidrolizado (línea discontinua) de azafrán.

Puesto que los colorantes comerciales no se ven afectados por el proceso de hidrólisis y el azafrán sí ve reducida considerablemente su concentración de crocinas, podemos concluir que el tratamiento de hidrólisis ácida puede ser útil para la detección de colorantes alimentarios en disoluciones acuosas de azafrán comercial.

6.2. Optimización de las condiciones de hidrólisis ácida

Para comprobar qué condiciones de pH, tiempo y temperatura dan lugar a una mayor precipitación de crocetas presentes en el azafrán, se utilizó un diseño de experimentos de superficie de respuesta central compuesto, cuyo plan experimental se muestra en la *Tabla 4*. En cada una de las experiencias del plan, 20 mL de extracto acuoso de azafrán se sometieron a hidrólisis ácida al pH, temperatura y durante el tiempo indicado. Finalmente se filtraron y se ajustó el pH a 4. A 15 mL del extracto hidrolizado se añadieron 5 mL de tampón acético-acetato pH 5.9 y se enrasaron a 25 mL con agua destilada.

De cada una de las muestras se realizó un barrido espectrofotométrico UV-visible y se utiliza la absorbancia a 425 nm, máximo de absorción del azafrán, como indicador de la concentración de crocinas en el medio. Esta absorbancia se toma como respuesta del diseño experimental (*Tabla 4*).

Con las respuestas obtenidas se ajusta el modelo que se muestra en la *ecuación (2)*, que tiene un coeficiente de determinación, R^2 , de 89.71%. Para validar este modelo, se realiza el análisis de la varianza que se recoge en la *Tabla 5*, que muestra el nivel de significación de los coeficientes asociados a cada factor experimental y sus interacciones, así como a los términos cuadráticos.

$$\begin{aligned}
 \text{Abs} = & 1.00 \cdot 10^{-2} - 1.39 \cdot 10^{-2} \cdot \text{pH} - 1.68 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Temperatura} + 2.69 \cdot 10^{-5} \\
 & \cdot \text{Tiempo} + 2.92 \cdot 10^{-3} \cdot \text{pH}^2 + 1.25 \cdot 10^{-4} \cdot \text{pH} \cdot \text{Temperatura} \\
 & + 6.97 \cdot 10^{-5} \cdot \text{pH} \cdot \text{Tiempo} - 4.26 \cdot 10^{-7} \cdot \text{Temperatura}^2 \\
 & + 8.38 \cdot 10^{-7} \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Tiempo} - 2.08 \cdot 10^{-7} \cdot \text{Tiempo}^2
 \end{aligned} \quad (2)$$

Tabla 4. Plan experimental y respuestas obtenidas en el diseño de experimentos.

Experiencia	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Respuesta
1	1	30	20	0.0047
2	1.53	42	10	0.0032
3	0.47	42	10	0.0052
4	1.53	42	30	0.0045
5	0.47	42	30	0.0056
6	1	60	5	0.0051
7	1	60	20	0.0071
8	1	60	20	0.0055
9	1.89	60	20	0.0097
10	1	60	20	0.0054
11	0.11	60	20	0.0080
12	1	60	35	0.0073
13	0.47	78	10	0.0061
14	1.53	78	10	0.0083
15	1.53	78	30	0.0108
16	0.47	78	30	0.0066
17	1	90	20	0.0076

Para evaluar la significación de los coeficientes del modelo se aplica un test de hipótesis con un nivel de confianza del 95%; si el nivel de significación (p-valor) es mayor de 0.05 no existen evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula y, por tanto, se acepta; si es menor de 0.05 se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa (H_0 : el coeficiente no es significativo; H_a : el coeficiente sí es significativo). La tabla del ANOVA (Tabla 5) muestra que únicamente es significativo, a ese nivel de confianza, el coeficiente asociado a la temperatura.

Por otro lado, se evalúa la existencia de fallo de ajuste con el test de hipótesis correspondiente (H_0 : no existe fallo de ajuste y por tanto, el modelo es adecuado; H_a : existe fallo de ajuste y el modelo no es adecuado). Como el nivel de significación (p-valor) es mayor de 0.05, no se puede rechazar la hipótesis nula y por tanto se concluye que no hay fallo de ajuste.

Tabla 5. Análisis de la varianza del modelo ajustado.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Media de cuadrados	F	p-valor
A:pH	2.60E-06	1	2.60E-06	2.9	0.2333
B:Temperatura	2.38E-05	1	2.38E-05	26.1	0.0363
C:Tiempo	5.07E-06	1	5.07E-06	5.6	0.1426
AA	7.79E-06	1	7.79E-06	8.5	0.0998
AB	1.13E-05	1	1.13E-05	12.4	0.0719
AC	1.09E-06	1	1.09E-06	1.2	0.3882
BB	2.16E-02	1	2.16E-02	0.2	0.6749
BC	1.82E-02	1	1.82E-02	0.2	0.6989
CC	3.51E-02	1	3.51E-02	0.4	0.5981
Fallo de ajuste	4.44E+04	5	8.88E-03	1.0	0.5770
Error puro	1.82E-06	2	9.12E-02		
Total (corr.)	6.09E-05	16			

Los residuos estudentizados se analizan para detectar posibles puntos anómalos del diseño. Se comprueba que, en valor absoluto, ninguno de ellos supera el valor de 3; por tanto, no existen puntos anómalos en el modelo. Se comprueba, además, que siguen una distribución normal, hipótesis previa del ajuste por mínimos cuadrados. Por todo ello, se considera que el modelo es válido.

Como el objetivo de este procedimiento es eliminar las crocetas, cuya señal puede interferir con la de los colorantes, la optimización de la respuesta implica encontrar el valor mínimo de la absorbancia que asegure la ausencia de crocetas en la disolución medida. Para ello se recurre a las gráficas de superficie de respuesta y curvas de nivel (*Figuras 5 (a) y 5 (b)*).

Como se tienen tres factores experimentales no es posible representarlos gráficamente junto a la respuesta, por ello se fija el factor tiempo de calentamiento, 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 5 minutos, que es el tiempo de tratamiento térmico más bajo dentro del dominio experimental seleccionado.

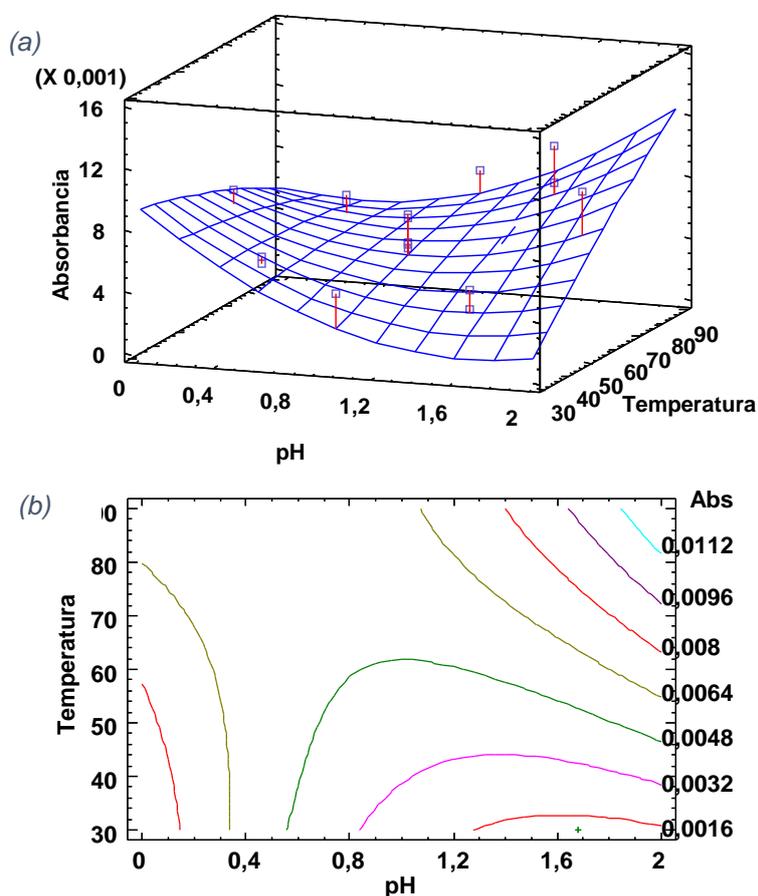


Figura 5. (a) Superficie de respuesta y (b) curvas de nivel del modelo ajustado para tiempo = 5 min.

En la superficie de respuesta de la *Figura 5 (a)* se observa que la absorbancia de las crocetas aumenta hacia la frontera del dominio experimental, en dos zonas de la región experimental, a valores altos de pH y temperatura, y a valores bajos de estas mismas variables. Como lo que se busca es minimizar la respuesta, o lo que es lo mismo, comprobar que no existen crocetas en el medio, este mínimo se observa claramente en las curvas de nivel (*Figura 5 (b)*), localizado a valores altos de pH y

bajos de temperatura. Concretamente, se consideran valores óptimos del tratamiento de hidrólisis ácida de las crocinas pH 1.7, temperatura 30 °C y tiempo 5 minutos.

6.3. Estudio de adulteración de azafrán con colorantes artificiales

Estudio de adulteración 1

En el estudio de adulteración del azafrán con colorantes sintéticos solubles en agua, se eligieron los colorantes E-102, E-110, E-122 y E-124, cuya combinación da lugar a coloraciones similares a la coloración del azafrán comercial.

Según el Reglamento 1129/2011 [20], los cuatro aditivos utilizados en este trabajo se clasifican dentro del Grupo 3, definidos como Colorantes con límites máximos de utilización en alimentos. Dentro de la categoría de alimentos Condimentos y aderezos, este tipo de colorantes tienen como límite máximo combinado legal 500 mg/kg de producto. Con el objetivo de abarcar distintas posibilidades de adulteración se tomaron concentraciones de estos colorantes por debajo y por encima de su límite legal.

Para llevar a cabo el análisis, se preparan una serie de muestras en las que se adicionan distintas cantidades de los colorantes estudiados como adulterantes en el extracto de azafrán hidrolizado. La *Tabla 6* presenta las diferentes mezclas y concentraciones finales de dichos colorantes. Las muestras de calibrado 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 500, 2000, 2500 y 4000 mg colorante/kg azafrán, respectivamente; que se traducen en porcentajes de colorante entre 0 y 0.4%. De esta manera, se tienen cinco niveles de concentración distintos para cada uno de los colorantes calibrados que permitirán predecir diferentes concentraciones intermedias.

El conjunto de calibrado consta de catorce mezclas preparadas a partir de un volumen fijo de extracto de azafrán hidrolizado y distintos volúmenes de colorantes para alcanzar las concentraciones establecidas; y tres muestras de extracto de azafrán sin adulterar, codificadas como 0000. A su vez, se preparó un conjunto test que permitiese evaluar la capacidad predictiva del modelo constituido por seis muestras problema de azafrán adulterado.

Las muestras del conjunto test aparecen codificados por una letra (A-F). Está constituido por una mezcla de azafrán mono-adulterado, cuatro mezclas con adulteración binaria y una mezcla con adulteración ternaria. El colorante E-102 es el que se repite con más frecuencia por ser el más utilizado en alimentos.

También se dispone de tres réplicas de muestras de condimentos y/o aderezos comerciales que contienen un porcentaje bajo de azafrán (menos del 2.5%), colorante E-102 y otros ingredientes mayoritarios.

La preparación de estas muestras se ha indicado en el *Procedimiento experimental*, y de cada una de ellas se registra el espectro de absorción UV-visible entre 300 y 650 nm.

Tabla 6. Concentraciones y mezclas de colorantes en el conjunto de calibrado y el conjunto test del Estudio de adulteración 1.

	Códigos	E-102 (mg/L)	E-110 (mg/L)	E-122 (mg/L)	E-124 (mg/L)
Conjunto de calibrado	4000	0.1904	0.0000	0.0000	0.0000
	0400	0.0000	0.1905	0.0000	0.0000
	0040	0.0000	0.0000	0.1905	0.0000
	0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.1905
	2200	0.0952	0.0952	0.0000	0.0000
	2020	0.0952	0.0000	0.0952	0.0000
	2002	0.0952	0.0000	0.0000	0.0952
	0220	0.0000	0.0952	0.0952	0.0000
	0202	0.0000	0.0952	0.0000	0.0952
	0022	0.0000	0.0000	0.0952	0.0952
	3111	0.1190	0.0238	0.0238	0.0238
	1311	0.0238	0.1190	0.0238	0.0238
	1131	0.0238	0.0238	0.1190	0.0238
	1113	0.0238	0.0238	0.0238	0.1190
	0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Conjunto Test	A	0.0143	0.0000	0.0000	0.0000
	B	0.0119	0.0119	0.0000	0.0000
	C	0.0238	0.0476	0.0000	0.0000
	D	0.0238	0.0000	0.0952	0.0000
	E	0.0714	0.0000	0.0000	0.0714
	F	0.0238	0.0238	0.0000	0.0238

Para llevar a cabo el análisis de componentes principales se utiliza una matriz de 17 objetos (muestras del conjunto de calibrado) y 71 variables (absorbancias). Inicialmente se realiza el análisis con los datos estandarizados, y se obtiene que con seis componentes se logra explicar el 99.1% de la varianza. Mientras que si se analizan las variables sin estandarizar, con cuatro componentes se explica un 99.9% de la varianza. De hecho, tal y como se observa en la *Tabla 7*, con tan solo dos componentes ya se alcanza un 99.5% de la varianza explicada.

Teniendo en cuenta que con los datos estandarizados son necesarias más componentes para explicar el mismo porcentaje de varianza, se decide utilizar los datos sin estandarizar en los análisis de componentes principales siguientes.

Tabla 7. Análisis de componentes principales con los datos originales del Estudio de adulteración 1.

Componente principal	Autovalor	Varianza explicada (%)	Varianza Acumulada (%)
1	7.76E-02	96.9	96.9
2	2.01E-03	2.5	99.5
3	2.35E-04	0.3	99.8
4	1.28E-04	0.2	99.9
5	4.16E-05	0.1	100.0

En la *Figura 6* se observan las puntuaciones de las muestras en la primera y segunda componentes principales. Las muestras de calibrado se dividen claramente en dos grupos respecto a la primera componente: en el grupo de la derecha quedan situadas las muestras sin colorantes y la muestra 0220; mientras que en el grupo de la izquierda se agrupan las muestras adulteradas. Parece ser que la primera componente principal explica la presencia de colorantes en muestras de azafrán porque las muestras adulteradas adquieren menores puntuaciones y las muestras no adulteradas tienen mayores puntuaciones, presentándose así una pauta en función de la presencia de adulterantes.

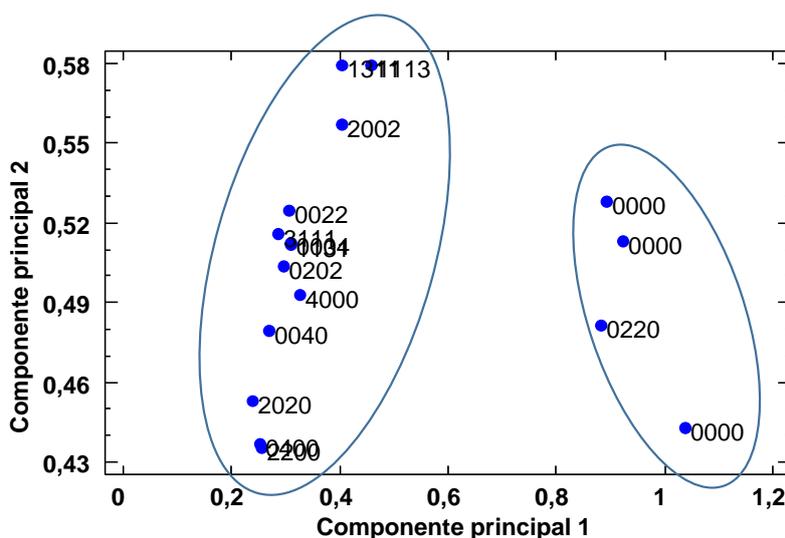


Figura 6. Puntuaciones en las dos primeras componentes principales del Estudio de adulteración 1.

La muestra 0220 aparece en la zona de muestras no adulteradas, con lo cual se sospecha que hubo un error en su preparación y realmente no se adulteró con colorantes. Revisando el espectro de absorción de las muestras del conjunto de calibrado (*Figura 7*), se comprueba que la absorbancia de la muestra 0220 es similar a la de las muestras 0000 y ésta, a su vez, muy diferente del resto; por lo que se concluye que es un patrón anómalo.

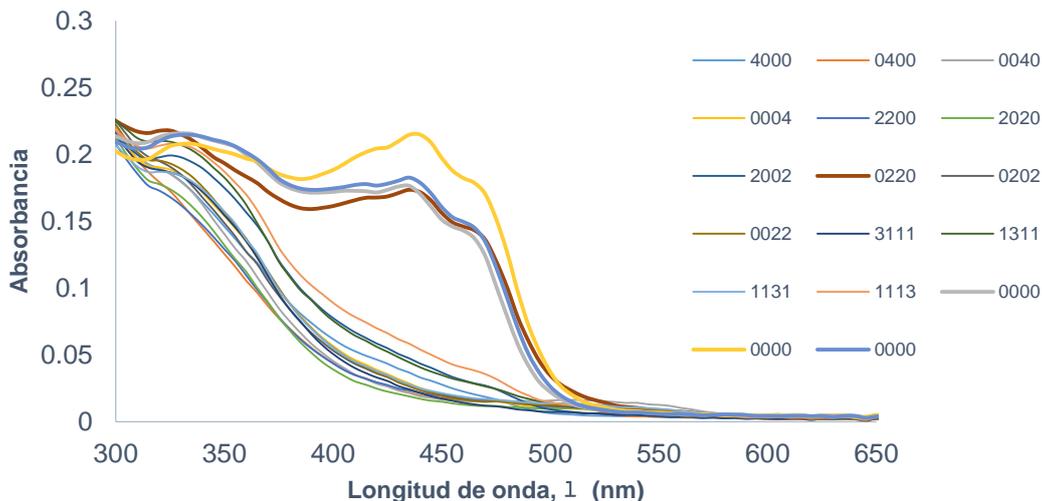


Figura 7. Espectros de absorción del conjunto de calibrado del Estudio de adulteración 1.

Como el objetivo es obtener un modelo relacionado con las concentraciones de los distintos colorantes adicionados a muestras de azafrán, se eliminaron del conjunto de calibrado la muestra 0220 y las muestras de azafrán hidrolizado sin adulterar (codificadas con 0000) y se construyó un nuevo modelo de componentes principales con las muestras restantes. Con este modelo son necesarias cuatro componentes principales para explicar el 99.6% de varianza, acumulando las dos primeras un porcentaje de varianza explicada del 96.1%.

La representación de las puntuaciones de las muestras de calibrado en estas dos nuevas componentes principales no muestra ninguna pauta en cuanto a la distribución de las muestras según su contenido en los distintos colorantes (Figura 8). Por tanto, no es posible relacionar la variabilidad de los patrones de calibrado recogida en las dos primeras componentes, con la concentración de los colorantes.

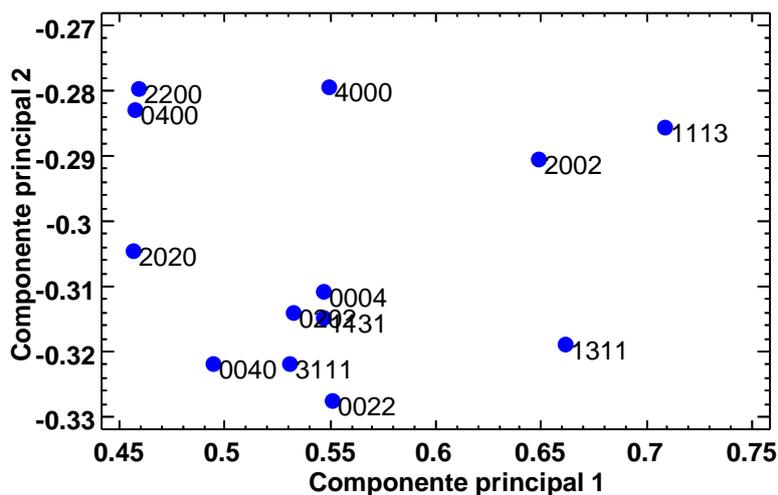


Figura 8. Puntuaciones de las dos primeras componentes principales del Estudio de adulteración 1 eliminando las muestras de azafrán sin adulterar y la muestra 0220.

Estudio de adulteración 2

Teniendo en cuenta que no es posible relacionar la variabilidad en las muestras de calibrado con las diferencias de concentración de los colorantes, se sospecha que las causas pueden ser, por un lado, la baja concentración de los adulterantes; y por otro lado, un posible efecto matriz. Por tanto, se lleva a cabo un segundo estudio de adulteración constituido por una primera fase del análisis en la que se ha aumentado la concentración de los colorantes en muestras de azafrán hidrolizado, y una segunda fase basada en el calibrado de los colorantes en agua destilada.

Para comprobar que la concentración baja no es la causa se lleva a cabo un nuevo estudio de adulteración análogo al anterior, donde se aumentó proporcionalmente la concentración de cada uno de los colorantes adicionados; con excepción de la muestra 0220 que al ser anómala se eliminó. También se eliminaron los extractos de azafrán no adulterados.

Sobre alicuotas de 15 mL de las muestras del Estudio de adulteración 1 se añadió un volumen determinado de colorante, enrasando a 25 mL con agua destilada obteniéndose las concentraciones que se muestran en la *Tabla 8*. Finalmente, se obtiene el espectro de absorción de las muestras filtradas previamente a través de un filtro de nylon de 45 µm.

Tabla 8. Concentraciones de las muestras del conjunto de calibrado y el conjunto test en el Estudio de adulteración 2.

	Códigos	E-102 (mg/L)	E-110 (mg/L)	E-122 (mg/L)	E-124 (mg/L)
Conjunto de calibrado	4000	0.4950	0.0000	0.0000	0.0000
	0400	0.0000	0.4950	0.0000	0.0000
	0040	0.0000	0.0000	0.4950	0.0000
	0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.4950
	2200	0.2475	0.2475	0.0000	0.0000
	2020	0.2475	0.0000	0.2475	0.0000
	2002	0.2475	0.0000	0.0000	0.2475
	0220	0.0000	0.2475	0.2475	0.0000
	0202	0.0000	0.2475	0.0000	0.2475
	0022	0.0000	0.0000	0.2475	0.2475
	3111	0.3094	0.0619	0.0619	0.0619
	1311	0.0619	0.3094	0.0619	0.0619
	1131	0.0619	0.0619	0.3094	0.0619
1113	0.0619	0.0619	0.0619	0.3094	
Conjunto Test	A	0.0369	0.0000	0.0000	0.0000
	B	0.0312	0.0312	0.0000	0.0000
	C	0.0619	0.1238	0.0000	0.0000
	D	0.0619	0.0000	0.2475	0.0000
	E	0.1856	0.0000	0.0000	0.1856
	F	0.0619	0.0619	0.0000	0.0619

El análisis de componentes principales del nuevo estudio con las muestras del conjunto de calibrado de la *Tabla 8* (excepto la muestra 0220) indica que con tres componentes se explica un 99.2% de la variabilidad (*Tabla 9*). Sin embargo, la representación de las puntuaciones de las muestras de calibrado en las dos primeras componentes sigue sin poder relacionarse con la presencia de los colorantes de forma individual o conjunta (*Figura 9*).

Tabla 9. Análisis de componentes principales en el Estudio de adulteración 2.

Componente principal	Autovalor	Varianza explicada (%)	Varianza Acumulada (%)
1	1.78E-03	80.7	80.7
2	3.13E-04	14.2	94.9
3	9.50E-05	4.3	99.2
4	1.26E-05	0.6	99.8

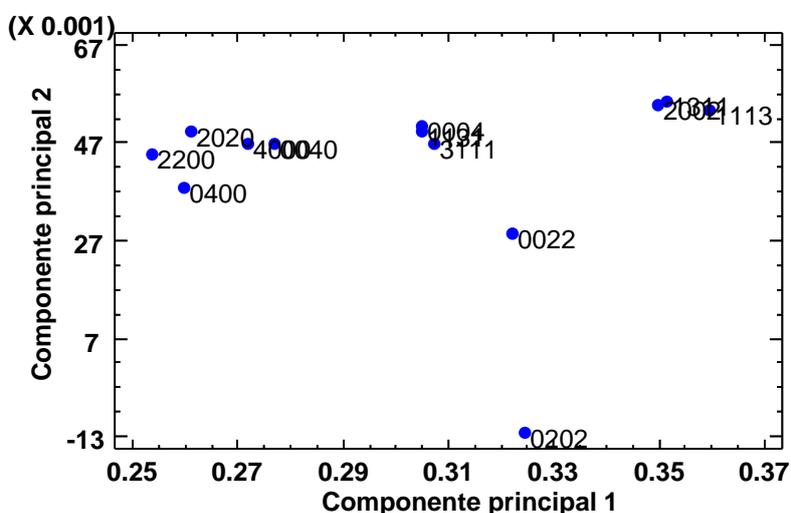


Figura 9. Puntuaciones en las dos primeras componentes principales del Estudio de adulteración 2.

Con el objeto de estudiar la segunda hipótesis planteada, la existencia del efecto matriz comentado en líneas anteriores, se procede al estudio de los colorantes directamente en agua. Para ello, se preparan los catorce patrones de calibrado con las mismas concentraciones de colorante indicadas en la *Tabla 8*, pero en disolución acuosa. No se consideró necesario tamponar porque el pH natural de los colorantes no es excesivamente ácido.

En este caso, hacen falta tres componentes principales para explicar un 99.6% de la varianza (*Tabla 10*).

Tabla 10. Análisis de componentes principales en el Estudio adulteración 2 en agua.

Componente principal	Autovalor	Varianza explicada (%)	Varianza Acumulada (%)
1	1.17E-03	77.4	77.4
2	1.90E-04	12.6	90.0
3	1.46E-04	9.7	99.6
4		0.2	99.9

Cuando se representan las puntuaciones en la primera y segunda componentes principales (*Figura 10*), se observa una distribución de las muestras relacionada con la presencia y concentración de los colorantes alimentarios estudiados. De forma que, las muestras que contienen una concentración más elevada de colorante (incluyen el índice 4 en su codificación) se sitúan en los vértices de un rombo. Las muestras que solo contienen los colorantes E-102 y E-122 (4000 y 0040) presentan valores bajo y alto respectivamente en la primera componente, lo que indica que dicha componente está relacionada con la concentración de éstos colorantes. Por otro lado, las muestras que contienen sólo los colorantes E-110 y E-124 (0400 y 0004) tienen valores alto y bajo, respectivamente, en la segunda componente. Por lo que esta componente está relacionada con dichos colorantes. De esta manera, son necesarias las dos primeras componentes para explicar la presencia de los cuatro colorantes. Esto se corrobora con el hecho de que las mezclas binarias (que contienen el dígito 2 en su codificación) quedan situadas en las aristas del rombo que unen los colorantes dos a dos.

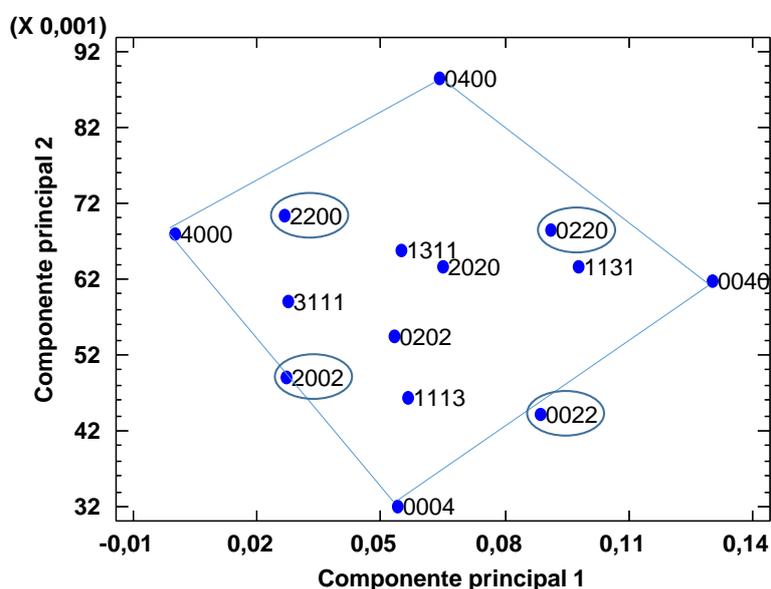


Figura 10. Puntuaciones en las dos primeras componentes principales del Estudio de adulteración 2 en agua.

Analizando la *Figura 11*, que muestra las puntuaciones en las componentes principales primera y tercera, se aprecia que las muestras con mayores concentraciones de los colorantes E-102 y E-122 (4000 Y 0040), adquieren mayores puntuaciones en la tercera componente principal; mientras que las muestras con mayores concentraciones del E-110 y E-124 (0400 y 0004) tienen puntuaciones menores. Por tanto, en base a estos resultados podemos decir que la tercera componente principal guarda relación con la concentración de todos los colorantes.

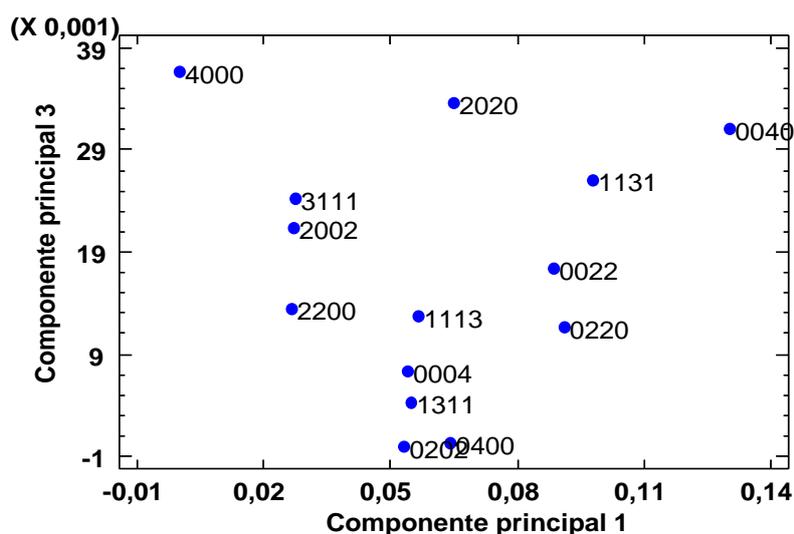


Figura 11. Puntuaciones en la primera y tercera componente principal del Estudio de adulteración 2 en agua.

La relación encontrada entre las componentes principales y la presencia de colorantes en agua, que no fue posible demostrar en los estudios llevados a cabo con la matriz de azafrán hidrolizado, evidencia la posible existencia de un efecto matriz. Este efecto puede deberse a que en el extracto hidrolizado podemos encontrar tanto componentes del azafrán no susceptibles de hidrólisis, como productos derivados de la misma que podrían anular los grupos cromóforos de los colorantes añadidos, y provocar en consecuencia una atenuación de la absorbancia de las mezclas de azafrán hidrolizado y adulterantes.

6.4. Regresión de componentes principales

Con el fin de cuantificar la cantidad de E-102 en las muestras comerciales de sazónador y preparado para paellas que lo contienen, se lleva a cabo una regresión de componentes principales. Para ello se tienen en cuenta las puntuaciones calculadas en el análisis de componentes principales para las muestras del conjunto de calibrado considerado en el *Estudio de adulteración 2* y se ajusta un modelo de regresión lineal múltiple para cada colorante, tanto en matriz de azafrán hidrolizado como en agua.

Los modelos de regresión obtenidos con el conjunto de calibrado de la *Tabla 8* en matriz de azafrán hidrolizado no son válidos ya que explican por debajo del 67% de la variabilidad en la respuesta. Sin embargo, los modelos construidos con muestras en los mismos niveles de concentración que en el caso anterior pero en matriz acuosa tienen coeficientes de determinación por encima de 98.02%. El número de componentes principales en cada modelo se elige mediante el método de validación cruzada *leave-one-out*, en el que la concentración de cada muestra se ha predicho una vez con un modelo construido con las muestras restantes. Las mejores predicciones indican el número de componentes óptimo para cada regresión. Para analizar la posible presencia de muestras anómalas se realiza un estudio de los índices Q y T^2 de Hotelling de los objetos, a un nivel de confianza del 99%. 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 (T^2 de Hotelling alto).

Por tanto, esta muestra debe ser eliminada porque hay indicios para asegurar que es anómala respecto del resto.

En la *Figura 12* se puede observar que ninguna de las muestras del conjunto de calibrado (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. La muestra D del conjunto test (mostrada en la figura como 18) presenta un valor por encima del umbral en el índice Q y las muestras de los aditivos problema (muestras 21-26) son muestras anómalas ya que superan los valores umbral para ambos índices. Este comportamiento es similar en todos los modelos de regresión y puede ser debido, en el caso de la muestra D, a una mala preparación de la muestra; y en el caso de los aditivos, a que en su composición se encuentran otros compuestos que no están incluidos en la matriz del conjunto de calibrado y, por tanto, su contribución a la señal analítica no está siendo modelada además de la contribución de los productos de hidrólisis ya que el extracto de estos aditivos fue sometido a ese tratamiento.

Para comprobar la capacidad predictiva de estos modelos se determinó, con ellos, la concentración de los colorantes en las muestras test y se calculó el error en predicción, RMSEP (*ecuación (3)*).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c_i - c)^2}{n}} \quad (3)$$

Donde c_i es la concentración predicha con el modelo de calibración propuesto, c es la concentración real de las muestras del conjunto test.

El número de componentes principales, el coeficiente de determinación y RMSEP de los modelos para cada colorante, se muestran en la *Tabla 11* y ponen de manifiesto la validez de los mismos.

Tabla 11. Modelos obtenidos para cada colorante.

	CP	R²	RMSEP
E-102	5	99.93%	0.0028
E-110	5	99.91%	0.0067
E-122	5	99.82%	0.0044
E-124	5	98.02%	0.0056

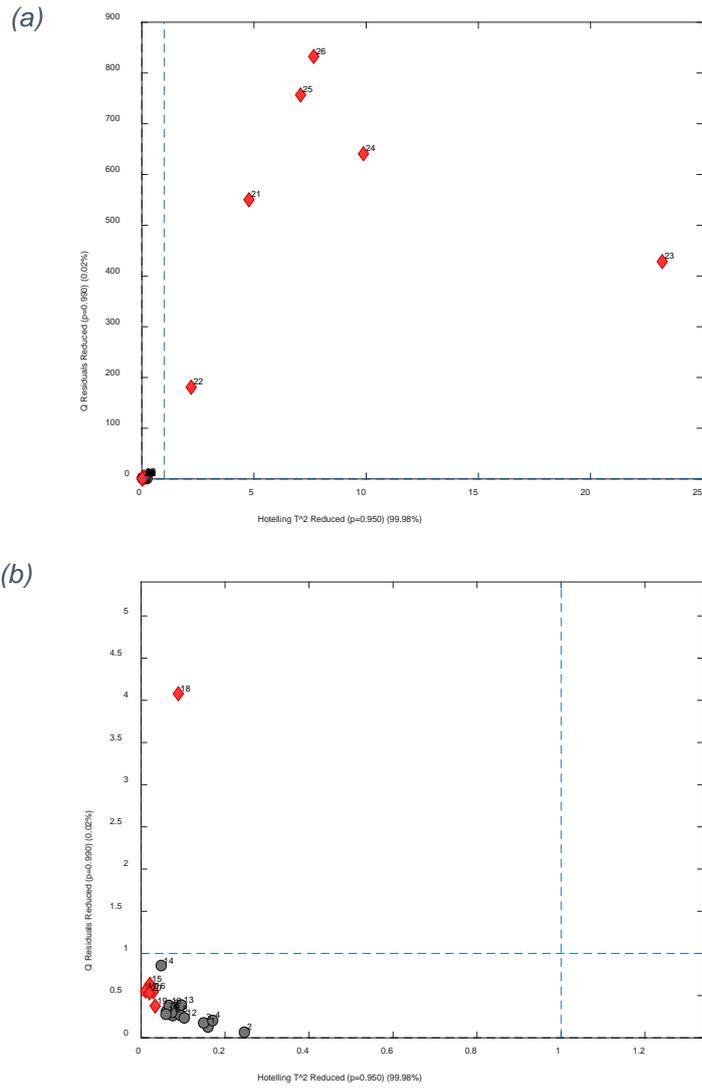


Figura 12. (a) Índices Q y T^2 de Hotelling, con los valores umbral a un nivel de significación del 99%, obtenidos en la regresión de componentes principales con cinco componentes para el E-102. (b) Ampliación de la parte inferior del gráfico de la figura (a). Círculos grises: Conjunto de calibrado. Rombos rojos: conjunto test.

7. CONCLUSIONES

El efecto del tratamiento ácido a una temperatura alta del extracto acuoso de azafrán en su espectro de absorción molecular en el visible conlleva la desaparición de la banda espectral correspondiente a las crocinas. Se puede concluir, por tanto, que la hidrólisis de las crocinas del azafrán permite la eliminación de las crocetas del medio por precipitación y posterior filtración de las mismas.

El mismo tratamiento ácido llevado a cabo sobre una disolución acuosa de cada uno de los colorantes E-102, E-122 y E-124 no causa alteración en su espectro de absorción en el visible, salvo para el colorante E-110 que ve ligeramente disminuida la absorbancia de su banda.

Mediante un diseño central compuesto se ajusta un modelo cuadrático que permite establecer que la temperatura es el único factor significativo en la eliminación de crocetas del azafrán por hidrólisis ácida, mientras que el pH y el tiempo de hidrólisis no son significativos. Las condiciones óptimas para la eliminación de las crocetas de 20 mL de extracto de azafrán son someterle a una temperatura de 30 °C durante 5 minutos después de haber ajustado el pH a 1.7 con H₂SO₄ 1 M.

El análisis de componentes principales obtenidas a partir de muestras de extracto de azafrán hidrolizado y adulterado con los colorantes artificiales E-102, E-110, E-122 y E-124 permite diferenciar las muestras adulteradas con colorantes artificiales de las que no lo están. Sin embargo, dentro de las muestras adulteradas no es posible detectar qué colorante es el causante de la adulteración ni en qué cantidad ya que existe cierto efecto matriz que anula la señal espectrofotométrica de dichos colorantes. Este efecto matriz es independiente de la concentración de los colorantes en la muestra.

El análisis de componentes principales llevado a cabo sobre mezclas de los mismos colorantes en medio acuoso permite obtener modelos relacionados con la presencia y concentración de dichos colorantes de manera que pueden ser determinados mediante modelos de regresión multivariante válidos.

Muestras de sazonador y preparado para paellas no son compatibles con los modelos multivariantes ajustados ya que contienen otros ingredientes que también contribuyen al color y que no pueden ser modelados ya que han sido incluidos en este estudio.

La técnica analítica de espectrofotometría UV-visible combinada con técnicas multivariantes como componentes principales, puede ser una metodología rápida y de fácil manipulación para el cribado de muestras adulteradas de azafrán, teniendo en cuenta las especificaciones que marca la norma ISO/TS 3632-1 para la calidad del azafrán.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] *Programa conjunto sobre normas alimentarias de la FAO/OMS-Comisión del Códex Alimentarius 44ª Sesión CICG*, Ginebra, Suiza. Julio de 2017. *Informe de la 3ª sesión del Comité del Códex sobre especias y hierbas culinarias* Chennai, India. Febrero 2017. REP17/SCH-Apéndice IX.
- [2] AENOR. *Azafrán (Crocus Sativus Linnaeus). Métodos de análisis*. UNE-ISO 3632-2. Madrid: AENOR. 2011
- [3] AENOR. *Azafrán (Crocus Sativus Linnaeus). Especificaciones*. UNE-ISO 3632-1. Madrid: AENOR. 2012.
- [4] Assimiadis, MK, Tarantilis, PA, Polissiou, MG. *UV-vis, FT-Raman, and H-1 NMR spectroscopies of cis-trans carotenoids from saffron (Crocus sativus L.)*, Applied Spectroscopy, 52 (4), 519-522, 1998.
- [5] Carmona, M, Zalacain, A, Sanchez, AM, Novella, JL, Alonso, GL. *Crocetin esters, picrocrocín and its related compounds present in Crocus sativus stigmas and Gardenia jasminoides fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (3), 973-979, 2006.
- [6] Soffritti, G, Busconi, M, Sanchez, RA, Thiercelin, JM, Polissiou, M, Roldan, M, Fernandez, JA. *Genetic and Epigenetic Approaches for the Possible Detection of Adulteration and Auto-Adulteration in Saffron (Crocus sativus L.)*. Spice, Molecules, 21 (3), 343, (2016).
- [7] Sánchez, AM, Maggi, L, Carmona, M, Alonso, GL. *Authentication of Saffron Spice (Crocus sativus L.)*, Progress in Authentication of Food and Wine, chapter 22, pp 309–331, ACS Symposium Series, Vol. 1081, 2011.
- [8] Ordoudi, SA, Cagliani, LR, Melidou, D, Tsimidou, MZ, Consonni, R. *Uncovering a challenging case of adulterated commercial saffron*, Food Control, 81, 147-155, 2017.
- [9] Rajabi, M, Sabzalian, S, Barfi, B, Arghavani-Beydokhti, S, Asghari, A. *In-line micro-matrix solid-phase dispersion extraction for simultaneous separation and extraction of Sudan dyes in different spices*, Journal of Chromatography A, 1425, 42-50, 2015.
- [10] Carmona M, Carrión ME, Zalacain A, Alonso GL. *Comparison between TLC and HPLC methods to detect colorants in commercial saffron*, In: Proceedings of the 2nd International Congress on Pigments in Food Technology Lisbon Portugal 11–14 June pp 133–136, 2002.
- [11] Hajimahmoodi, M, Afsharimanesh, M, Moghaddam, G, Sadeghi, N, Oveisi, MR, Jannat, B, Pirhadi, E, Mazdeh, FZ, Kanan, H. *Determination of eight synthetic dyes in foodstuffs by green liquid chromatography*, Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 30 (5), 780-785, 2013.
- [12] Carmona, M, Carrion, ME, Zalacain, A, Alonso, GL. *Detection of adulterated saffron through UV-Vis spectral analysis*, Journal of Food Science and Technology-Mysore, 41 (4), 451-455, 2004.

- [13] Ordoudi, SA, Tsimidou, MZ. Editado por: Fernandez, JA, Abdullaev, F. *Detection of artificial red colorants in saffron using UV-vis spectrometry and tristimulus colorimetry*. Proceedings of the 1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology, Colección: Acta Horticulturae, Número: 650, Páginas: 331-338, 2004.
- [14] Goicoechea, M. *Optimización de la extracción de crocinas en azafrán. Estudio de la adulteración de azafrán con colorantes artificiales mediante técnicas multivariantes de análisis*. Trabajo Fin de Grado. Burgos: Universidad de Burgos, 2017. <http://hdl.handle.net/10259/4603>.
- [15] Zalacain, A, Blazquez, I, Diaz-Plaza, EM, Carmona, M, Alonso, GL. *Improved conditions to extract exogenous yellow water-soluble colorants added to Saffron avoiding crocetin esters interferences*. Editado por: Fernandez, JA; Abdullaev, F. Proceedings of the 1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology, Colección: Acta Horticulturae, Número: 650, Páginas: 307-311, 2004.
- [16] Zalacain, A, Ordoudi, SA, Blazquez, I, Diaz-Plaza, EM, Carmona, M, Tsimidou, MZ, Alonso, GL. *Screening method for the detection of artificial colours in saffron using derivative UV-Vis spectrometry after precipitation of crocetin*, Food Additives and Contaminants, 22 (7), 607-615, 2005.
- [17] Sarabia LA, Ortiz MC, *Response surface methodology*, En: Brown S.D., Tauler R., Walczak B. (Editores), Comprehensive Chemometrics, vol. 1. Amsterdam, 2009.
- [18] Massart, DL, Vandeginste, BGM, Buydens, LMC, Jong, S, de Smeyers-Verbeke, PJ. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Parte A, en Data Handling in Science and Technology. Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [19] Stone, M, Brooks, RJ. *Continuum Regression: Cross-Validated Sequentially Constructed Prediction Embracing Ordinary Least Squares, Partial Least Squares and Principal Components Regression*, J. Royal Stat. Soc. B, 52 (2): 237-269, 1990.
- [20] Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la Comisión por el que se modifica el Anexo II del Reglamento (UE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. DOUE 295 del 12/11/2011, 1-177.