



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



TESIS DOCTORAL

“Construcción de una base de datos de aceites de oliva virgen extra andaluces basada en técnicas de IR, RMN, Raman e IRMS”

Elena Sánchez López

Departamento de Química Orgánica

Facultad de Ciencias

Universidad de Córdoba

2014

TITULO: CONSTRUCCIÓN DE UNA BASE DE DATOS DE ACEITES DE OLIVA
VIRGEN EXTRA ANDALUCES BASADA EN TÉCNICAS DE IR, RMN,
RAMAN E IRMS

AUTOR: *Elena María Sánchez López*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Construcción de una base de datos de aceites de oliva virgen extra andaluces basada en técnicas de IR, RMN, Raman e IRMS

Los directores

D. Alberto Marinas Aramendía
Profesor Titular de Universidad
Universidad de Córdoba

D. Jose M^a Marinas Rubio
Catedrático de Universidad (Emérito)
Universidad de Córdoba

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

Fdo: Elena Sánchez López

Córdoba 1 de Septiembre de 2014



TÍTULO DE LA TESIS: “*Construcción de una base de datos de aceites de oliva virgen extra andaluces basada en técnicas de IR, RMN, Raman e IRMS*”

DOCTORANDO/A: Elena Sánchez López

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS
(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Como Directores de esta Tesis Doctoral consideramos que durante el desarrollo del trabajo, la doctoranda ha adquirido las habilidades y competencias necesarias para obtener el título de Doctor, y que el trabajo desarrollado constituye una aportación relevante en el campo de la trazabilidad del aceite de oliva, producto estrella en la Comunidad Andaluza. Estas afirmaciones se apoyan en los siguientes puntos:

1. La doctoranda ha superado con buen aprovechamiento los créditos correspondientes a la formación teórico-práctica de la parte formativa del Programa de Doctorado en Química Fina (Máster en Química Fina Avanzada).
2. La doctoranda ha adquirido una sólida formación en la gran variedad de técnicas instrumentales y metodologías que han sido utilizadas durante el desarrollo de la extensa labor experimental asociada a esta tesis.
3. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto la capacidad predictiva de las diferentes técnicas empleadas para estimar aspectos cuantitativos (ej. contenido en ácidos grasos) o cualitativos (variedad, campaña, zona geográfica) de aceites de oliva virgen extra andaluces, de gran importancia con vistas a proteger denominaciones de origen y evitar fraudes. Asimismo, se ha puesto de manifiesto la complementariedad de las técnicas.

4. Como resultado de la labor desarrollada, se han presentado 7 comunicaciones a congresos nacionales o internacionales y publicado tres artículos científicos en revistas incluidas en Journal Citation Reports:

- M. A. Aramendía, A. Marinas, J.M. Marinas, E. Sánchez, F.J. Urbano, C. Guillou, J.M. Moreno Rojas, M. Moalem y L. Rallo. *A Nuclear Magnetic Resonance (1H and ^{13}C) and isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}C$, δ^2H and $\delta^{18}O$) study of Andalusian olive oils*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 24 (2010) 1457–1466.
- M.I. Sánchez-Rodríguez, E. Sánchez-López, J.M. Caridad, A. Marinas, J.M. Marinas, F.J. Urbano. *New insights into evaluation of regression models through a decomposition of the prediction errors: application to near infrared spectral data*. Statistics and Operations Research Transactions, SORT 37 (1) January-June 2013, 57-78.
- M.I. Sánchez-Rodríguez, E. Sánchez-López, A. Marinas, J.M. Caridad, J.M. Marinas, F.J. Urbano. *New approaches in the chemometric analysis of IR spectra of extra-virgin olive oils*. Statistics and Operations Research Transactions, SORT, en prensa.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 1 de Septiembre de 2014

Firma de los directores

Fdo.:Alberto Marinas Aramendía

Fdo.: José María Marinas Rubio

D. Antonio Ángel Romero Reyes, Director del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba

CERTIFICO:

Que el presente Trabajo de Investigación Titulado “*Construcción de una base de datos de aceites de oliva virgen extra andaluces basada en técnicas de IR, RMN, Raman e IRMS*” que constituye la Memoria presentada por Elena Sánchez López para optar al Grado de Doctor en Ciencias, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica, bajo la dirección de D. Alberto Marinas Aramendía y D. José M^a Marinas Rubio.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Córdoba a 1 de septiembre de 2014.

Fdo: Antonio Ángel Romero Reyes

Las investigaciones realizadas en la presente Memoria forman parte de un Plan de Investigación desarrollado por el grupo de investigación FQM 162 del PAIDI subvencionado con cargo a los Proyectos de excelencia P08-FQM-03931 y P09-FQM-04781 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía, cofinanciados con fondos FEDER.

Agradecimientos

Una vez llegado a este punto tengo sensaciones encontradas, siempre veía lejano este momento, pero, a la vez, si echo la vista atrás, siento que todo ha pasado muy rápido. Parece que fue ayer cuando llegué por primera vez al Departamento de Química Orgánica, algo que recuerdo con mucho cariño. Para mí era todo nuevo, el mundo de la investigación, los compañeros, otra Facultad...pero, desde el principio me sentí como en casa.

Por esto y mucho más, quiero dar mis agradecimientos a todo el Departamento, en especial a M^a Ángeles Aramendía Lopidana, con la que inicié esta andadura, por su paciencia, por transmitirme sus conocimientos y por estar siempre tan pendiente, a Alberto Marinas Aramendía, por su ayuda y colaboración en todo momento, sin él esto no hubiese sido posible, a Jose María Marinas Rubio y Francisco José Urbano Navarro, por su gran apoyo, a M^a Isabel Sánchez Rodríguez y Jose M^a Caridad Ocerín, por sus aportaciones en el campo de la Quimiometría. También a todos los profesores, técnicos de laboratorio y personal administrativo, por estar siempre ahí cuando los he necesitado. Y como no, a todos los compañeros del laboratorio y, en particular, a los de nuestra línea de investigación, Lucrecia, Jesús, Kaquisco, Vicente, Checa y Fran, por haber hecho de esta etapa algo inolvidable.

También quiero extender mis agradecimientos al profesor Luis Rallo, a los doctores Mustafa Moalem, José Manuel Moreno Rojas, al Joint Research Centre (JCR) de Ispra, al Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Madrid, a la Cooperativa Hojiblanca y a las Denominaciones de Origen andaluzas, por su participación en esta Tesis Doctoral. Así como al SCAI de la Universidad de Córdoba, en especial a Juan García Olmo y a la Junta de Andalucía por la financiación del proyecto P08-FQM-3931 (Enero 2009-Marzo 2014), titulado *Química del aceite de oliva: trazabilidad y desarrollo sostenible*.

Por último, quiero agradecer a mis amigos y familiares todo el aliento que he recibido en este recorrido. A mis padres, por su ayuda y su cariño, por haberme enseñado a caminar por la vida. A Ángela, mi hermana y mejor amiga, por esas largas conversaciones sobre ciencia, siempre acompañadas de cerveza, y por entender mis preocupaciones y compartirlas conmigo. A mi marido, Ramón, porque le debo mucho, ha sabido entenderme y ayudarme en este duro trabajo, siempre creyendo en mí. A mis hijos, Teresa y Manuel, por hacerme la vida feliz. A mi familia política, en especial a Teresa y Juan Antonio, por animarme en todo momento y estar siempre ahí.

Por haberme hecho esta travesía más grata y más fácil. Gracias a todos!!

A Ramón, Teresa y Manuel

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
OBJETIVOS.....	5
CAPÍTULO 1. ACEITE DE OLIVA: TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A LA CALIDAD Y QUIMIOMETRÍA.....	9
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	13
2. CLASIFICACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES DE OLIVA.....	14
3. VARIEDADES DE OLIVO.....	19
4. DENOMINACIONES DE ORIGEN E INDICACIONES GEOGRÁFICAS PROTEGIDAS.....	24
4.1. DENOMINACIONES DE ORIGEN ANDALUZAS.....	27
5. TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA.....	32
5.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	35
5.2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL.....	48
5.2.1. Espectroscopia infrarroja (IR).....	49
5.2.2. Espectroscopia Raman.....	62
5.3. ESPECTROSCOPIA RMN.....	68
5.4. ADN.....	77
5.5. NARIZ Y LENGUA ELECTRÓNICAS.....	80
6. APLICACIÓN DE QUIMIOMETRÍA AL ACEITE DE OLIVA.....	84
6.1. ANÁLISIS CUALITATIVO	85
6.1.1. Métodos de reconocimiento de patrones no supervisados.....	85
6.1.2. Métodos de reconocimiento de patrón supervisados	86
6.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	89
6.2.1. Regresión Lineal Múltiple (MLR).....	89
6.2.2. Regresión por Componentes Principales (PCR).....	89

Índice general

6.2.3.	Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).....	89
6.2.4.	Redes Neuronales Artificiales (ANN).....	90
6.2.5.	Regresión por medio de Vectores de Soporte (SVR).....	90
6.2.6.	Árboles de Clasificación y Regresión (CART).....	90
6.2.7.	Análisis de la Varianza (ANOVA).....	90
6.2.8.	Regresión inversa por Mínimos Cuadrados (ILS).....	91
7.	COMBINACIÓN DE TÉCNICAS.....	91
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	95

CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS Y RESULTADOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES COMO TÉCNICA DE REFERENCIA.....131

1.	CLASIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS.....	135
1.1	NOMENCLATURA.....	136
1.2	OBTENCIÓN DEL ACEITE.....	152
2.	CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	153
2.1.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	153
2.2.	RESULTADOS DE ÁCIDOS GRASOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC).....	155
3.	BIBLIOGRAFÍA.....	170

CAPÍTULO 3. ESPECTROSCOPIA DE MASAS DE ISÓTOPOS ESTABLES (IRMS) APLICADA AL ESTUDIO DE ACEITES DE OLIVA.....171

1.	INTRODUCCIÓN.....	175
2.	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN ISOTÓPICA.....	178
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	181
3.1	MUESTRAS.....	181

3.2	TÉCNICAS IRMS	182
4.	RESULTADOS.....	189
4.1	INFLUENCIA DE LA VARIEDAD	190
4.2	INFLUENCIA DE LA CAMPAÑA	192
4.3	INFLUENCIA DEL RIEGO	194
4.4	INFLUENCIA DE LA LATITUD Y DE LA ZONA GEOGRÁFICA.....	195
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	200
	ANEXO 3.1. RESULTADO DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS POR IRMS ...	204

CAPÍTULO 4. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL APLICADA AL ESTUDIO DE ACEITES DE OLIVA.....213

1.	INTRODUCCIÓN.....	217
2.	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR).....	218
2.1.	INTRODUCCIÓN.....	218
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	218
2.2.1.	Muestras.....	218
2.2.2.	Equipos y Software empleados para la obtención de los espectros.....	219
2.2.3.	Estudio quimiométrico.....	222
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	224
2.3.1.	Quimiometría de datos IR: Implantación progresiva de factores PLS en el modelo de regresión.....	225
2.3.2.	Validación cruzada: generalización de los resultados obtenidos.....	233
2.3.3.	Estudio quimiométrico de espectros NIR de aceites de oliva adulterados con aceites vegetales de calidad inferior.....	240
3.	ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	247
3.1.	INTRODUCCIÓN.....	247
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	247

Índice general

3.2.1. Muestras.....	247
3.2.2. Equipo utilizado para la obtención de espectros.....	248
3.2.3. Estudio quimiométrico.....	248
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	253
3.3.1. Variable de respuesta cuantitativa: regresión.....	253
3.3.2. Variable de respuesta cualitativa: análisis discriminante.....	255
4. BIBLIOGRAFÍA.....	264

CAPÍTULO 5. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR APLICADA AL ESTUDIO DE ACEITES DE OLIVA.....269

1. INTRODUCCIÓN.....	273
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	274
2.1. MUESTRAS.....	274
2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SER ANALIZADAS.....	274
2.3. EQUIPO Y CONDICIONES EMPLEADAS.....	275
2.4. ANÁLISIS MEDIANTE ¹ H RMN.....	276
2.4.1. Determinación de ácidos grasos.....	276
2.5. ANÁLISIS MEDIANTE ¹³ C RMN.....	277
2.5.1. Determinación de ácidos grasos.....	277
2.5.2. Distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol.....	280
3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	282
3.1. ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LAS POSICIONES 1,3 Y 2 DEL GLICEROL.....	283
3.2. ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS (SAFA, MUFA Y PUFA) MEDIANTE ¹ H RMN, APLICANDO ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	286
3.3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS SAFA, MUFA Y PUFA MEDIANTE LOS ESPECTROS RMN DE ¹³ C Y ¹ H.....	290
4. BIBLIOGRAFÍA.....	308

ANEXO 4.1. RESULTADOS DE RMN.....309

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....355

CAPÍTULO 7. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS.363

Comunicación 1. Aplicaciones de las técnicas de espectrometría de masas de isótopos estables a la diferenciación de denominaciones de origen de aceites andaluces.....369

Comunicación 2. Modelos de regresión lineal múltiple para predecir el contenido en diversos ácidos del aceite usando los datos del espectro NIR.....381

Comunicación 3. Aplicación de técnicas de análisis multivariante a los espectros RMN del 1H del aceite de oliva.....385

Comunicación 4. Aplicación de la técnica IRMS a la trazabilidad de aceites de oliva andaluces.....399

Comunicación 5. Trazabilidad de aceites de oliva andaluces mediante la aplicación de la técnica IRMS..... 405

Comunicación 6. Estudio comparativo de ácidos grasos obtenidos por RMN (1H y 13C) en aceites de oliva andaluces..... 411

Comunicación 7. Characterisation and classification of Andalusian extra-virgin olive oils by using NMR and IR spectral data..... 423

Publicación 1. A Nuclear Magnetic Resonance (1H and 13C) and isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$) study of Andalusian olive oils.....429

Publicación 2. Química del aceite de oliva: trazabilidad y desarrollo sostenible.....441

Publicación 3. New insights into evaluation of regression models through a decomposition of the prediction errors: application to near-infrared spectral data.....447

Publicación 4. New approaches in the chemometric analysis of IR spectra of extra-virgin olive oils..... 471

Índice general

RESUMEN

Resumen

En la presente Tesis Doctoral se ha construido una base de datos de aceites de oliva virgen extra andaluces que comprende siete campañas (de la 2004/2005 a la 2010/2011), con el fin de poseer herramientas que permitan conocer el origen geográfico de los aceites de oliva, así como su autenticidad, permitiendo la detección de fraudes. Los aceites han sido estudiados por diferentes técnicas instrumentales como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia Infrarroja (IR), tanto de infrarrojo cercano (NIR), como medio (MIR), Espectroscopia Raman y Espectrometría de Masas de Isótopos Estables (IRMS). Asimismo, se ha determinado la composición en ácidos grasos mediante cromatografía de gases, técnica de referencia. A los datos instrumentales se les han aplicado procedimientos quimiométricos con vistas a obtener información cuantitativa (ej. predicción de contenido en ácidos grasos) y cualitativa (diferenciación entre variedades de aceituna, campaña o procedencia geográfica, incluyendo denominaciones de origen protegidas (DOPs)).

OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral se enmarca, fundamentalmente, dentro del proyecto P08-FQM-3931 de la Junta de Andalucía, orientado a aplicar la experiencia de nuestro Equipo de Investigación para abordar dos temas fundamentales asociados al sector del aceite de oliva, producto estrella en nuestra Comunidad: 1) Por un lado, *asegurar la trazabilidad* del mismo con vistas a proteger denominaciones de origen y evitar fraudes, 2) Por otro lado, *disminuir el impacto ambiental* ocasionado en la producción del aceite, empleando luz solar (empleo de fotocatalisis).

Esta Memoria se centra en la trazabilidad (línea 1), teniendo como OBJETIVO GENERAL la construcción de una base de datos de aceites de oliva virgen andaluces, sobre composición isotópica en oxígeno, carbono e hidrógeno (determinada mediante IRMS), espectros de RMN (^{13}C y ^1H), espectros NIR, MIR y Raman, así como composición en ácidos grasos, determinada por cromatografía de gases. Resulta especialmente importante la inclusión de la técnica IRMS, técnica muy innovadora que apenas se ha aplicado al campo del aceite de oliva.

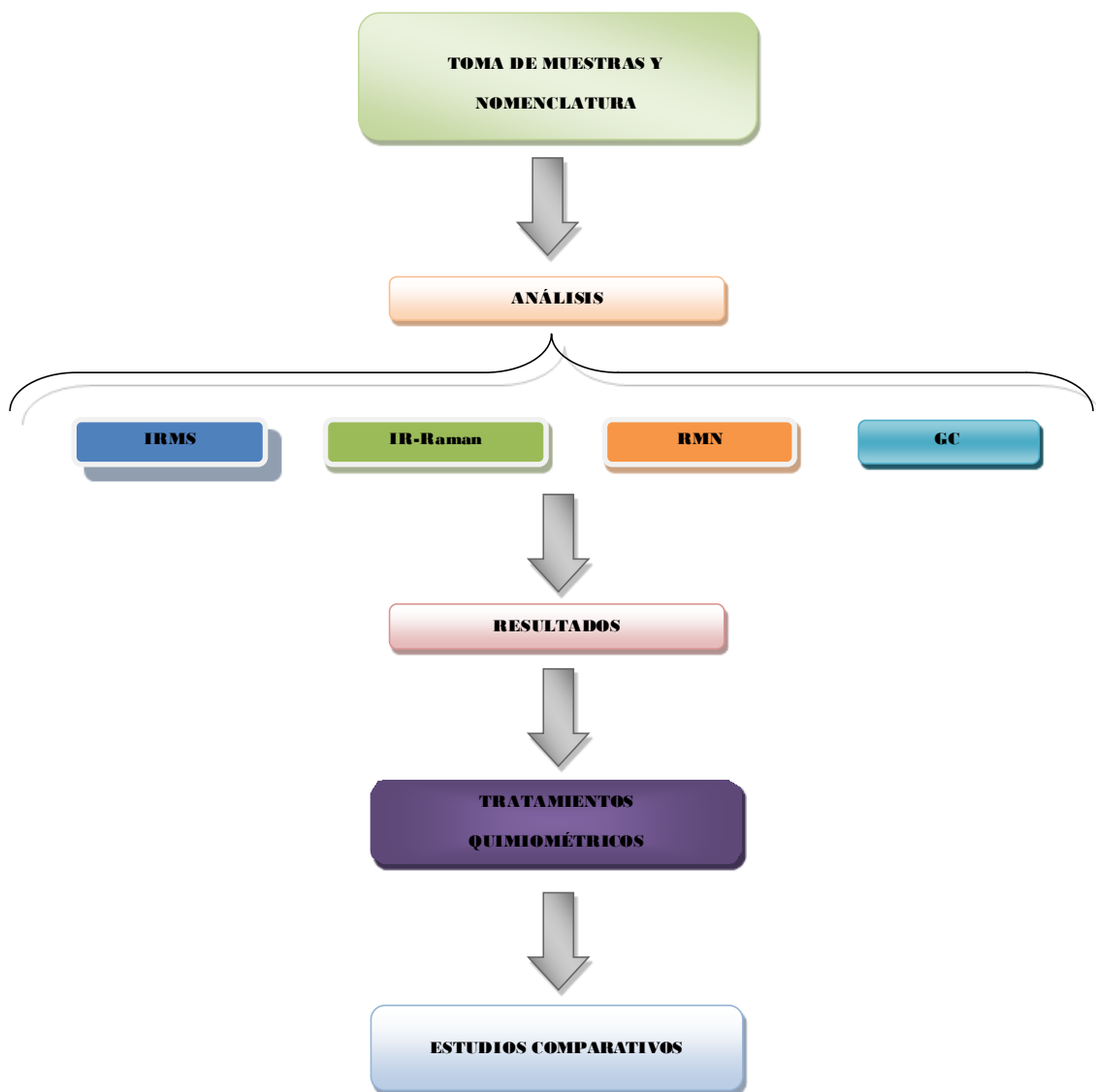
Como actualmente no existe normativa europea sobre recogida de muestras en aceite de oliva, para estudios de IRMS, seguiremos la existente para vinos, contrastando los resultados con los laboratorios Arbitral Agroalimentario de Madrid y del Joint Research Center de Ispra (Italia) centros de referencia a nivel nacional y europeo, respectivamente. Esa base de datos corresponderá a siete campañas, lo cual le confiere la robustez adecuada.

Una vez obtenidos los datos por las diferentes técnicas, como OBJETIVO ESPECÍFICO, se tratarán de aplicar métodos quimiométricos con el fin de obtener información cuantitativa (ej. predicción de contenido en ácidos grasos) o cualitativa (variedad de aceituna, campaña o procedencia geográfica, incluyendo a

Objetivos

denominaciones de origen protegidas (DOPs)) llevando a cabo, asimismo, estudios comparativos acerca de la información aportada por las diferentes técnicas.

A continuación se muestra el diseño experimental del trabajo:



CAPÍTULO 1. ACEITE DE OLIVA: TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A LA CALIDAD Y QUIMIOMETRÍA

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	13
2.	CLASIFICACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES DE OLIVA...	14
3.	VARIEDADES DE OLIVO	19
4.	DENOMINACIONES DE ORIGEN E INDICACIONES GEOGRÁFICAS PROTEGIDAS.....	24
4.1.	DENOMINACIONES DE ORIGEN ANDALUZAS.....	27
5.	TECNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA	32
5.1.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	35
5.2.	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL.....	48
5.2.1.	Espectroscopia infrarroja (IR).....	49
5.2.2.	Espectroscopia Raman.....	62
5.3.	ESPECTROSCOPIA RMN.....	68
5.4.	ADN	77
5.5.	NARIZ Y LENGUA ELECTRÓNICAS	80
6.	APLICACIÓN DE QUIMIOMETRÍA AL ACEITE DE OLIVA	84
6.1.	ANÁLISIS CUALITATIVO.....	85
6.1.1.	Métodos de reconocimiento de patrones no supervisados	85
6.1.2.	Métodos de reconocimiento de patrón supervisados.....	86
6.2.	ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	89
6.2.1.	Regresión Lineal Múltiple (MLR).....	89
6.2.2.	Regresión por Componentes Principales (PCR).....	89
6.2.3.	Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).....	89
6.2.4.	Redes Neuronales Artificiales (ANN).....	90
6.2.5.	Regresión por medio de Vectores de Soporte (SVR).....	90
6.2.6.	Árboles de Clasificación y Regresión (CART).....	90
6.2.7.	Análisis de la Varianza (ANOVA).	90
6.2.8.	Regresión inversa por Mínimos Cuadrados (ILS).....	91
7.	COMBINACIÓN DE TÉCNICAS.....	91
8.	BIBLIOGRAFÍA	95

CAPÍTULO 1. ACEITE DE OLIVA: TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A LA CALIDAD Y QUIMIOMETRÍA.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El aceite de oliva virgen extra es uno de los productos estrella de la dieta mediterránea y ha sido reconocido por la UNESCO como Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad en 2011 [1]. Se trata de un producto muy apreciado por sus características organolépticas [2,3] y nutricionales [4], así como sus beneficios para la salud [5]. La mayor parte de la producción del olivo se destina a la obtención de aceite (90%) y sólo el 10% restante se emplea para la elaboración de aceituna de mesa. Según el Consejo Oleícola Internacional, en la campaña 2011/2012, España produjo 1.615.000t, e Italia 399.200t, lo que representa el 67,4% y el 16,7% de la producción total de la Unión Europea y el 49,8% y 12,3% de la producción mundial, respectivamente. Fuera de la Unión Europea, el primer país productor mundial es Siria con un 6,1%, seguido de Turquía (5,9%) y Túnez con el 5,6% [6].

Se trata de un producto muy susceptible de ser adulterado, por lo que el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la construcción de una base de datos de aceites de oliva vírgenes extra (similar a la existente en vinos) que permita garantizar la trazabilidad del producto, detectando fraudes, muy frecuentes en este mercado ya que se producen mezclas con aceites de menor calidad, y haga posible distinguir Denominaciones de Origen Protegidas (DOPs), algo especialmente importante en la

Comunidad Andaluza, donde se concentra un gran número de ellas. La base de datos está constituida por los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C y ^1H , Infrarrojo Cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR), Raman y datos de espectrometría de masas de isótopos estables (IRMS). Por otro lado, se han desarrollado métodos predictivos del contenido en ácidos grasos de los aceites, tomando como referencia los datos de cromatografía de gases. Para la elaboración de esta base de datos, se han seguido las directrices de la Unión Europea para vinos y corresponde a siete campañas, lo cual le confiere la robustez adecuada.

2. CLASIFICACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES DE OLIVA

Los aceites de oliva se clasifican en aceites de oliva “vírgenes” y en “no vírgenes” (Figura 1.1).

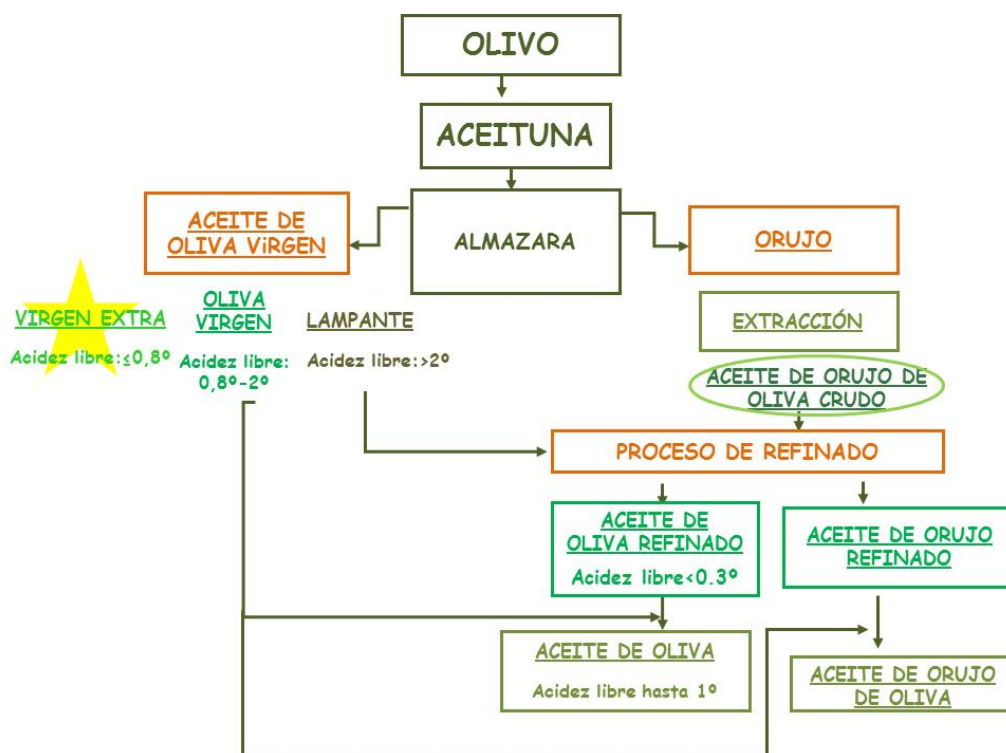
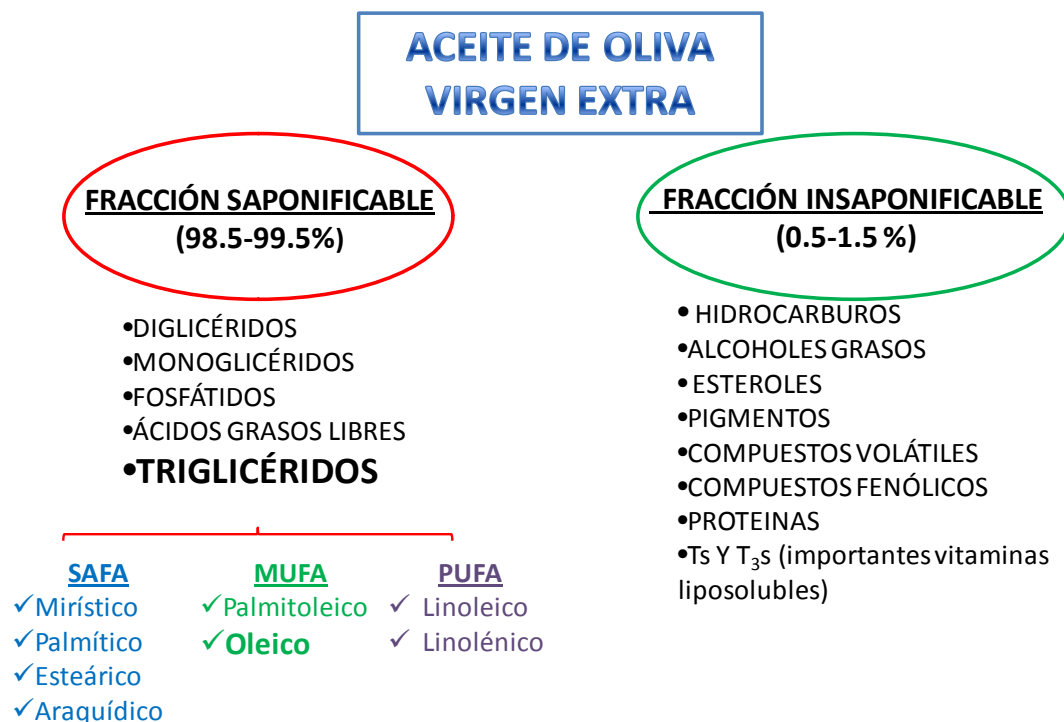


Figura 1.1. Clasificación de los aceites de oliva [7,8].

Los primeros se refieren a aceites obtenidos únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos (lavado, prensado, decantación, centrifugación y filtración) que no alteran el aceite. Dependiendo del grado de acidez libre, los aceites de oliva virgen pueden clasificarse en “aceite de oliva virgen extra” ($\leq 0,8^\circ$), (el aceite de mayor calidad), “aceite de oliva virgen” ($0,8-2^\circ$) y “aceite de oliva virgen lampante” ($>2^\circ$) el cual no es apto para consumo humano, por lo que necesita un proceso de refinado mediante tratamientos químicos, obteniéndose así el “aceite de oliva refinado” con acidez inferior a $0,3^\circ$. Si este aceite es enriquecido con aceites de oliva vírgenes, obtenemos el “aceite de oliva” con acidez libre de hasta 1° . Por otro lado, dentro de los aceites “no vírgenes” encontramos también al “aceite de orujo de oliva crudo”, que es un aceite de muy baja calidad, obtenido mediante disolventes a partir de los residuos sólidos de aceites vírgenes. Si este aceite se refina, obtenemos el “aceite de orujo refinado” y si este último lo mezclamos con aceites de oliva vírgenes obtenemos el “aceite de orujo de oliva” [7,8].

El aceite de oliva virgen extra está formado por una matriz de elementos bastante compleja. Hay que considerar dos grandes grupos de compuestos químicos (*Figura 1.2*): La **fracción saponificable** (componentes mayoritarios, que representan 98,5-99,5%), la cual está formada por ácidos grasos que, normalmente, forman ésteres, por lo general con glicerol, para producir glicéridos (mono, di and triacilgliceroles) y fosfátidos y algunos ácidos grasos libres [9]. La composición en ácidos grasos de los aceites de oliva está fuertemente influenciada por varios factores, como la variedad, grado de madurez del fruto y el origen geográfico [10,11]. Entre estos ácidos grasos hay que destacar: ácidos grasos saturados, SAFA, los cuales no presentan dobles enlaces (mirístico, palmítico, esteárico y araquídico); Ácidos grasos monoinsaturados, MUFA,

que presentan un doble enlace en la cadena carbonada (palmitoleico (C16:1) y oleico (C18:1)) y ácidos grasos poliinsaturados, PUFA, que tienen más de un doble enlace en la cadena de átomos de Carbono (ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3), fundamentalmente) (Figura 1.2B). En 1977, Fedeli mostró la predominancia de los siguientes triglicéridos sobre otros en aceites de oliva [12] : Palmítico-Oleico-Oleico (POO: 18,4 %); Esteárico-Oleico-Oleico (SOO: 1%); Palmítico-Oleico-Linoleico (POL: 5,9%); Oleico-Oleico-Oleico (OOO: 43,5%) y Oleico-Oleico-Linoleico (OOL: 6,8%). Los triglicéridos de los aceites de oliva presentan una asimetría en la distribución de ácidos grasos entre las posiciones sn-1, sn-2 y sn-3 (Figura 1.2B) [13]. Los principales ácidos grasos en aceites de oliva son oleico (55-85%), palmítico (7,5-20%), linoleico (7,5-20%), esteárico (0,5-5%), palmitoleico (0,3-3,5%) y linolénico (0,0-1,5%), pudiéndose encontrar trazas de mirístico, araquídico y margárico [9] (Figura 1.2). Esta composición le da un carácter monoinsaturado al aceite, al contrario que otros aceites extraídos de semillas, los cuales son ricos en ácidos grasos poliinsaturados.



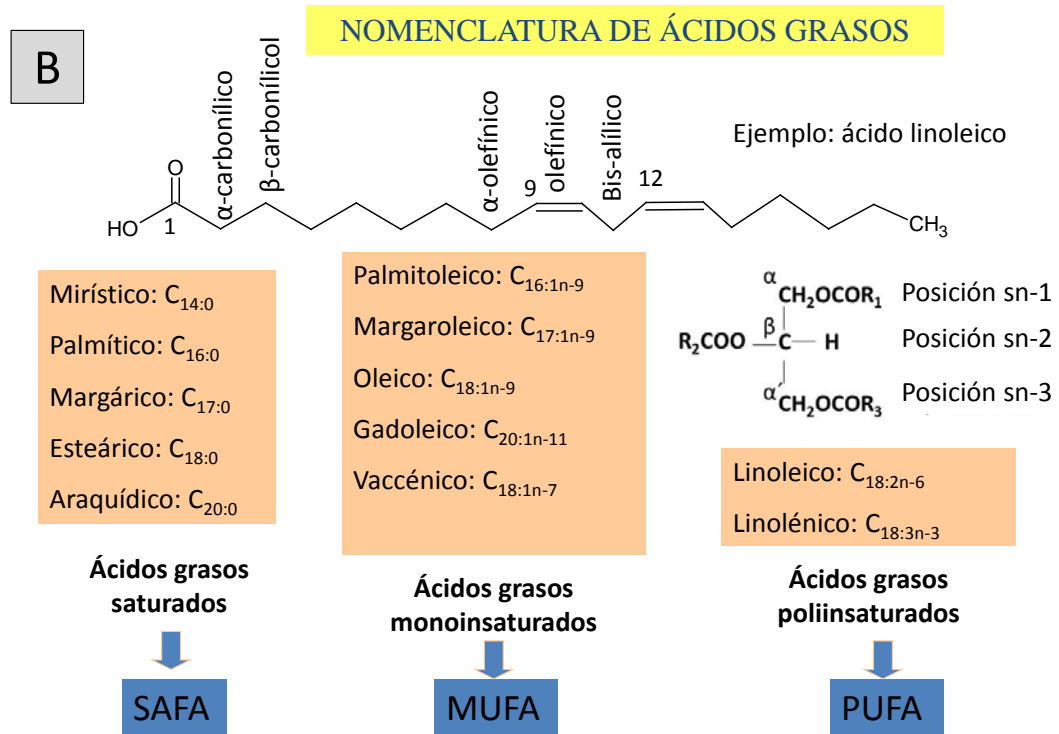


Figura 1.2. A) Composición de los aceites de oliva virgen extra. B) Nomenclatura empleada en los ácidos grasos. Asimismo, sobre el ejemplo del ácido linoleico, se localizan algunos de los hidrógenos que serán referidos en el *Apartado 2.4.1. del Capítulo 5*, sobre RMN.

Los amplios márgenes en el porcentaje de los distintos ácidos grasos están relacionados con factores genéticos y ambientales[14]. La latitud, el clima (sequía), la variedad, la época de recolección, el grado de maduración de la aceituna..., influyen en estas variaciones, habiendo diferencias según campañas y zonas de producción [14,15]. Así, las aceitunas de zonas frías dan aceites con más ácidos grasos insaturados que las procedentes de áreas cálidas y secas. El contenido en sal en el agua de riego es un factor que también parece influir en la composición en ácidos grasos. Este efecto fue estudiado por Marzouk y col. [16], quienes comprobaron que el contenido en ácido oleico aumenta durante la maduración, pero disminuye a concentraciones altas de NaCl. A lo largo del proceso de maduración de la aceituna, nos encontramos que la fracción de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, fundamentalmente) y la relación C18:2/C16:0

Capítulo 1

crecen y la de saturados (palmítico) disminuye [17-20]. De esta manera, los retrasos en la recolección hacen que aumente el contenido en ácidos grasos totales insaturados, especialmente el linoleico, a costa del palmítico. Sin embargo, la composición de los ácidos grasos libres, durante la maduración de las aceitunas, estudiada por Boschelle y col. [21], sigue otro comportamiento. Así, el porcentaje de ácido oleico aumenta en función de la época de recogida igual que el de palmítico, mientras que el porcentaje de linoleico libre disminuye notablemente durante las últimas fases de la maduración. Este comportamiento se ha atribuido a la acción específica de las lipasas del fruto, unido a la posición diferente de los diversos ácidos grasos en las tres posiciones del glicerol. La relación oleico/linoleico en distintas variedades de aceituna está relacionada con la estabilidad; las que presentan un valor más elevado (Picual, Hojiblanca, Lechín...) son las que presentan una mayor estabilidad, es decir, una mayor resistencia al enranciamiento, frente a otras más inestables (Arbequina, Empeltre) [22].

La *fracción insaponificable* (compuestos minoritarios, *Figura 1.2A*) está formada por un grupo heterogéneo de compuestos, siendo los más estudiados los hidrocarburos [23], esteroides [24], alcoholes grasos [25], pigmentos (clorofilas y carotenos) [26], tocoferoles (Ts) y tocotrienoles (T3s) [27-29], volátiles [30-33] y compuestos fenólicos [34,35]. Varios de estos compuestos minoritarios tienen un gran valor biológico, otros representan el factor principal del aroma (compuestos volátiles) y algunos son eficaces antioxidantes (fenólicos) que protegen al aceite frente al enranciamiento. Otros derivados no terpénicos que contienen los aceites de oliva vírgenes son las clorofilas, que, además de sus funciones como pigmentos, tienen un papel importante en su conservación, ya que actúan como antioxidantes en la oscuridad, en sinergia con los componentes fenólicos. Los antioxidantes previenen del enranciamiento que otros factores y sustancias pueden favorecer: luz, calor, humedad,

aire y metales (hierro, cobre, magnesio). La composición de la fracción insaponificable es variable, ya que depende de factores como las condiciones ambientales, la especie vegetal, el proceso de extracción y de refinado y las condiciones de almacenamiento [36].

La industria olivarera se esfuerza continuamente en mantener la autenticidad del aceite de oliva, protegiendo la calidad y el origen de éste. Un estudio sobre fraude alimentario comprendiendo el período 1980-2010 reveló que el aceite de oliva es el más susceptible a sufrir adulteraciones [37]. Muchos autores utilizan componentes específicos del aceite de oliva como marcadores para determinar la adulteración del aceite de oliva virgen extra con otros aceites más baratos. García y col. determinan triacilglicerol (TAGs), ácidos grasos (FAs), ceras, clorofilas, esterol y diacilglicerol para detectar adulteraciones de aceites de oliva vírgenes con aceites de oliva refinado [38]. Otros compuestos utilizados como trazadores son aminoácidos no proteicos [39], tocoferol o fosfolípidos [40]. Los aceites de oliva también pueden ser contaminados en las líneas de embotellado [41], o presentar residuos de pesticidas, siendo necesarios métodos que permitan su detección [42-45].

3. VARIEDADES DE OLIVO

En España se han encontrado 272 variedades cultivadas de olivo. De ellas, 24 variedades han alcanzado la categoría de variedad principal, 24 la de variedad secundaria, 50 la de variedad difundida y 174 se incluyen en la categoría de variedades locales. Dentro de las variedades principales, destacamos [46,47]:

Picual: Es la variedad más importante y extendida ya que supone el 50 por ciento de la producción en España y en torno al 20 por ciento de la producción mundial. Su producción está centrada en la provincia de Jaén, de la que es originaria, y en las

Capítulo 1

provincias de Granada y Córdoba. Es muy apreciada por su rendimiento graso elevado y facilidad de cultivo. La apreciación de su aceite es media, aunque destaca por su alto índice de estabilidad, que implica una gran resistencia al enranciamiento, y por contener un porcentaje de ácido oleico muy elevado.

Picudo: Su origen se encuentra en Córdoba, en especial en la localidad de Priego de Córdoba y su cultivo se extiende, además de en esta provincia, por Granada y Málaga. Es una variedad muy valorada por su alto rendimiento graso y por las características organolépticas de su aceite, que se caracteriza por un alto contenido en ácido linoleico, poco amargor y baja estabilidad.

Hojiblanca: Procede de Lucena (Córdoba) y se cultiva en las provincias de Córdoba y Málaga y en Estepa (Sevilla). Es la tercera variedad española en cuanto a superficie cultivada. Su contenido de aceite es bajo pero muy apreciado por su calidad, aunque presenta baja estabilidad.

Verdial: Su origen está en Vélez-Málaga, pero se extiende al resto de Andalucía y a Extremadura.

Arbequina: Es la variedad más importante de Cataluña, donde ocupa más de 55.000 ha. También se encuentra ampliamente difundida en Aragón y, recientemente, en Andalucía, donde ocupa más de 20.000 ha en plantaciones intensivas. El rendimiento graso es elevado y la calidad de su aceite excelente, principalmente por sus buenas características organolépticas, aunque presenta baja estabilidad.

Empeltre: Tiene su origen en la localidad zaragozana de Pedrola, aunque se cultiva ya a lo largo de todo el valle del Ebro. Da aceite suave, de color amarillo claro, dulzón y aromático.

Cornicabra: También es conocida como Cornezuelo. Es la segunda variedad española en cuanto a superficie cultivada. Actualmente ocupa más de 272.000 Ha en las

provincias de Ciudad Real, Toledo, Madrid, Badajoz y Cáceres. Es apreciada por su alto rendimiento graso y por la calidad de su aceite, de excelentes características organolépticas y elevada estabilidad. También se utiliza para aderezo por la calidad de su pulpa.

Lechín: La carne de su aceituna da nombre a esta variedad que se encuentra en las provincias de Córdoba, Sevilla y Granada.

Manzanilla: El fruto es esencialmente utilizado para aceituna de mesa. Procede de Dos Hermanas (Sevilla) y se cultiva fundamentalmente ahí. Es la variedad de olivo más difundida internacionalmente. Además, es la variedad de mesa más apreciada por su productividad y calidad del fruto. Por otro lado, su contenido en aceite es medio y presenta una elevada calidad y estabilidad.

Gordal Sevillana: Se cultiva en Sevilla y es una variedad de mesa muy difundida internacionalmente. Es apreciada por el tamaño de sus frutos más que por su calidad

Actualmente, se considera que la España olivarera está dividida en diez grandes regiones, cada una con su variedad de oliva más representativa. En la *Figura 1.3* se pueden observar las distintas zonas olivareras [48]

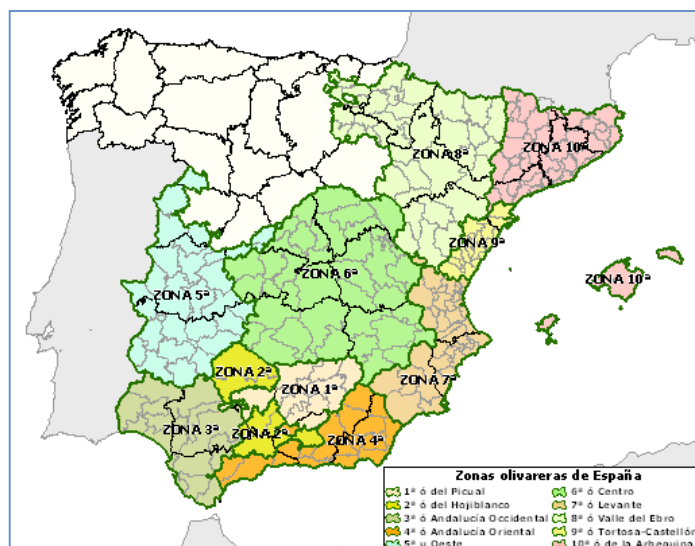


Figura 1.3. Zonas olivareras de España.

Entrando en detalle en esta división tenemos:

- **Zona 1ª ó del Picual-** Comprende la provincia de Jaén y las comarcas de Iznalloz (Granada) y Bujalance (Córdoba). La variedad predominante es la Picual que es típica de almazara. Están incluidas las zonas con Denominación de Origen para aceites *Sierra de Segura, Sierra Mágina, Sierra de Cazorla, Montes de Granada y Montoro-Adamuz.*
- **Zona 2ª ó del Hojiblanco-** Incluye la provincia de Córdoba, (excepto las comarcas de Bujalance y La Carlota), y las comarcas de Estepa (Sevilla), Loja (Granada) y Antequera (Málaga). La variedad más representativa es la Hojiblanca, de doble aptitud (mesa y almazara), aunque alcanzan importancia en algunos lugares Picual, Carrasqueña de Córdoba o Picudo, Chorrúo y otras. En esta zona están las Denominaciones de Origen para aceites *Baena y Priego de Córdoba*, a las que dan carácter los olivos de la variedad Picudo. Además, con predominio de Hojiblanca, están las D.O.P. *Antequera, Lucena, Estepa y Poniente de Granada.*

- **Zona 3ª ó Andalucía occidental-** Comprende la provincia de Sevilla (excepto la comarca de Estepa), la comarca de La Carlota (Córdoba) y las provincias de Huelva y de Cádiz. Es una de las zonas más heterogéneas en cuanto a variedades, pues junto a las de almazara (Verdial de Huévar y Lechín de Sevilla), coexisten las típicas de mesa (Manzanilla y Gordal Sevillana). Incluye la zona de aceites con Denominación de Origen *Sierra de Cádiz*.
- **Zona 4ª ó Andalucía oriental-** Comprende la provincia de Málaga (excepto la comarca de Antequera), la provincia de Granada (excepto las comarcas de Iznalloz y Loja) y la provincia de Almería. Aparte de las variedades ya mencionadas de Picual y Hojiblanca, conviene destacar otras propias de la zona: Verdial de Vélez-Málaga (sus aceites pueden alcanzar una calidad extraordinaria), Lechín de Granada, Picual de Almería (almazara) y Aloreña (de doble aptitud).
- **Zona 5ª u Oeste-** Comprende las provincias de Badajoz y Cáceres y las zonas productoras de Ávila, Salamanca y Zamora. Destacan las variedades Manzanilla Cacereña, Manzanilla o Carrasqueña de Badajoz, Morisca, Verdial de Badajoz y Cornicabra. Las dos primeras son adecuadas para la elaboración de aceituna de mesa, para negra la Cacereña y para verde la Carrasqueña. Las Denominaciones de Origen para esta zona son: *Sierra de Gata- Las Hurdes* en Cáceres y *Aceite de Monterrubio* en Badajoz.
- **Zona 6ª ó Centro-** Comprende las Comunidades Autónomas de Castilla La Mancha y Madrid. La variedad más importante es la Cornicabra, que produce aceites de muy buena calidad, acompañada de la Castellana, la Alfafara y de la Gordal de Hellín. Incluye las Denominaciones de Origen para aceites *Montes de Toledo, Campo de Montiel* y *Alcarria*.

- **Zona 7ª ó Levante-** Comprende las provincias de Alicante y Valencia y la Región de Murcia. Existen en ella muchas variedades, la mayoría autóctonas, pero con baja incidencia en el conjunto nacional, tales como Villalonga, Changlot Real y Blanqueta.
- **Zona 8ª ó Valle del Ebro-** Comprende Aragón, La Rioja, Navarra y Álava. La variedad más extendida es la Empeltre, coexistiendo, según zonas, con la Farga. Dentro de la zona están las Denominaciones de Origen *Bajo Aragón y Rioja*.
- **Zona 9ª ó Tortosa-Castellón-** Comprende el sur de la provincia de Tarragona (Bajo Ebro-Montsiá) y la provincia de Castellón. La mayor parte de las variedades son autóctonas, tales como Farga, Sevillenca y Morrut. La Denominación de Origen de la zona es *Baix Ebre-Montsiá*.
- **Zona 10ª ó de la Arbequina-** Comprende las Comunidades Autónomas de Cataluña (excepto el sur de la provincia de Tarragona) y de Islas Baleares. Junto a la variedad Arbequina, que da nombre a la zona y produce aceites de muy buena calidad, aparecen localmente la Verdiell, Empeltre y Argudell. En la actualidad, la variedad Arbequina está muy difundida por las principales zonas olivereras por el gran valor comercial de sus aceites, ya que son aceites frutados al inicio de la campaña y dulces después de las primeras heladas, muy demandados para encabezar otros aceites de oliva.

4. DENOMINACIONES DE ORIGEN E INDICACIONES GEOGRÁFICAS PROTEGIDAS

Las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) constituyen el sistema utilizado en nuestro país para el reconocimiento de una calidad diferenciada, consecuencia de características propias y diferenciales,

debidas al medio geográfico en el que se producen las materias primas, se elaboran los productos y a la influencia del factor humano que participa en las mismas. Esta protección de la calidad permite:

- Estimular la diversificación de la producción agrícola y alimentaria.
- Proteger los nombres de productos contra su imitación y otros usos indebidos.
- Ayudar al consumidor aportando información relacionada con el carácter específico de los productos.

En España, el apoyo a determinados productos agroalimentarios originarios de ciertas zonas geográficas, comenzó en el año 1933 con la promulgación de la Ley del Estatuto del Vino [49]. Posteriormente, la ley 25/1970 [50] estableció el régimen de protección a la calidad través de Denominaciones de Origen, Específicas y Genéricas. La primera vez que se reconoció el régimen de Denominación de Origen al aceite de oliva, fue en el Decreto 3711/1974 [51]. Más adelante, la Comisión de las Comunidades Europeas dictó el Reglamento (CEE) nº 2081/92 [52] en el que se crearon dos grados de protección, las indicaciones geográficas y las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios. Actualmente, el reglamento comunitario en vigor es el DOCE L 343 de 14.12.2012 [53].

Según esto, se define a una **DOP** como un nombre que identifica un producto:

- originario de un lugar determinado, una región o, excepcionalmente, un país,
- cuya calidad o características se deben fundamental o exclusivamente a un medio geográfico particular, con los factores naturales y humanos inherentes a él, y

Capítulo 1

- cuyas fases de producción tengan lugar en su totalidad en la zona geográfica definida”.

Y a una **IGP** como nombre que identifica un producto:

- originario de un lugar determinado, una región o un país,
- que posea una cualidad determinada, una reputación u otra característica que pueda esencialmente atribuirse a su origen geográfico, y
- de cuyas fases de producción, al menos una tenga lugar en la zona geográfica definida.

Cuando se considera que el producto cumple los requisitos exigidos, los productores y elaboradores de la zona, sus asociaciones, cooperativas, etc. pueden solicitar el reconocimiento del grado de protección deseado. Se aportará a la Comunidad Autónoma correspondiente un estudio justificativo de la solicitud de registro que se refiera al nombre y describa la zona geográfica y las características del producto. Después de los trámites oportunos, las Comunidades Autónomas remiten las solicitudes al Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y se publica un anuncio en el Boletín Oficial del Estado para conocimiento público y posibilidad de oposición al registro en caso de que haya derechos afectados de otras personas. Cumplidos todos los requisitos se transmite la solicitud a la Comisión Europea y puede concederse una protección nacional transitoria hasta la inscripción en el Registro Comunitario. En el caso de que la Denominación afectara a más de una Comunidad Autónoma todos los trámites se harán ante la Administración General del Estado.

4.1. DENOMINACIONES DE ORIGEN ANDALUZAS

Dentro de nuestra comunidad autónoma contamos con 12 Denominaciones de Origen Protegidas de Aceite de Oliva (*Figura 1.4*). De ellas, cuatro pertenecen a la provincia de Córdoba (Baena, Montoro-Adamuz, Priego de Córdoba y Lucena), tres a la de Jaén (Sierra Mágina, Sierra de Cazorla y Sierra de Segura), Málaga, Sevilla y Cádiz cuentan con una por provincia (Antequera, Estepa y Sierra de Cádiz, respectivamente) y Granada tiene dos (Montes de Granada y Poniente de Granada)[54].

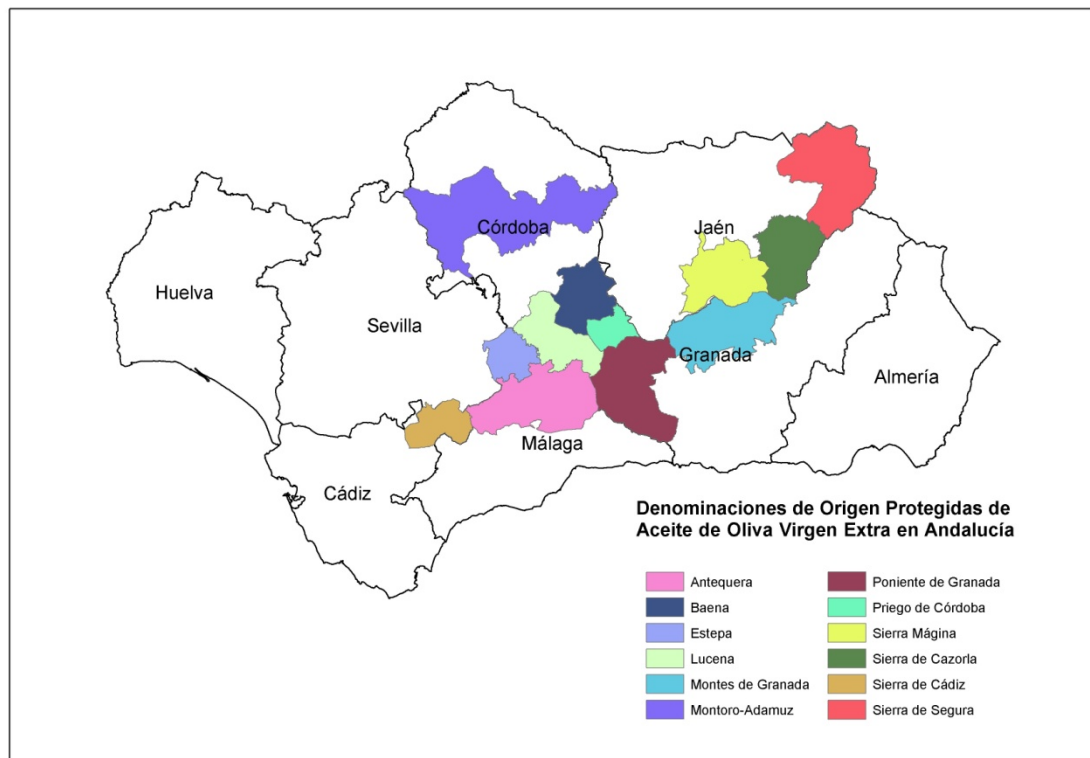


Figura 1.4. Denominaciones de Origen Protegidas de aceite en Andalucía.

DOP ANTEQUERA

- Variedades: Hojiblanca (variedad mayoritaria), Picual, Arbequina, Lechín de Sevilla, Gordal de Archidona, Picudo, Verdial de Vélez-Málaga y Verdial de Huévar.
- Zona Geográfica: Comprende diecisiete municipios de la provincia de Málaga (Alameda, Almargen, Antequera, Archidona, Campillos, Cañete la Real, Cuevas Bajas, Cuevas de San Marcos, Fuente de Piedra, Humilladero, Mollina, Sierra de Yeguas, Teba, Villanueva de Algaidas, Villanueva del Rosario, Villanueva del Trabuco y Villanueva de Tapia) y un término de la provincia de Córdoba (Palenciana)
- Superficie total de olivar: 75.000 Ha.

DOP BAENA

- Variedades: Picudo, Lechín, Chorrúo, Hojiblanco, Pajarero y Picual.
- Zona geográfica: Baena, Luque, Doña Mencía, Nueva Carteya, Zuheros, Castro del Río y Cabra.
- Superficie total de olivar: 59.000 Ha.

DOP ESTEPA

- Variedades: Hojiblanca, Arbequina, Manzanilla, Picual y Lechín de Sevilla.
- Zona geográfica: Comprende once municipios de la provincia de Sevilla (Aguadulce, Badolatosa, Casariche, Estepa, Gilena, Herrera, Lora de Estepa, Marinaleda, Pedrera, La Roda de Andalucía y el Rubio) y una parte de un municipio de la provincia de Córdoba, Puente Genil, en concreto la zona conocida como Miragenil.

DOP LUCENA

- Variedades: Hojiblanca (90%), Arbequina, Picual, Lechín, Tempranilla, Ocal, Campanil y Chorrúo.
- Zona geográfica: Aguilar de la Frontera, Benamejí, Encinas Reales, Iznájar, Lucena, Montilla, Monturque, Moriles, Puente Genil (parte oriental del término municipal) y Rute.
- Superficie total olivar: 72.438, 44 Ha.

DOP MONTES DE GRANADA

- Variedades: Las variedades principales son Picual, Loaime y Lucio y representan un 95% de la superficie total del olivar de esta zona. Las variedades secundarias son Negrillo de Iznalloz, Escarabajuelo, Gordal de Granada y Hojiblanca.
- Zona geográfica: Alamedilla, Alfacar, Alicún de Ortega, Benalúa de las Villas, Calicasas, Campotéjar, Cogollos Vega, Colomera, Darro, Dehesas de Guadix, Deifontes, Diezma, Fonelas, Gobernador, Guadahortuna, Güevéjar, Huélago, Iznalloz, el Norte del término de La Peza hasta el río Fardes, Montejícar, Montillana, Morelábor, Nívar, Pedro Martínez, Pinar, Torrecardela, Villanueva de las Torres, del término de Modín la zona Oriental comprendida hasta el límite natural definido por el río Velillos, y del término de Albolote y Atarte, la zona Norte comprendida en el límite natural que forman los ríos Cubillas y Colomera hasta su intersección.
- Superficie total de olivar: 56.000 Ha.

DOP MONTORO-ADAMUZ

- Variedades: Picual, Nevadillo Negro, Lechín de Sevilla, Picudo y Carrasqueño de la Sierra, considerando como variedades principales Picual (Nevadillo Blanco) y Nevadillo Negro.
- Zona geográfica: Montoro, Adamuz, Espiel, Hornachuelos, Obejo, Villaharta, Villanueva del Rey y Villaviciosa de Córdoba.
- Superficie total del olivar: 53.126 Ha.

DOP PONIENTE DE GRANADA

- Variedades: Hojiblanca, Picual, Picudo, Lucio ó Illoreño, Nevadillo de Alhama de Granada y Loaime
- Zona geográfica: : Algarinejo, Alhama de Granada, Arenas del Rey, Cacín, Huétor Tájar, Íllora, Jayena, Loja, Montefrío, Moraleda de Zafayona, Salar, Santa Cruz del Comercio, Villanueva de Mesía, Zafarraya, Zagra, y del término de Moclín la zona Occidental comprendida hasta el límite natural definido por el río Velillos, todos de la provincia de Granada.
- Superficie total de olivar: 71.000 Ha.

DOP PRIEGO DE CORDOBA

- Variedades: Picual, Hojiblanca y Picudo.
- Zona geográfica: La zona de producción es una comarca natural, situada en el sureste de la provincia de Córdoba, en pleno Parque Natural de la Sierra Subbética. Comprende los términos municipales de Almedinilla, Carcabuey, Fuente Tójar y Priego de Córdoba.
- Superficie total de olivar: 28.628 Ha.

DOP SIERRA DE CADIZ

- Variedades: Lechín de Sevilla (predominante), Manzanilla, Verdial de Huévar, Verdial de Cádiz, Hojiblanca, Picual, Alameña de Montilla y Arbequina.
- Zona geográfica: Comprende ocho municipios de Cádiz (Alcalá del Valle, Algodonales, Olvera, El Gastor, Setenil de las Bodegas, Torrealháquime, Puerto Serrano y Zahara de la Sierra), todos ellos situados en la comarca de la Sierra de Cádiz, y dos municipios de la provincia de Sevilla (Coripe y Pruna).
- Superficie total de olivar: 17.600 Ha.

DOP SIERRA DE CAZORLA

- Variedades: Picual y Royal.
- Zona geográfica: Cazorla, Chilluevar, Hinojares, Huesa, La Iruela, Peal de Becerro, Pozo Alcón, Quesada y Santo Tomé de la provincia de Jaén.
- Superficie total de olivar: 31.500 Ha.

DOP SIERRA DE SEGURA

- Variedades: Picual, Verdala, Royal y Manzanillo de Jaén.
- Zona geográfica: Beas de Segura, Benatae, Chiclana de Segura, Génave, Hornos de Segura, Orcera, La Puerta de Segura, Puente Génave, Segura de la Sierra, Santiago-Pontones, Siles, Torres de Albanchéz y Villarrodrigo.
- Superficie total de olivar: 38.819 Ha.

DOP SIERRA MAGINA

- Variedades: Picual y Manzanillo de Jaén.

- Zona geográfica: Albánchez de Ubeda, Bedmar-Garcéz, Bélmez de la Moraleda, Cabra del Santo Cristo, Cambil-Arbuniel, Campillo de Arenas, Cárcheles (Carchel y Carchelejo), Huelma, Solera, Jimena, Jódar, Larva, Mancha Real, Pegalajar y Torres.
- Superficie total olivar: 61.000 Ha.

5. TECNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA

Existen muchos trabajos en los que se aplican distintas técnicas analíticas para determinar la calidad del aceite de oliva. A continuación se expone una breve revisión bibliográfica donde se mostrarán dichas técnicas, haciendo más hincapié en aquellas que han sido utilizadas en el desarrollo de la Tesis Doctoral.

Para garantizar la autenticidad del aceite de oliva y ausencia de adulterantes, de precio y calidad inferior, como aceites de maíz, soja, avellana, nuez, aceites de oliva refinados, girasol, etc., y conocer su procedencia geográfica y la composición varietal se pretende crear un “documento de identidad”.

Aparicio y col. comparan métodos oficiales utilizados para caracterizar y autenticar aceites de oliva (cromatografía de gases con detección por ionización de llama, GC-FID, aplicada a la cuantificación de ácidos grasos y esteroides, entre otros y cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, en el análisis de triacilglicéridos) y muestran otras alternativas basadas, bien en el estudio concreto de ciertos compuestos (“targeted approaches”) o en estudio global de la muestra (“profiling approaches”) [55]. Luykx y col. mostraron una visión general de las técnicas analíticas que se utilizan en la determinación de la procedencia geográfica de los productos alimenticios [56] y Faria

y col. revisaron las técnicas analíticas usadas en la evaluación de la autenticidad del aceite de oliva [57].

Las técnicas clásicas de separación, como cromatografía (líquida y gaseosa) acopladas a otros métodos de identificación son muy utilizadas para determinar la autenticidad y trazabilidad de los aceites de oliva [10,58-73]. Ambas son consideradas como métodos oficiales para identificar ácidos grasos y ceras, la primera y triacilgliceroles (TAGs), la segunda. En cromatografía gaseosa, los ácidos grasos son convertidos a FAMES (ésteres metílicos de ácidos grasos) y posteriormente detectados con un detector de ionización de llama (FID) [62,74-78]. El estudio del perfil de ácidos grasos puede detectar adulteraciones de aceites de oliva vírgenes con aceites de girasol [41], aceites desodorizados [79] y aceites vegetales [80]. Diversos autores han estudiado los TAGs en aceites de oliva, determinados mediante HPLC con detector de índice de refracción (HPLC-IR) y quimiometría [59,75,81,82] lo cual ha permitido determinar el origen geográfico de aceites de oliva monovarietales [83]. Además de ácidos grasos, por cromatografía de gases (GC-FID), también se determinan otros compuestos: hidrocarburos como el escualeno, que es un constituyente importante en aceites de oliva vírgenes y es utilizado para distinguir entre aceites de oliva refinados y crudos [84], compuestos volátiles [85-87], esteroides [74,76] que han sido utilizados para caracterizar aceites de oliva vírgenes monovarietales [88], alcoholes, empleados para verificar aceites de oliva vírgenes [89], usados para determinar la calidad del aceite de oliva [30], detectar adulteraciones [90] y determinar la variedad utilizada en los aceites. La cromatografía líquida con detección de diodos en fila (HPLC-DAD) es usada en la determinación de compuestos fenólicos [91,92]. También existen ejemplos de combinación de GC y HPLC [93,94], por ejemplo, para determinar tocoferoles, los cuales son usados como marcadores en la autenticidad de aceites de oliva. Sin embargo,

las técnicas cromatográficas son lentas, caras, necesitan preparación de muestra y gasto de disolventes. Por lo tanto, las técnicas cromatográficas compiten con nuevos métodos basados en técnicas espectroscópicas, isotópicas y de elementos traza. Lo ideal sería contar con técnicas rápidas, de bajo coste, que permitiesen operar en línea y que ofreciesen un análisis completo del aceite de oliva, ya que está formado por una matriz compleja de elementos. Ferrari y col. proponen el uso de calorimetría en la autenticación del aceite de oliva, mostrando que las curvas de fusión y congelación por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de aceite de oliva y otros aceites comestibles pueden ser relacionadas con la calidad, origen y proceso de almacenamiento del aceite de oliva [95]. Chiavaro y col. mostraron diferencias en los perfiles DSC de cinco aceites de oliva comerciales: aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva, aceite de oliva refinado, aceite de orujo de oliva y aceite de orujo de oliva refinado [96]. En otro estudio [97], los autores mostraron la posibilidad de detectar aceite de avellana refinado en aceite de oliva virgen extra, mediante DSC. Recientemente, Chatziantoniou y col. han empleado DSC en combinación con Análisis Discriminante Lineal (LDA) para estudiar cuatro tipos de aceites de oliva vírgenes extra monovarietales, procedentes de cuatro regiones griegas. Los porcentajes de determinación correcta de la variedad y el origen geográfico fueron del 97.3% y 88.5%, respectivamente [98]. La espectroscopia de fluorescencia de excitación-emisión también ha sido utilizada para detectar la adulteración del aceite de oliva virgen extra con otros aceites de menor calidad, como aceites de orujo de oliva. Presenta ventajas como velocidad de análisis, que no necesita reactivos y que las cantidades de muestra necesarias son pequeñas [99]. En la determinación de elementos traza se han empleado plasma inductivamente acoplado-espectrometría de emisión atómica, (ICP-AES) [100,101], plasma inductivamente acoplado-espectrometría de masas (ICP-MS) [102,103] o espectrometría de absorción

atómica, AAS [99,101] permitiendo la detección de adulteraciones y la caracterización de aceites de oliva.

A continuación se muestra, más detalladamente, la aplicación de las técnicas espectroscópicas vibracionales (MIR, NIR y Raman), de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (de isótopos estables –IRMS-, ICP-MS, de movilidad iónica (IMS), espectrometría de masas con reacciones de transferencia de protones, PTR-MS, cromatografía de gases-espectrometría de masas, GC-MS, espectrometría de masas de espacio de cabeza, HS-MS...) y otras técnicas innovadoras como análisis de ADN, nariz y lengua electrónicas. Para ello se comienza con un pequeño resumen sobre los fundamentos de cada técnica y algunas aplicaciones en el sector agroalimentario, para posteriormente centrarnos en la detección de adulteración del aceite de oliva con aceites de calidad inferior y en el aseguramiento de su origen geográfico.

5.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que estudia la materia a través de la formación de iones en fase gaseosa que se detectan y se caracterizan por su masa y carga [104]. Puede ayudar a identificar compuestos desconocidos y cuantificar sustancias químicas conocidas. Se basa en la formación de iones que se separan según su relación masa / carga y finalmente son detectados. De modo general, las técnicas de espectrometría de masas se dividen en "blandas" y "duras". En el primer caso hay poca fragmentación permitiendo así la determinación de la masa molecular, mientras que en el segundo caso se producen muchos fragmentos que mediante la interpretación adecuada de las diferentes rupturas puede conducir a la identificación del compuesto. Como se representa en la *Figura. 1.5*, las partes principales que se pueden identificar en un espectrómetro de masas son: sistema de introducción de muestra,

fuente de ionización, analizador de masas (que separa los iones en función de sus relaciones m/z) y el detector.

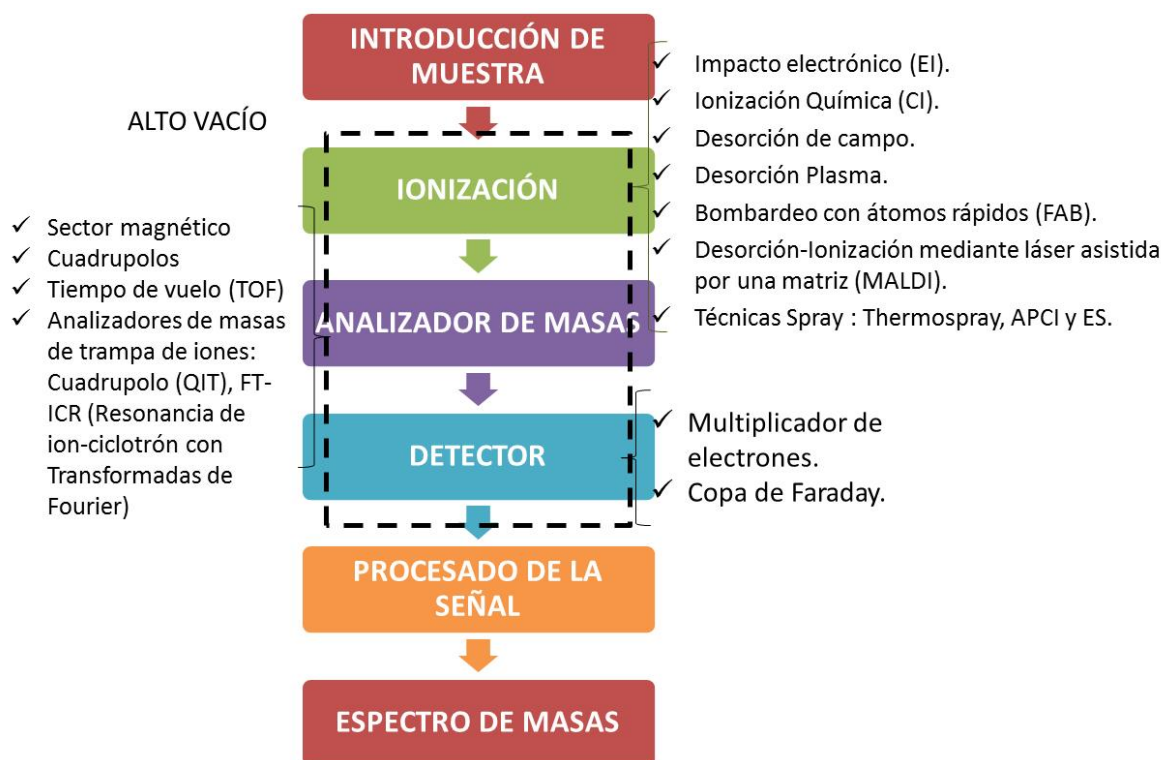


Figura 1.5. Esquema general de un espectrómetro de masas.

Dada la compleja naturaleza de las muestras, y en particular del aceite de oliva, la espectrometría de masas generalmente se utiliza acoplada a una técnica de separación (GC, HPLC o electroforesis capilar, CE). Las fuentes de ionización pueden ser Impacto electrónico (EI), Ionización química (CI), Desorción-Ionización mediante láser asistida por una matriz (MALDI), Electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI), siendo estas dos últimas bastante comunes en sistemas HPLC. Dentro de los analizadores de masas encontramos el TOF (tiempo de vuelo), cuadрупolo, triple cuadрупolo, con trampa de iones, resonancia de ion-ciclotrón con transformadas de

Fourier (FT-ICR)...Dentro de los detectores, podemos citar los multiplicadores de electrones y la copa de Faraday.

La espectroscopia de masas es una técnica analítica que presenta una alta especificidad y selectividad, la combinación con cromatografía permite detectar analitos en muestras complejas, en muy bajas concentraciones, pero es una técnica que generalmente necesita preparación de muestra y consume bastante tiempo. En este sentido las técnicas de espectroscopia vibracional, por ejemplo, son más rápidas.

La espectrometría de masas es ampliamente utilizada en el análisis de alimentos, ya sea para la determinación de compuestos de origen natural (hablándose en este caso de calidad alimentaria), tales como lípidos, oligosacáridos, proteínas, vitaminas, flavonoides, compuestos fenólicos ... o xenobióticos (seguridad alimentaria), tales como pesticidas, residuos de medicamentos, toxinas o los contaminantes procedentes del embalaje, por citar algunos de ellos [105-110].

Algunas de las ventajas que hacen que la espectrometría de masas sea especialmente adecuada para análisis de calidad y seguridad alimentaria son la alta sensibilidad, selectividad y capacidad de análisis automatizado de muestras [110].

Se trata de una técnica muy empleada en las llamadas “ómicas” alimentarias (“foodomics”), que pretenden dar una visión global de los alimentos evaluando su composición, los efectos de los procesos (bio) tecnológicos empleados en su producción, sus modificaciones a través del tiempo y el impacto que tiene el consumo de alimentos en la salud humana [111-113].

Existen muchos ejemplos de aplicación de la espectrometría de masas a diferentes productos alimenticios (jamón, queso, leche, vinos, aceite de oliva...) [114]. En aceites de oliva, se ha utilizado HPLC-APCI-MS y análisis discriminante, para

Capítulo 1

analizar TAGs y determinar la adulteración de aceites de oliva vírgenes extra con 10-50% de aceite de avellana, resultando claramente diferenciados los aceites de avellana, las mezclas y los aceites de oliva, en función a la composición de triglicéridos [115]. De forma similar, se han caracterizado por HPLC-APCI-MS aceites de oliva vírgenes extra de distintos cultivares. Los resultados se evaluaron aplicando análisis de componentes principales (PCA), análisis de función discriminante (DFA) y LDA, obteniéndose una correcta clasificación y un 99% de predicción para tres tipos de variedades italianas [72]. Lís y col. estudiaron TAGs, mediante HPLC-APCI-MS y PCA, en aceites de oliva adulterados con diferentes concentraciones de aceites de girasol, identificándose hasta un 1% de adulterante [116]. Agozzino y col. emplearon el mismo método anterior para determinar el origen varietal de aceites de oliva sicilianos, aplicando análisis discriminante general (GDA) [117]. Fasciotti y col. aplicaron HPLC-APCI-MS-MS para determinar la adulteración de aceites de oliva con aceites de soja, mediante el estudio de los TAGs [118]. En otras investigaciones se ha recurrido al empleo de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), utilizando distintos tipos de fuentes de ionización para detectar, cuantificar e identificar adulteraciones de aceites de oliva vírgenes extra con aceites de girasol, maíz, cacahuete y coco, estudiando la fracción lipídica. Se aplicaron métodos quimiométricos como Soft Independent Modeling of Class Analogies (SIMCA) y k vecinos más cercanos (KNN), capaces de predecir adulterantes en más del 91% de los casos y de identificarlos en un 88% de ellos [119]. Sakouhi y col. analizaron la fracción lipídica total de la variedad tunecina Sayali, para determinar la autenticidad de su aceite, utilizando GC/MS con impacto electrónico. Los autores estudiaron los esteroides, alcoholes triterpénicos y alifáticos, 4-monometilesteroides y compuestos aromáticos. Para aislar los volátiles de la fracción lipídica utilizaron microextracción en fase sólida (SPME). También se estudió

la adulteración con aceites de avellana, mostrando que el aceite de oliva y el de avellana presentan unos perfiles de ácidos grasos y de TAGs muy similares, pero los alcoholes triterpénicos y del monometilesterol presentan diferencias en los dos aceites [120]. Steenbergen y col. utilizaron GC/MS para determinar glicidilesteres, contaminantes que se forman en el procesado de aceites comestibles [121]. Goodacre y col. emplearon electrospray-espectrometría de masas (ESI-MS), junto a quimiometría para determinar diferencias de metabolitos en aceites vegetales y aceites de frutos secos, proponiendo el método para detectar adulteración de aceites de oliva con aceite de avellana [122]. Catharino y col. clasificaron aceites vegetales de acuerdo a su origen biológico, detectando adulteraciones de aceites de oliva con aceites de soja [123]. La aplicación de fuentes de ionización por electrospray y de ionización por fotospray a presión atmosférica (APPI) a cuadrupolo tiempo de vuelo (QqTOF), dió resultados complementarios para la autenticación del aceite de oliva. Así, el electrospray es más sensible para determinar triglicéridos y la APPI lo es para mono y diglicéridos. El método permitió discriminar entre mezclas de aceites de oliva con otros aceites vegetales (en especial el de avellana que presenta una composición química muy similar a la del aceite de oliva), utilizando PCA y LDA [124]. Lerma-García y col. aplicaron la técnica de electrospray-espectrometría de masas, clasificando aceites de oliva comerciales de distintas calidades (virgen extra, virgen, lampante y de orujo de oliva refinado), evaluando mezclas entre ellos. Para ello aplicaron técnicas quimiométricas como LDA, regresión lineal múltiple (MLR) y regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) [125]. En otro trabajo, utilizaron un método rápido y simple, basado en espectrometría de masas de infusión directa, junto con LDA, para determinar ácidos grasos libres y componentes fenólicos y clasificar las variedades más comunes en el mercado español (Hojiblanca, Arbequina y Picual) [126]. Alves y col. desarrollaron un

método rápido, fiable, sensible y reproducible, utilizando electrospray con infusión directa, que permite identificar y distinguir entre aceites de oliva vírgenes extra, aceites de oliva y aceites de oliva adulterados con distintos aceites vegetales (soja, girasol, maíz y cáñola) [127]. Otros autores utilizaron la técnica de espacio de cabeza, HS/MS, para determinar volátiles en aceites de oliva [128], analizar mezclas de aceites de oliva de alta calidad con aceites de oliva de baja calidad (aceite de orujo) y con otros aceites vegetales (aceite de girasol) [129] y determinar la adulteración de aceites de oliva vírgenes y aceites de oliva comerciales con aceite de avellana. Al no existir separación cromatográfica, obtuvieron una señal global, por lo que se requirió la aplicación de técnicas quimiométricas (PCA y PLS) [130]. La técnica HS/MS ha sido aplicada de forma satisfactoria para estudiar el origen geográfico de aceites de oliva analizando la fracción volátil de aceites de oliva vírgenes extra de cinco zonas diferentes del Mediterráneo y aplicando técnicas quimiométricas (PCA y DLA) [131]. López-Feria y col. aplicaron esta técnica en distintos trabajos, donde caracterizaron diversos aceites de oliva según su calidad sensorial. Los compuestos volátiles se transfirieron directamente desde el vial al detector, sin separación cromatográfica, considerando el espectro obtenido como una huella dactilar empleada con fines clasificatorios. Los autores construyeron un modelo de clasificación que atiende a dos clases principales (aceite de oliva virgen extra y aceite lampante), clasificados previamente en función de atributos sensoriales positivos y negativos, comparándose los resultados obtenidos con los proporcionados por un panel de cata [132]. También clasificaron aceites de oliva vírgenes extra de acuerdo a su variedad, DOP y origen geográfico y estudiaron los atributos sensoriales [133] desarrollando un método que permitió discriminar entre aceites de oliva vírgenes, a partir de sus propiedades sensoriales negativas y positivas, aplicando PLS y SIMCA [134]. Runcio y col. determinaron compuestos volátiles en

aceites italianos mediante HS-SPME, para estudiar la influencia de los cultivares, de los métodos de procesado y de la antracnosis en la calidad del aceite de oliva [33]. Sánchez-Hernández y col. publicaron dos trabajos para determinar aminoácidos no proteicos y betaínas por CE-MS para detectar adulteraciones en aceites de oliva con otros aceites vegetales [39,135].

Como se comentó anteriormente, el análisis de elementos traza mediante ICP-MS también ha sido aplicado a aceites de oliva. Llorent-Martínez y col. determinaron el contenido de elementos traza en distintos tipos de aceites comestibles producidos en España (de oliva virgen, de oliva, de orujo de oliva, girasol, soja y maíz). Se pudo agrupar muestras del mismo tipo de aceite utilizando un modelo con dos componentes principales y 75,3% de varianza [103]. La técnica también ha sido utilizada para determinar el origen geográfico de aceites de oliva virgen de dos variedades cultivadas en cuatro regiones italianas, cuantificando 18 elementos traza en aceites, empleando LDA [102].

La espectrometría de masas por reacción de transferencia protónica (PTR-MS) se basa en el estudio de compuestos orgánicos volátiles y ha sido utilizada para evaluar la autenticidad en alimentos [136,137]. Se compone de una fuente de ionización que está conectada directamente a un tubo de deriva y a un sistema de análisis (Q o TOF). En aceites de oliva, se ha aplicado para determinar el origen geográfico [138], detectar alteraciones oxidativas que dan rancidez al aceite [139] o estudiar la influencia del grado de madurez de la aceituna en la calidad del aceite de oliva [140]. Ruiz-Samblás y col. identificaron aceites de oliva virgen extra monovarietales a partir de su huella espectral, estudiando sus compuestos volátiles [141].

Capítulo 1

Otras técnicas emergentes en el campo del aceite de oliva son la espectrometría de movilidad iónica (IMS) y la espectrometría de masas de isótopos estables (IRMS). La técnica IMS fue introducida por Karasek y Cohen en el año 1970. Es una técnica sensible para la detección, identificación y seguimiento de compuestos químicos a nivel de trazas en diferentes matrices. Presenta una rápida respuesta, con bajo precio, alta sensibilidad y simplicidad en el análisis [142]. La principal diferencia entre MS e IMS es que la primera produce la separación de iones en vacío y la IMS realiza la separación a presión atmosférica. De ahí que los valores de resolución de la MS sean bastantes superiores a los de la IMS. La IMS se puede usar acoplada a GC, HPLC y MS, entre otras. Actualmente, la principal aplicación de esta técnica se centra en la detección de explosivos en aeropuertos [143,144] aunque también es utilizada en medicina, en control de la calidad de fármacos, análisis industriales, medioambientales y agroalimentarios (cerveza, vinos, carnes, leche...). En el área de la adulteración de alimentos se ha aplicado, por ejemplo, para verificar la alimentación de cerdos [145]. Garrido-Delgado y colaboradores la aplicaron para discriminar entre tres grados de aceites de oliva: aceites de oliva vírgenes extra, aceites de oliva y aceites de orujo de oliva. Los autores utilizaron UV-IMS y GC-IMS, obteniendo una buena clasificación [146]. En otro trabajo, los autores acoplaron una trampa Tenax TA al UV-IMS para mejorar la sensibilidad y selectividad. Así, determinaron aldehídos C3-C6 en aceites de oliva [147]. La combinación de GC-IMS y quimiometría permitió clasificar los aceites de oliva como “lampante”, “virgen” o “virgen extra” con una tasa del 97% [148].

La técnica IRMS permite el análisis de los isótopos estables ligeros de C, H, O, N y S en muestras de diversa procedencia. J.J. Thompson, en 1912, descubrió la existencia de los isótopos de neón, en sus ensayos con “rayos positivos”, pero fue su discípulo Aston, quien descubrió los isótopos estables de los elementos más importantes

[149]. Las variaciones en la abundancia isotópica natural se atribuyen al “fraccionamiento isotópico”. Este fraccionamiento es debido a que, aunque los isótopos de un mismo elemento tienen las mismas propiedades químicas, difieren en sus propiedades físicas y físico-químicas, ya que poseen diferente masa. Así, las moléculas que contengan el isótopo pesado de un determinado elemento, comparadas con las portadoras del isótopo ligero, tendrán diferente peso, volumen, punto de ebullición... La composición isotópica de C, H y O está relacionada con condiciones climáticas y características geográficas. La relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ muestra la influencia de factores como humedad, temperatura, precipitación a través del CO_2 ambiental y permite discriminar entre el origen botánico de las plantas (C3, C4 y CAM). Las relaciones $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ y $^2\text{H}/^1\text{H}$ están influidas por parámetros como latitud, altitud, distancia al mar, temperatura...

La variación de la abundancia natural de isótopos estables se expresa mediante la notación delta:

$$\text{ratio } (R) = \frac{\text{abundancia del isótopo pesado}}{\text{abundancia del isótopo ligero}}$$

$$\delta = \left(\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{std}}} - 1 \right)$$

Donde, R_{muestra} y R_{std} representan la relación de la abundancia del isótopo pesado frente al isótopo ligero en la muestra y un estándar de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA), respectivamente. Los valores δ son generalmente multiplicados por 1000, mostrándose en partes por mil. Los estándares primarios para cada uno de los elementos son CDT (Canyon Diablo Troilite) para S, VSMOW

Capítulo 1

(Vienna Standard Mean Ocean water) para O e H, AT-AIR (Atmospheric Air) para N y VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) para C y O.

Luo y col. estudiaron las variaciones en contenido en deuterio en plantas C3 y CAM [150]. Martin y Martin investigaron la influencia de la climatología en los valores de $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ [151]. Iacumin y col. abordaron la influencia de los factores climáticos en la composición isotópica de aceites italianos [152].

Las técnicas IRMS se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios. Si se tiene en cuenta el tipo de medida que se desea realizar se habla de BSIA (Bulk stable isotope analysis) que determina la composición másica global de una muestra, CSIA (Compound-specific stable isotope analysis) que mide la relación isotópica para un compuesto específico y PSIA (Position-specific isotope analysis), en la cual el análisis específico es realizado por SNIF-RMN (site-specific natural fractionation-nuclear magnetic resonance) y es la técnica IRMS la que se aplica a la totalidad de la muestra, aportando información complementaria [153-155]. Antes de ser analizada, la muestra ha de ser transformada en productos gaseosos. La determinación de C y N es llevada a cabo tras la combustión de la muestra, usando un Analizador elemental conectado al IRMS (EA-IRMS). Así, el C y N son determinados como CO_2 y N_2 , respectivamente. En el caso de la determinación de H u O, la muestra ha de ser transformada en H_2 y CO , respectivamente, mediante pirólisis, utilizando la técnica Py-IRMS. La determinación de O e H en muestras líquidas puede ser realizada mediante un sistema de equilibrado Gas-Bench-IRMS, basado en el análisis de la composición isotópica de un gas en equilibrio con la muestra líquida (Véase *Apartado 3.2* del Capítulo 3).

La técnica IRMS se puede aplicar a numerosos campos, como la geología, meteorología, medicina, medio ambiente, alimentación... En esta última disciplina se ha

aplicado a distintos productos para garantizar su autenticidad. Guillou y col. describieron la técnica pirólisis-espectrometría de masas (Py-MS) como técnica que presenta ventajas en el campo de análisis de alimentos [156], habiéndose aplicado con éxito en la determinación del origen geográfico de mantecas de cacao y aceites de oliva, quesos, vinagres y caracterización de vinos. Goodacre y col. utilizaron Py-MS para estudiar adulteraciones en zumos de naranja y leche [157,158]. Giménez-Miralles y col. emplearon la técnica IRMS de ^{13}C junto con SNIF-NMR (^2H NMR) para determinar el origen geográfico de vinos tintos [159]. Ogrinc y col. analizaron 102 muestras de vino procedentes de tres regiones diferentes, mediante la combinación de las técnicas IRMS y SNIF-RMN, determinando la autenticidad, el origen geográfico y la cosecha [160]. Suzuki y col. analizaron los valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en arroces polacos, desarrollando un método para discriminar el origen geográfico [161]. Heaton y col. analizaron carnes de vacuno de distintas regiones del mundo mediante IRMS e ICP-MS, encontrando diferencias entre vacas alimentadas con plantas C3 y C4 [162]. Longobardi y col. predijeron la procedencia geográfica de patatas italianas, basándose en el estudio de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ por EA-IRMS, $\delta^{18}\text{O}$ por Py-IRMS) y en el análisis de compuestos volátiles (HS-SPME/GC-MS) [163]. Vinci y col. presentaron a la técnica IRMS como muy prometedora en el campo de la autenticidad de alimentos de origen animal [164]. Tosun estudió la adulteración de mieles con sirope de azúcar mediante la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ [165]. Zhao y col. aplicaron la técnica de IRMS en la autenticidad y trazabilidad de productos agroalimentarios [166].

Respecto al uso de IRMS para estudiar las muestras de aceite de oliva, la bibliografía es relativamente escasa, aunque la técnica ha ganado un gran interés en los últimos años, sobre todo para la determinación geográfica, teniendo en cuenta la variación de la composición isotópica con algunos factores geográficos (por ejemplo,

Capítulo 1

altitud, distancia al mar ...). En relación a la autenticidad, Angerosa y col. encontraron que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los fracciones de alcoholes alifáticos de aceites de orujo como adulterantes eran significativamente más negativos que los de aceites de oliva vírgenes y refinados [167]. Cristea y col. discriminaron entre diferentes aceites vegetales (oliva, palma, girasol y maíz) mediante la relación $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ se encontraban entre -29,98 ‰ y -28,46 ‰ para las muestras de aceite de oliva. Los valores medios de aceite de palma y de girasol fueron muy similares (-30,33 ‰ y -30,20 ‰, respectivamente), y los del aceite de maíz difirieron significativamente de los otros tres aceites vegetales, como resultado de los diferentes ciclos fotosintéticos (C4 y C3, respectivamente) [168].

En cuanto a la determinación del origen geográfico mediante IRMS, Salter y col. determinaron el origen geográfico de aceites italianos vírgenes extra, procedentes de cinco regiones diferentes (Sicilia, Abruzzo, Lazio, Cerdeña y Puglia). Los aceites fueron analizados por triplicado mediante Py-MS. Se aplicó PCA y análisis de variación canónica (CVA) para discriminar los aceites en función de la región de procedencia y mediante redes neuronales artificiales (ANN) se separaron los aceites pertenecientes a la misma región [169]. Angerosa y col. midieron los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ de aceites de Grecia, Marruecos, España, Italia, Túnez y Turquía observando que los aceites producidos en Marruecos, Túnez y España presentaban un enriquecimiento en $\delta^{18}\text{O}$, debido a sus temperaturas más elevadas y clima seco, a diferencia de Grecia y Turquía que al tener un clima más templado, debido a la cercanía al mar, presentaban valores más bajos de $\delta^{18}\text{O}$. En los valores de $\delta^{13}\text{C}$ no observaron mucha diferencia [170]. Aramendía y col. estudiaron los valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en aceites de oliva andaluces. En un primer estudio encontraron que los valores medios de $\delta^{18}\text{O}$ de la temporada 2005/2006 eran más altos que los de la temporada 2004-2005 que fue más

fría [171]. En un estudio posterior, hallaron que el índice de madurez de la aceituna no influye en la abundancia de ninguno de los tres isótopos. En cuanto a la variedad de aceituna, esta parece influir en los valores isotópicos. No se observó ninguna influencia clara de la altitud y latitud, lo cual puede ser debido a que se produce un cambio en la variedad de aceituna con la altitud y la latitud, enmascarándose estas influencias [172]. Por último, las muestras de aceites de oliva andaluces cosechados en la temporada 2005-2006 pudieron distinguirse de los italianos de la misma campaña [173]. Camin y col. estudiaron la autenticidad de aceites de oliva vírgenes extra italianos, de cinco temporadas consecutivas, mediante IRMS (C, H y O) e ICP-MS (composición mineral en 26 elementos). Se encontraron diferencias significativas entre los diferentes años de cosecha y en algunos casos entre las DOP en la misma región. Empleando valores de $\delta^2\text{H}$, se obtuvo una buena discriminación geográfica [174]. Alonso-Salces y col. combinaron IRMS y RMN para autenticar aceites de oliva vírgenes extra sicilianos. Para ello estudiaron el espectro de ^1H RMN junto a los valores isotópicos de C e H, proporcionando éstos últimos información geográfica complementaria a las huellas dactilares de ^1H RMN [175]. Chiavaro y col. utilizaron la determinación de TAGs y ácidos grasos junto con la proporción de isótopos estables $\delta^{18}\text{O}/\delta^{16}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}/\delta^{12}\text{C}$ y propiedades térmicas para evaluar la trazabilidad del aceite de oliva virgen extra de dos países mediterráneos (Italia y Croacia), obteniendo valores diferentes para $\delta^{18}\text{O}$ y para las propiedades térmicas según la procedencia geográfica y la variedad a la que pertenecían dichos aceites [176]. Karabagias y col. estudiaron 47 aceites procedentes de la parte occidental de Grecia y determinaron distintos parámetros, como acidez, índice de peróxidos, K_{232} , K_{270} , composición en ácidos grasos, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$... para clasificar las muestras según su origen geográfico. Mediante análisis quimiométrico por análisis

multivariante de la varianza (MANOVA) y LDA obtuvieron una tasa de clasificación del 94,5% [177].

5.2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

La espectroscopia vibracional consiste en el estudio de los niveles de energía de vibración de moléculas. Incluye varias técnicas no destructivas (Infrarrojo –IR- y Raman) que permiten obtener información sobre la estructura molecular de una muestra. Algunas de sus ventajas asociadas, en comparación con otras técnicas son la medición rápida y la posibilidad de recuperar la muestra. El espectro de la muestra es único, como una huella dactilar, lo que confiere a estas técnicas una alta selectividad y un alto grado de precisión.

La *Figura 1.6* muestra el espectro electromagnético identificándose la región correspondiente a la transición entre niveles vibracionales moleculares.

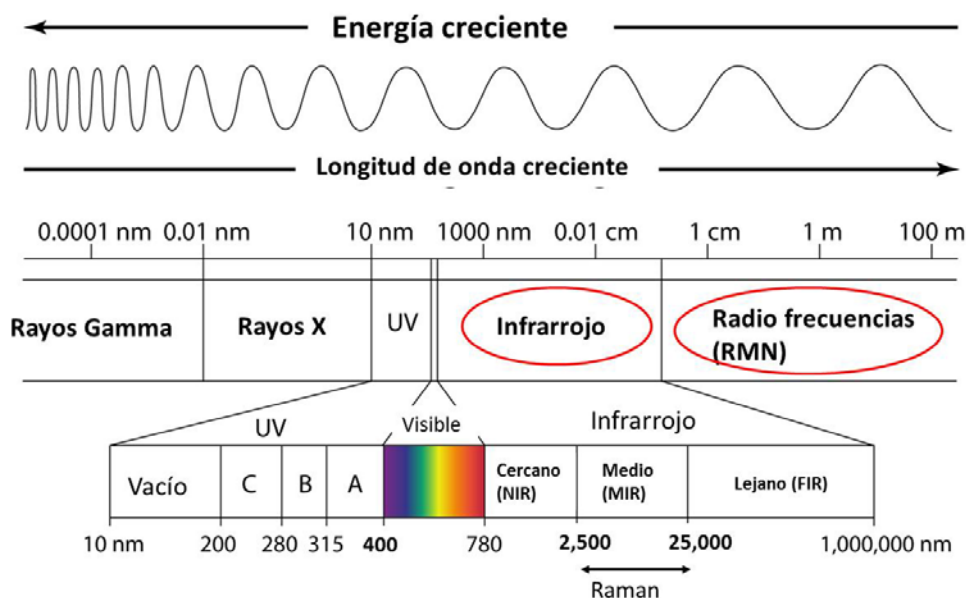


Figura 1.6. Espectro electromagnético identificando la zona de las espectroscopias vibracionales (IR y Raman), así como la RMN.

5.2.1. Espectroscopia infrarroja (IR)

Las técnicas de espectroscopia infrarroja (IR) permiten conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular de un compuesto y son muy utilizadas actualmente por la industria. Tienen múltiples aplicaciones en agricultura, medioambiente, biotecnología, alimentación, medicina o textiles, por citar algunos ejemplos. Comprende las longitudes de onda (λ) entre 780 nm y 10^6 nm y está dividida en tres regiones: IR cercano (NIR), donde se producen las absorciones debidas a sobretonos y la combinación de las bandas fundamentales, IR lejano (FIR), donde se producen las absorciones debidas a cambios rotacionales e IR medio (MIR), donde tienen lugar las vibraciones fundamentales, siendo esta región utilizada para la determinación estructural de compuestos orgánicos [178].

Algunas de las ventajas de la espectroscopia IR frente a otras técnicas son la reducción de costes y tiempo, fácil preparación de la muestra, posibilidad de analizar muestras en estado gaseoso, líquido y sólido y adecuación para estudios en-línea. Además, la aparición de los espectrómetros con Transformadas de Fourier (FT) hizo que se redujesen la relación señal-ruido y se evitase la pérdida de resolución. Como desventajas de la técnica, se puede citar que la presencia de agua en las muestras puede afectar a la fiabilidad de los resultados y la necesidad de aplicar técnicas quimiométricas. El análisis cuantitativo y cualitativo se basa fundamentalmente en la obtención de espectros de absorción ($\log 1/R$ o $\log 1/T$) de un grupo de muestras de características cuantitativas (ácidos grasos, humedad...) o cualitativas (procedencia geográfica, variedad...) para posteriormente obtener un modelo quimiométrico que relacione la información de los espectros con las características de las muestras.

5.2.1.1. Infrarrojo cercano (NIR)

El análisis de productos agroalimentarios basado en la absorción en la región del infrarrojo cercano surge en la década de los 70 del pasado siglo. Desde entonces, esta técnica ha ido evolucionando hasta nuestros días, siendo muy utilizada en el campo de la industria agroalimentaria, medicina, medio ambiente, farmacia, etc. Muchos autores han aplicado esta técnica al análisis de alimentos [179-184]. Blanco y col. en su revisión explicaron los fundamentos, quimiometría utilizada y aplicaciones de la espectroscopia NIR [185]. Los espectros NIR (780-2500 nm), muestran varios picos solapados, que hacen difícil un estudio cuantitativo. Estas bandas son el resultado de sobretonos (armónicos primero y segundo) y combinación de las vibraciones fundamentales, debidas a las vibraciones del hidrógeno que aparecen en el infrarrojo medio [186]. Como ya se ha comentado anteriormente, la espectroscopia NIR presentan desventajas en el análisis de muestras con gran contenido de agua (picos entre 1440 y 1930 nm), ya que los puentes de hidrógeno y la temperatura de la muestra puede afectar a la fiabilidad de los resultados [187]. En la *Figura 1.7* se puede observar un espectro NIR típico de un aceite de oliva virgen extra. Baeten y col. identificaron las bandas más relevantes [188] (*Tabla 1.1*). Existen distintas formas de obtener los espectros en NIR, usando métodos de transmisión o de reflectancia, algunos de ellos ilustrados en la *Figura 1.8*. Los equipos se pueden dividir en dispersivos (con uso de monocromador) o con FT (utilizan interferogramas de Michelson), ofreciendo estos últimos una magnífica sensibilidad y rapidez.

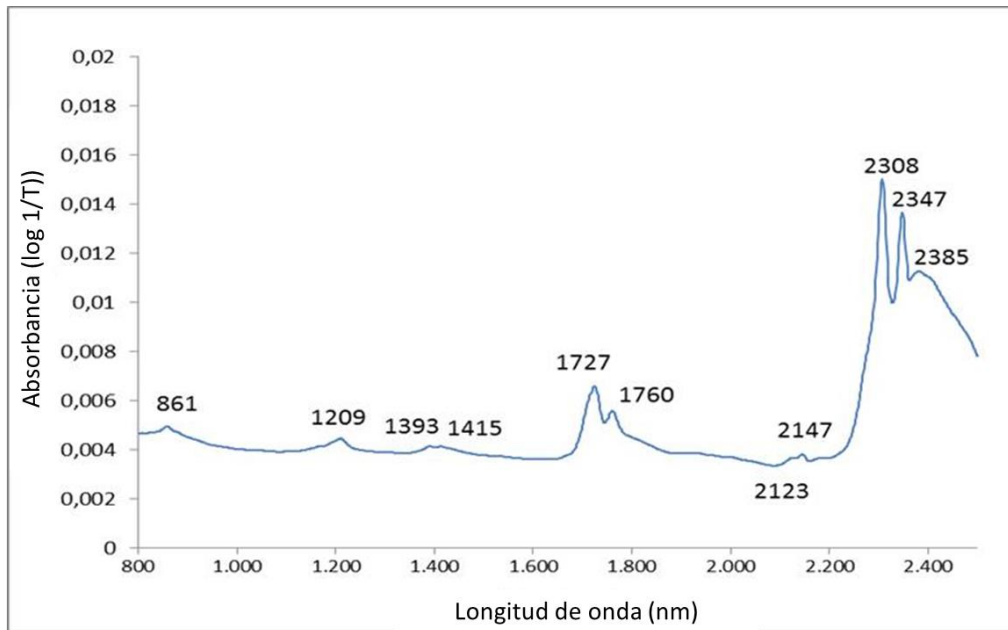


Figura 1.7. Espectro NIR de un aceite de oliva virgen extra. Para asignación de bandas, ver *Tabla 1.1.*

Tabla 1.1. Asignación de las diferentes señales NIR de un aceite de oliva (adaptado de [188])

LONGITUD DE ONDA (nm)	MOLÉCULA	GRUPO	VIBRACIÓN
1090-1180	-CH ₂	C-H	2º armónico
1100-1200	-CH ₃	C-H	2º armónico
1150-1260	-CH=CH-	C-H	1er armónico
1350-1430	-CH ₂	C-H	Combinación
1360-1420	-CH ₃	C-H	Combinación
1390-1450	H ₂ O	O-H	1er armónico
	-CH ₂		
1650-1780	-CH ₃	C-H	1er armónico
	-CH=CH-		
1880-1930	H ₂ O	O-H	Combinación
2010-2020	-CH=CH-	C-H	Combinación
2100-2200	-CH=CH-	C-H	Combinación
2240-2360	-CH ₃	C-H	Combinación
2290-2470	-CH ₂	C-H	Combinación

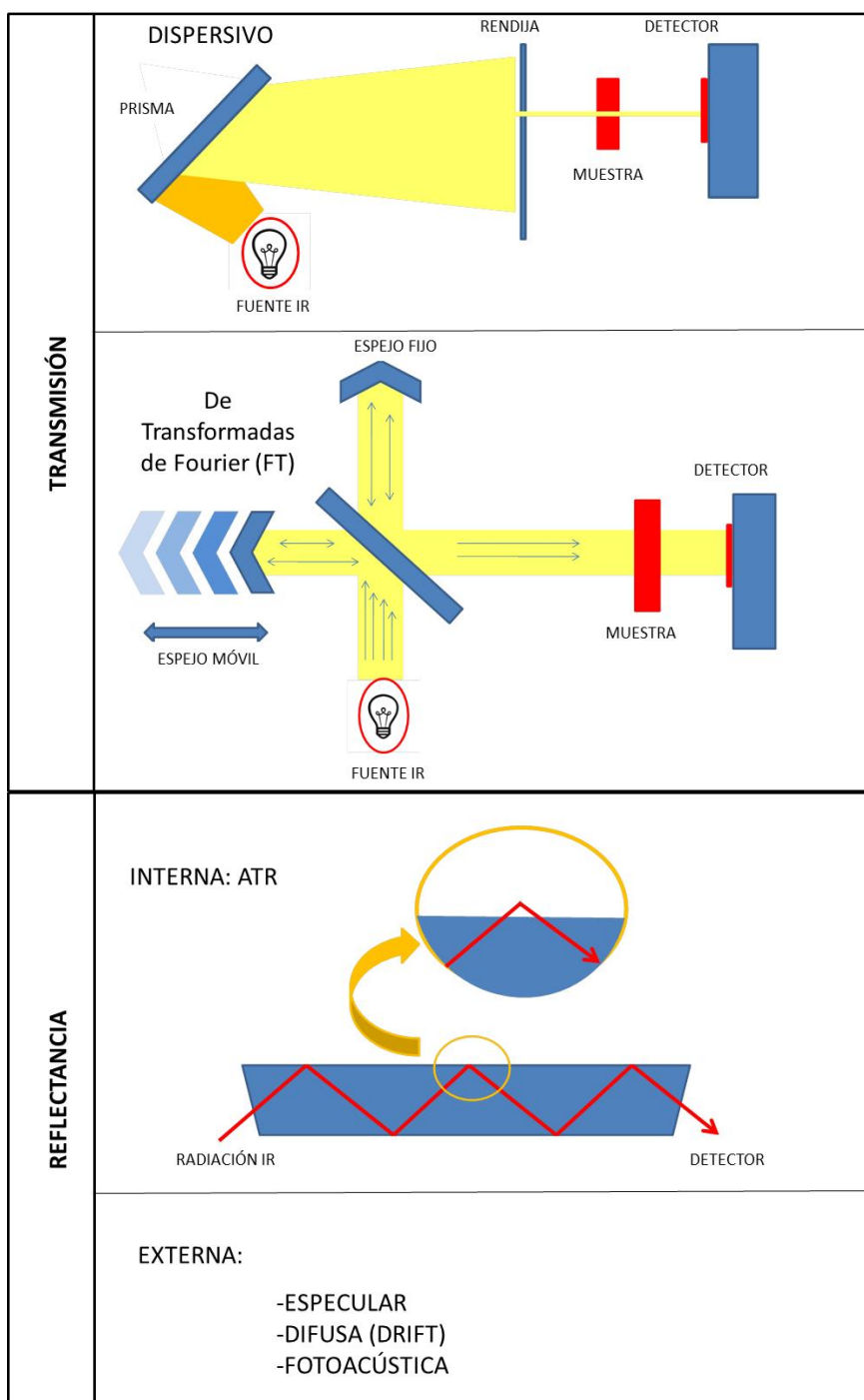


Figura 1.8. Clasificación de las diferentes técnicas de espectroscopia IR.

La espectroscopia NIR ha sido utilizada para determinar la adulteración de productos lácteos. Así, por ejemplo, en leche en polvo, se han detectado mediante NIR, proteínas vegetales de soja, trigo y guisantes [189] y adulterantes comunes (almidón,

suerdo de leche y sacarosa) [190]. Kasemsumran y col. determinaron la adulteración de leche con agua o suero de leche [191]. Mauer y col. diferenciaron entre leche infantil adulterada o no adulterada con melamina, mediante FT-IR y NIR [192]. En frutas, verduras y cereales, Contal y col. detectaron y cuantificaron la presencia de manzana como adulterante en purés de fresas y frambuesas mediante Vis/NIR [193]. Saranwong y Kawano determinaron la presencia de fungicidas en la superficie de tomates [194]. Cocchi y col. detectaron la adulteración de harina de trigo duro con harina de pan común [195]. En bebidas, se ha estudiado, por ejemplo, la adulteración de jarabe de arce [196], zumos de manzana [197] y bebidas alcohólicas destiladas [198]. En vinos, Cozzolino y col. llevaron a cabo diversos estudios destinados a la predicción de los compuestos fenólicos, el seguimiento de la fermentación o la discriminación de vinos de diferentes orígenes varietales [199-201]. De forma similar, Garde-Cerdán y col. describieron el empleo de la espectroscopia IR para discriminar entre vinos [202].

En lo referente a los estudios de grasas y aceites, la espectroscopia NIR puede dar información sobre el grado de hidrogenación (índice de yodo) y el tipo de insaturación (% grasas cis o trans) [104,203-206]. Garrido-Varo, García-Olmo y Pérez-Martín, describieron algunas tendencias y desarrollos de esta técnica para autenticar aceites y grasas [207]. Cho e Iwamoto determinaron el grado de adulteración del aceite de sésamo con otros aceites como soja, cáñola, maíz, algodón, etc. y mantequilla y otras grasas, respectivamente [208]. Sato y col. determinaron, de forma rápida, la composición de ácidos grasos en grasas y aceites (mantequilla, manteca de cerdo, aceite de soja y aceite de palma...) mediante NIR [209]. Chen y Chen desarrollaron ecuaciones de calibración para espectroscopia de transmisión con el fin de predecir distintos parámetros de calidad (acidez, índice de peróxidos, viscosidad, color). Además, obtuvieron ecuaciones de calibración para la predicción de oleico y linoleico,

Capítulo 1

cuya relación permite la detección instantánea de la pureza de mezclas de aceites de soja con otros aceites vegetales [210]. Garrido-Varo y col. desarrollaron y evaluaron métodos quimiométricos con NIR para predecir la presencia de grasas animales en mezclas de aceites [211].

En la *adulteración de aceites de oliva*, Wesley y col. desarrollaron un método para determinar los adulterantes (aceites de maíz, girasol y aceite de orujo de oliva crudo) en dichos aceites, mediante PCA, obteniendo una correcta predicción en el 98% de las muestras analizadas y un 75% en el tipo de adulterante [212]. En otro estudio, identificaron y cuantificaron la presencia de tres adulterantes (girasol, colza y soja) en aceites de oliva virgen, en proporciones de 5 a 95%, utilizando PCA para identificar correctamente el tipo de adulterante y PLS para predecir el nivel de adulteración [212]. Downey y col. utilizaron la tecnología Vis-NIR para detectar y cuantificar la adulteración de aceites de oliva virgen extra con aceite de girasol. Los autores estudiaron tres intervalos de longitudes de onda: 400-2498 nm, 400-750 nm (visible) y 1100-2498 nm (infrarrojo cercano) y emplearon análisis clúster, SIMCA para realizar la clasificación y PLS para la cuantificación. De este modo, pudieron detectar adulteraciones incluso del 1% en peso [213]. Hourant y col., clasificaron aceites vegetales (maíz, oliva, palma, soja, girasol, coco...) y grasas animales (sebo y pescado) mediante NIR y cromatografía gaseosa de alta resolución (HPGC), aplicando análisis discriminante, tomando las regiones de 1700 a 1800 y de 2100 a 2400 nm, obteniendo una clasificación del 90% de las muestras [214].

Christy y col., en sus estudios de adulteración de aceites de oliva con otros aceites (maíz, soja, nuez, avellana y girasol) utilizaron los espectros completos en la región de $9000\text{-}4500\text{ cm}^{-1}$ (1111,1-222,2 nm), en lugar de zonas concretas de los espectros, ya que cuando una muestra está adulterada, todo el espectro se ve afectado,

reflejándose así en los resultados, que muestran una mejor predicción que si se estudian sólo algunas zonas concretas. El procedimiento fue adecuado para la detección de adulterantes previamente identificados [215]. Kasemsumran y col. determinaron la presencia de adulterantes en aceites de oliva, analizando 280 aceites adulterados con cuatro tipos de aceites diferentes (avellana, maíz, soja y girasol), utilizando Análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales (DPLS) y modelos de calibración PLS para cuantificar los adulterantes [216]. Ozturk y col. determinaron la adulteración de aceites de oliva con otros aceites vegetales (soja, algodón, maíz, cáñola y girasol) utilizando el análisis multivariante, en concreto método genético por mínimos cuadrados invertidos (GILS), y demostraron que esta combinación hace posible determinar adulteraciones a diferentes concentraciones [217].

Con respecto al estudio del *origen geográfico* de los aceites, Bertrán y col. propusieron un método para discriminar dos aceites de oliva (Siurana y Les Garrigues), con características muy similares, constituidas por la variedad Arbequina en un 90% y de origen geográfico muy próximo. Los autores obtuvieron resultados de clasificación bastante satisfactorios recurriendo a técnicas quimiométricas, como las redes neuronales artificiales (ANNs) y regresión logística (LR) [218]. Downey y col. emplearon espectros NIR y UV para clasificar diversos aceites de oliva virgen extra de la zona mediterránea oriental, en función de su origen geográfico. Utilizaron PLS, DFA y ANN, obteniéndose los mejores resultados con DFA. Los autores concluyeron que el NIR es una técnica muy capaz de clasificar aceites de oliva en función de su origen geográfico [219]. Galtier y col. cuantificaron ácidos grasos y triglicéridos, previamente determinados mediante GC y HPLC, respectivamente, aplicando FT-NIR y tratamientos quimiométricos a 125 muestras de aceites de oliva virgen franceses pertenecientes a cinco zonas geográficas con DOP. Los autores emplearon PLS-DA para la

cuantificación de ácidos grasos y PCA para clasificar las distintas DOP, obteniendo unos resultados bastante satisfactorios, a pesar de las similitudes en cuanto a composición de cultivares entre las DOP [220]. Woodcock y col. emplearon la espectroscopia NIR por transflectancia para estudiar 913 muestras de aceites de oliva europeos de distinta procedencia, pertenecientes a tres campañas (2005, 2006 y 2007). El propósito era la discriminación entre aceites de Liguria (Italia) y de otros lugares. Los mejores resultados (92,8 y 81,5% para la predicción de muestras de Liguria y de no-Liguria, respectivamente) se obtuvieron mediante PLS-DA [221].

5.2.1.2. Infrarrojo medio (MIR)

El espectro MIR de los aceites de oliva (2500-40000 nm ó 400-4000 cm^{-1} aprox.) contiene picos bien resueltos (3100-1721 cm^{-1}) y picos solapados en la región de la huella dactilar (1500-700 cm^{-1}). Guillén y col. caracterizaron diversos aceites comestibles mediante FT-IR, relacionando su composición con la frecuencia de ciertas bandas concretas de la región de huella dactilar [222]. En la *Figura 1.9* se muestra un espectro MIR típico de aceite de oliva. Baeten y col. muestran las asignaciones en las bandas más relevantes en el espectro del aceite de oliva [188] (*Tabla 1.2*).

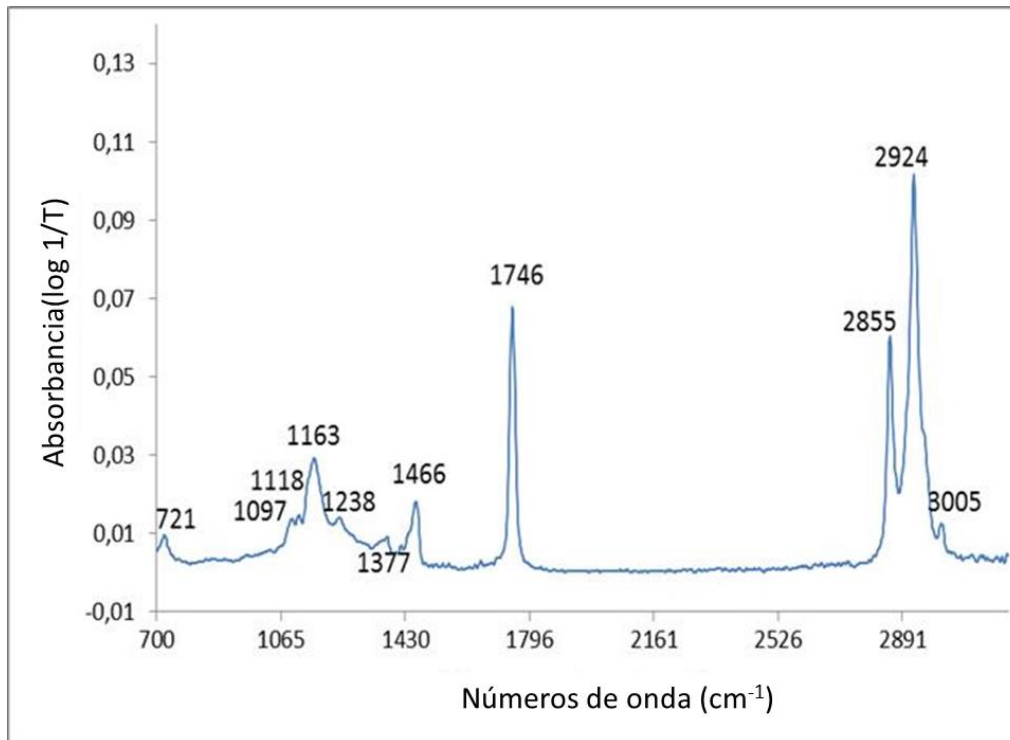


Figura 1.9. Espectro MIR típico de una muestra de aceite de oliva virgen extra. Para asignación de las bandas, véase *Tabla 1.2*.

Tabla 1.2. Asignación de las diferentes señales MIR de un aceite de oliva. ν y δ denotan tensión y flexión, respectivamente (adaptado de [188]).

NÚMEROS DE ONDA (cm ⁻¹)	MOLÉCULA	ENLACE	VIBRACIÓN
3007	=C-H (cis)	C-H	ν
2955	-CH ₃	C-H	ν
2924	-CH ₂	C-H	ν
2855	-CH ₂	C-H	ν
1746	-C=O	C=O	ν
1653	-C=C- (cis)	C=C	ν
1462	-CH ₂	C-H	δ
1377	-CH ₃	C-H	δ
1236	-CH ₂	C-H	δ
1300-800	Esqueleto de carbono	C-C	δ
1200-1000	-CO-O-	C-O	δ
990-960	Trans-CH=CH-	C-H	δ
723	-CH ₂	C-H	δ

Hasta hace muy poco, la aplicación de la espectroscopia MIR a los productos alimentarios era bastante escasa, ya que presentaba varias desventajas (los alimentos suelen ser opacos, el agua absorbe fuertemente en la región MIR ...). No obstante, como señalan Baeten y col. [188] el desarrollo de nuevos métodos de muestreo, el uso de la transformada de Fourier (FT) y los instrumentos de reflectancia total atenuada (ATR) han contribuido a que el análisis de las muestras de alimentos por espectroscopia MIR se convierta en rutina. Así, los espectrómetros con monocromador (dispersivos) han sido desplazados por los espectrómetros FT-IR, ya que mejoran la relación señal-ruido y permiten una calibración interna de frecuencias, al mismo tiempo que un análisis de los datos. Por otro lado, la aparición de la reflectancia total atenuada (ATR) tuvo un impacto en el progreso de la espectroscopia de MIR, permitiendo obtener alguna información que no es posible con la espectroscopia de transmisión (dispersiva y FT-IR). La única condición es que la muestra debe estar en contacto íntimo con el cristal (ZnSe o KRS-5).

Existen muchos trabajos en los que se usa la espectroscopia MIR para detectar adulteraciones o determinar el origen geográfico de distintos productos alimentarios.

Lachenmeier y col. aplicaron la espectroscopia infrarroja junto con análisis multivariante para evaluar la autenticidad de distintas bebidas alcohólicas y cervezas [223]. En la detección de adulteración de zumos, Vardin y col. usaron la espectroscopia MIR y quimiometría para detectar la adulteración de concentrado de zumo de granada (el cual tiene propiedades anticancerígenas y efectos terapéuticos contra el cáncer de próstata en humanos) con concentrado de zumo de uva más barato [224]. Holland y col. determinaron la adulteración del jarabe de fresa con manzana, ciruela, azúcares, zumo de uva tinta y compota de riubarbo [225]. Pappas y col. llevaron a cabo un estudio sobre la diferenciación de leche de cabra y oveja por espectroscopia infrarroja

de reflectancia difusa con transformada de Fourier (DRIFT) [226]. Woodcock y col. estudiaron la autenticidad y calidad de los quesos mediante NIR y MIR [227]. Karoui y col. determinaron el origen geográfico de los quesos suizos pertenecientes a las DOP de Gruyère y L'Etivaz, mediante MIR y análisis de función discriminante (DFA). Sin embargo, en este caso, el uso de la espectroscopia de fluorescencia condujo a una mejor clasificación (80% y 100%, respectivamente) [228]. En la adulteración de productos cárnicos; Al-Jowder y col. discriminaron entre distintos tipos de carne según la especie [229] mientras que Ellis y col. lo hicieron dentro de la misma especie [230]. En mieles, Bertelli y col. estudiaron la clasificación de mieles italianas utilizando la espectroscopia MIR junto con análisis multivariante [231]. También ha sido descrita la autenticidad del origen geográfico y botánico de mieles mediante MIR [232,233].

Dupuy y col. emplearon la técnica, complementada con PCA, para clasificar aceites y grasas comestibles [234]. Goodacre y Anklam aplicaron la espectroscopia MIR para la identificación rápida de manteca pura de cacao y de sus mezclas con otras grasas vegetales [235]. Se ha presentado como una técnica rápida para la determinación de ácidos grasos libres (FFA) en aceites comestibles (bandas a 1573 cm^{-1}) [236] y aceites de oliva (utilizando dos intervalos de longitud de onda: $1775\text{-}1689\text{ cm}^{-1}$ y $1480\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$) [237]. Rohman y col. estudiaron la adulteración del aceite de hígado de bacalao con distintas grasas animales (grasa de pollo [238], de vaca [239] y de cordero [240]) o con aceites vegetales, tales como el de maíz [241]. Los autores estudiaron, asimismo, la adulteración de aceite de coco virgen con aceite de palma [242]. Zhang y col. examinaron la autenticidad de aceites vegetales comestibles (maíz, cacahuete, cáñola y soja) adulterados con aceite de freír usado [243]. Deng y col. mediante MIR, con SIMCA y PLS-DA, determinaron la adulteración de aceite de sésamo con aceites de soja, maíz, colza y palma [244].

En la adulteración de aceites de oliva, Lai, y col. estudiaron la aplicación de la técnica FTIR, junto con PCA, en la detección de adulteraciones de aceite de oliva virgen extra con aceite refinado [245]. Küpper y col. evaluaron la espectroscopia ATR para analizar muestras de aceite de oliva virgen extra de distintas zonas del mediterráneo y adulteradas con aceite de girasol [246]. Tay y col. determinaron la autenticidad de diversos aceites de oliva adulterados con aceites de girasol. Las muestras fueron clasificadas como puras o adulteradas mediante PCA, mientras que el método PLS permitió determinar la concentración de adulterante presente [247]. Ozen y Mauer determinaron la adulteración de aceites de oliva vírgenes extra con aceites de avellana, girasol u otros aceites vegetales, empleando análisis discriminante (DA) y mínimos cuadrados parciales (PLS), obteniendo una correcta clasificación y unos límites de detección del 2% para girasol y del 25% para aceites de avellana [248]. Vlachos y col. utilizaron FT-IR para determinar la adulteración de aceite de oliva virgen extra con otros aceites de menor calidad (girasol, soja, maíz y sésamo) [249]. Gurdeniz y col. analizaron aceites de oliva virgen extra monovarietales de tres variedades diferentes. Mediante PCA y PLS pudieron clasificarlos de manera satisfactoria, diferenciándolos de mezclas de variedades [250]. Allam y Hamed detectaron adulteraciones de aceites de oliva vírgenes con aceites de oliva refinados y otros aceites vegetales (girasol, maíz y soja) [251]. Obeidat y col. estudiaron aceites de oliva vírgenes adulterados con aceites de girasol y de maíz en distintas proporciones (25, 50 y 75%), utilizando PCA, análisis clúster y PLS-DA [252]. Lerma-García y col. clasificaron aceites en función de su origen botánico y determinaron la composición de mezclas de aceite de oliva virgen extra con aceites más baratos (girasol, maíz, soja y avellana) [253]. Maggio y col. estudiaron, cualitativa y cuantitativamente, aceites vegetales como adulterantes en aceites de oliva vírgenes extra comerciales [254]. Oussama y col. detectaron y

cuantificaron adulteraciones de aceites de oliva virgen extra con aceite de soja y de girasol, aplicando PLS [255]. Javidnia y col. mostraron la capacidad de la espectroscopia MIR para discriminar entre aceites diferentes (maíz, soja, girasol, cánoa, mantequilla y oliva), mediante PLS-DA y CVA, presentando este último método una mejor calibración [256]. Rohman y col. estudiaron, en diversos trabajos, distintos adulterantes en aceites de oliva, como aceites de palma [257], aceites de maíz y girasol [258] así como mezclas de aceites de oliva con aceites de salvado de arroz [259], manteca de cerdo [260] o aceite de cánoa [261]. De la Mata y col., mediante ATR-FTIR, aplicando PLS-DA, pudieron distinguir aceites de oliva puros de aceites de oliva mezclados con otros aceites vegetales, incluyendo aceites de oliva de diferentes categorías [262].

Con respecto a la procedencia geográfica de aceites de oliva, Tapp y col. estudiaron aceites de oliva de cuatro países europeos mediante FTIR con análisis multivariante (PLS-LDA y algoritmo genético-análisis discriminante lineal, GA-LDA), presentando mayor tasa de éxito la combinación GA-LDA [263]. Bendini y col. analizaron distintos aceites de oliva vírgenes extra italianos utilizando la zona de huella dactilar ($1500-900\text{ cm}^{-1}$) para determinar parámetros de calidad (como contenido en ácidos grasos libres e índice de peróxidos) y clasificarlos según su origen geográfico [264]. Caetano y col. clasificaron aceites de oliva virgen extra mediante dos técnicas quimiométricas, árboles de clasificación y regresión (CART) y máquina de vectores de soporte (SVM), observando que los SVM condujeron a mejores resultados que los CART [265]. Gurdeniz y col. clasificaron aceites de oliva turcos en función de la campaña de recolección y de su origen geográfico [266]. Hennessy y col. mostraron el uso de la FT-IR con PCA, DA y PLS para confirmar el origen geográfico de aceites de oliva virgen extra de Liguria [267]. Aouidi y col. emplearon MIR para discriminar

entre cinco cultivares tunecinos diferentes, mediante el análisis de sus hojas. La discriminación fue realizada por PCA y la clasificación mediante PLS- DA [268].

La espectroscopia NIR tiene dos ventajas principales en comparación con la MIR: La luz del infrarrojo cercano penetra más profundamente en las muestras y la absorción de agua en el NIR no es tan fuerte como en el MIR, con lo que no hay necesidad de utilizar accesorios adicionales (como el ATR). Entre las desventajas cabe señalar la baja sensibilidad a algunos componentes minoritarios, pero esto va a depender de las especies químicas y la complejidad de la matriz que se analice [269].

5.2.2. Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman fue descubierta en 1928 por C.V. Raman [270]. Es una técnica basada en la dispersión inelástica de luz monocromática. Cuando la luz alcanza a la muestra con una frecuencia ν_0 , una parte es dispersada. La mayor parte de la luz dispersada tendrá la misma frecuencia que la luz incidente (dispersión de Rayleigh). Sin embargo, también hay luz dispersa que posee una energía diferente al haz incidente (hablándose, en este caso, de desplazamiento Raman), lo cual puede dar información acerca de los niveles vibracionales de las moléculas. En este caso hay dos situaciones diferentes, llamadas líneas Stokes y anti-Stokes y corresponden a valores de energía más bajos o más altos que el de la luz incidente, respectivamente [271].

Existen varios tipos de espectroscopias Raman: Raman dispersivo, FT-Raman (Espectroscopia Raman con transformada de Fourier), SERS (Espectroscopia Raman ampliada en superficie) y SORS (Espectroscopia Raman compensada espacialmente). La técnica FT-Raman, disponible desde 1987, es, probablemente, la más utilizada. En ella el análisis espectral es logrado usando un interferómetro y transformadas de Fourier. Una de las principales diferencias del Raman en comparación con la

espectroscopia IR es la disposición perpendicular del detector con respecto a la fuente de radiación, al estar interesados en la luz dispersada, no la transmitida (*Figura 1.10*). Además, los fundamentos de ambas técnicas son diferentes, así como las reglas de selección, lo que hace que sean complementarias. Así, para que una transición entre niveles vibracionales sea activa en infrarrojo, debe haber un cambio en el momento dipolar de la molécula, mientras que en Raman se requiere un cambio en la polarizabilidad. Esto se traduce en que el Raman es preferible a IR cuando la fuerte absorción del agua puede ser un problema. Los grupos polares (por ejemplo, C = O y OH) presentan fuertes bandas en el infrarrojo medio, mientras que los grupos no polares (C = C) muestran bandas intensas en Raman. Esto hace al Raman una técnica adecuada para distinguir entre dobles enlaces cis o trans, en los ácidos grasos insaturados (banda a 1660 o 1670 cm^{-1} , respectivamente).

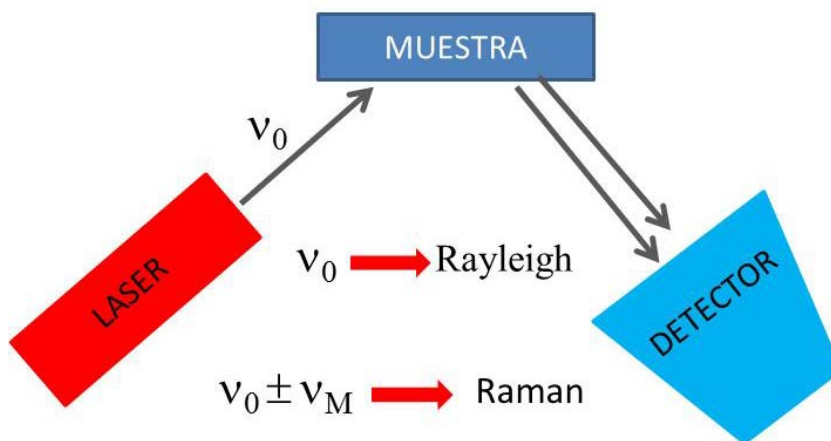


Figura 1.10. Esquema de un equipo de espectroscopia Raman.

Al igual que para el IR, en Raman se pueden analizar muestras en estado sólido, líquido o gaseoso sin necesitar ninguna preparación de la muestra. Los espectros Raman suelen abarcar el intervalo 100-4000 cm^{-1} . Además, aunque los equipos Raman solían ser bastante caros, su precio en la actualidad es relativamente más asequible, lo que

unido al hecho de la complementariedad de la técnica con el IR ha hecho que este tipo de instrumentación sea bastante habitual en los laboratorios de análisis, encontrando aplicaciones en muy diversos campos (alimentación, bioquímica, medio ambiente, geología, farmacia, medicina...[272]

En el ámbito agroalimentario, y centrándonos en la adulteración de alimentos, existen diversos estudios de aplicación de espectroscopia Raman. Así, Almeida y col. discriminaron entre leches en polvo adulteradas y no adulteradas [273]. Uysal y col. determinaron la adulteración de mantequilla con margarina [274]. En cuanto a la determinación del origen geográfico, se ha aplicado con éxito a la miel Europea [275] y arroz [276], por citar algunos ejemplos.

En el sector del aceite de oliva, se ha utilizado para seguir la degradación de los carotenoides inducida por calor [277]. A menudo se emplea la espectroscopia Raman para determinar el índice de yodo y el contenido de isómeros cis/trans [278-280]. La región de 1660 a 1265 cm^{-1} está relacionada con el perfil de ácidos grasos. Muestras ricas en poliinsaturados presentan un máximo a unos 1657 cm^{-1} , mientras que las grasas monoinsaturadas lo hacen en torno a 1655 cm^{-1} . La intensidad de estas bandas aumenta con la insaturación. Hacia 1259 cm^{-1} aparece una banda cuya intensidad disminuye con el grado de insaturación. La región de la huella dactilar (1100-700 cm^{-1}), proporciona información varietal, pero la relación señal a ruido es muy pobre [188,281]. Un espectro Raman típico de una muestra de aceite de oliva virgen extra se representa en la *Figura 1.11*, mientras que la asignación de las bandas se puede encontrar en la *Tabla 1.3*.

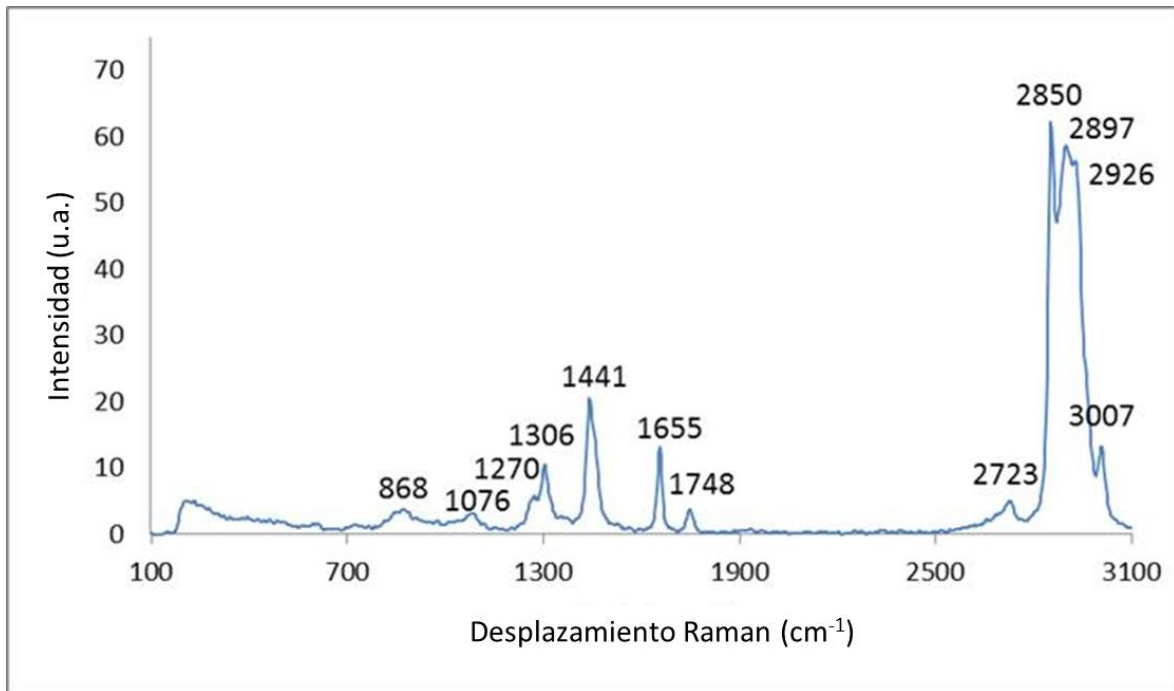


Figura 1.11. Espectro Raman típico de un aceite de oliva virgen extra. La asignación de bandas típicas puede observarse en la *Tabla 1.3*.

Tabla 1.3. Asignación de las bandas típicas Raman de una muestra de aceite de oliva (ν y δ denotan tensión y flexión, respectivamente (adaptado de [188])).

SEÑAL RAMAN (cm ⁻¹)	MOLÉCULA	GRUPO	VIBRACIÓN
3007	RCH=CHR	=C-H	ν
2926	-CH ₂	C-H	ν
2897	-CH ₃	C-H	ν
2850	-CH ₂	C-H	ν
1748	RC=OOR	C=O	ν
1655	CIS RCH=CHR	C=C	ν
1441	-CH ₂	C-H	δ
1306	-CH ₂	C-H	δ
1265	CIS RCH=CHR	=C-H	δ
1076	-(CH ₂) _n -	C-C	ν
868	-(CH ₂) _n -	C-C	ν

Capítulo 1

Para la diferenciación varietal del aceite de oliva virgen, Aparicio y Baeten emplearon las bandas a 2880-2840 cm^{-1} (vibración de tensión -C-H, $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$). En esta región los aceites ricos en ácidos monoinsaturados presentan bandas más intensas que los poliinsaturados [282]. La combinación FT-Raman con análisis multivariante permite buenos resultados en la predicción del nivel de adulteración de aceites de oliva con aceites de soja, orujo y maíz a diferentes concentraciones [283]. Baeten y col. analizaron 138 muestras de aceites y grasas comestibles diferentes, tanto de origen vegetal (nuez de Brasil, coco, maíz, girasol alto oleico, aceite de oliva, de cacahuete, de palma, almendra, colza, soja, girasol) como animal (mantequilla, pescado hidrogenado y sebo) [284]. Los autores extrajeron correlaciones, tanto para el grado de insaturación como para predecir las cantidades de SAFA, MUFA y PUFA. El-Abassy y col. utilizando la espectroscopia Vis-Raman, encontraron que la región 945-1600 cm^{-1} (la cual incluye bandas correspondientes a carotenoides) puede ser utilizada como región de huella dactilar para predecir el contenido en ácidos grasos libres en aceite de oliva virgen extra [285].

López-Díez y col. estudiaron la adulteración de aceites de oliva vírgenes extra con aceites de avellana, utilizando PLS para cuantificar el nivel de aceite de avellana presente [286]. Heise y col. discriminaron entre aceites vegetales y detectaron la presencia de aceites de girasol y de avellana en aceites de oliva vírgenes [287]. Zou y col. propusieron un método para detectar la presencia de adulterantes en aceite de oliva basado en relacionar las intensidades de las bandas de vibración de enlaces cis ($=\text{C-H}$) y cis (C=C), normalizados con respecto a la banda a 1441 cm^{-1} (CH_2). El método permitió distinguir aceites de oliva genuinos de aceites de oliva que contienen un 5% (en volumen) de otros aceites comestibles (aceites de soja, girasol, colza y maíz) [288].

El-Abassy y col. emplearon la espectroscopia Vis Raman y PCA para clasificar distintos aceites vegetales (oliva, sésamo, ajo, colza, girasol, nuez, soja...). Además, la combinación de Raman con PLS les permitió detectar adulteraciones de aceite de oliva virgen extra con aceite de girasol (5-100% v/v) [289]. Zhang y col. estudiaron aceites de oliva vírgenes extra adulterados con aceites comestibles más baratos. Para ello, los espectros fueron normalizados a 1441 cm^{-1} (CH₂) y se aplicó un método de estándar externo (ESM), para el análisis cuantitativo, comparándose con el método de máquina de vectores de soporte (SVM) concluyendo que el primer método es prometedor para la autenticación de aceites de oliva virgen extra [290].

En un estudio diferente, Zhang y col. emplearon un método basado en componentes principales para autenticar aceites de oliva puros, identificando el nivel de adulteración con aceites de soja, cánoa, girasol y maíz [291]. Dong y col. predijeron la composición de ácidos grasos de cuatro aceites de oliva virgen extra y once aceites vegetales diferentes (oliva, cánoa, cacahuete, camelia, soja, girasol y maíz) y mezclas de ellos. El modelo de predicción se llevó a cabo mediante mínimos cuadrados parciales junto a máquina de vectores soportados (PLS-SVM), tomándose como método de referencia GC [292].

Con respecto a la autenticación del origen geográfico, Korifi y col. combinaron la espectroscopia Raman con PLS y PLS-DA para autenticar seis DOP francesas. El método permite clasificar el 92,3% de las DOP francesas y el 100% de las muestras DOP que contenían únicamente uno de los principales cultivares. Los autores concluyeron que los porcentajes de ácidos grasos y triacilglicéridos en aceites de oliva pueden ser utilizados para autenticar aceites de oliva de DOP francesas [293].

5.3. ESPECTROSCOPIA RMN

La técnica de RMN se remonta a la década de 1940 [294] y fue pensada inicialmente para el análisis de las estructuras en disolución. El desarrollo posterior de los imanes y los materiales ha permitido ampliar el campo de aplicación, siendo en la actualidad una técnica polivalente. Se aplica a diversos campos como la física, la ingeniería, la biología, la farmacia, la medicina, el medio ambiente y ciencia de los alimentos. En este último campo, el número de publicaciones ha ido aumentando considerablemente en los últimos años, al ser una técnica que tiene ciertas ventajas como la simplicidad de los procedimientos de preparación de muestras y de medición. Se trata de una técnica no destructiva (la muestra se recupera intacta después de los experimentos) y hace que sea posible el estudio de casi cualquier elemento de la tabla periódica (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{23}Na , ^{27}Al , ^{29}Si ...). Los únicos núcleos que no son activos en RMN son los que tienen número másico (A) y número atómico (Z) par (por ejemplo, $^{12}\text{C}_6$, $^{16}\text{O}_8$).

Cuando los núcleos magnéticos se colocan en un campo magnético (B_0), se alinean en un número predecible y finito de orientaciones.

Tomando el ejemplo del protón (^1H), hay dos posibles alineaciones (paralela o antiparalela al campo magnético). La población de los núcleos orientados en el sentido del campo magnético externo (denominada población alfa) es ligeramente superior a orientada en sentido antiparalelo al campo (población beta). Sin embargo, se puede provocar un cambio de orientación aplicando una pequeña energía, en el rango de las radiofrecuencias. De hecho, en teoría, la energía (o frecuencia) necesaria para cada tipo de núcleo vendría dada por:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

Donde ν es la resonancia de Larmor, γ es la constante giromagnética (que depende del núcleo considerado) y B_0 es la intensidad del campo magnético. En el caso del ^1H , la constante giromagnética es de $26.753 \cdot 10^7$ rad/s T, lo que significa que si $B_0=2.3488$ T, la frecuencia es 100 MHz. Por este motivo, lo que vulgarmente se conoce como un equipo de 100MHz es aquél que tiene un campo magnético de 2.3488 T.

Sin embargo, el campo magnético que un núcleo “siente” (el campo magnético local) variará ligeramente en función del entorno químico, lo cual, de hecho, nos sirve para obtener información estructural. Así, desde un punto de vista práctico, la frecuencia de Larmor es:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0(1 - \sigma)$$

donde, σ es la llamada constante de apantallamiento, que considera el ambiente químico. Los datos de RMN se expresan como desplazamiento químico, esto es, la diferencia entre la frecuencia de resonancia del núcleo considerado y otro tomado como estándar. Generalmente los resultados son multiplicados por un millón (se expresan en partes por millón o ppm) de acuerdo a la llamada escala en delta:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} 10^6$$

donde ν y ν_{ref} representan la frecuencia de resonancia de los núcleos considerado y de referencia, respectivamente.

Los espectrómetros de RMN presentan varios componentes (*Figura 1.12*), siendo los más importantes: campo magnético (imán), sonda, generador de

radiofrecuencia (RF), sistema de detección y amplificación y un digitalizador que convierta la señal y permita almacenarla en el equipo. Al final de cada pulso se obtiene la FID (Free Induction Decay) que se compone de un interferograma complejo de oscilaciones amortiguadas, a partir del cual, mediante la transformada de Fourier, se obtiene el espectro de resonancia normal. Una buena relación señal/ruido se consigue con la manipulación matemática de la FID, antes de aplicar la transformada de Fourier.

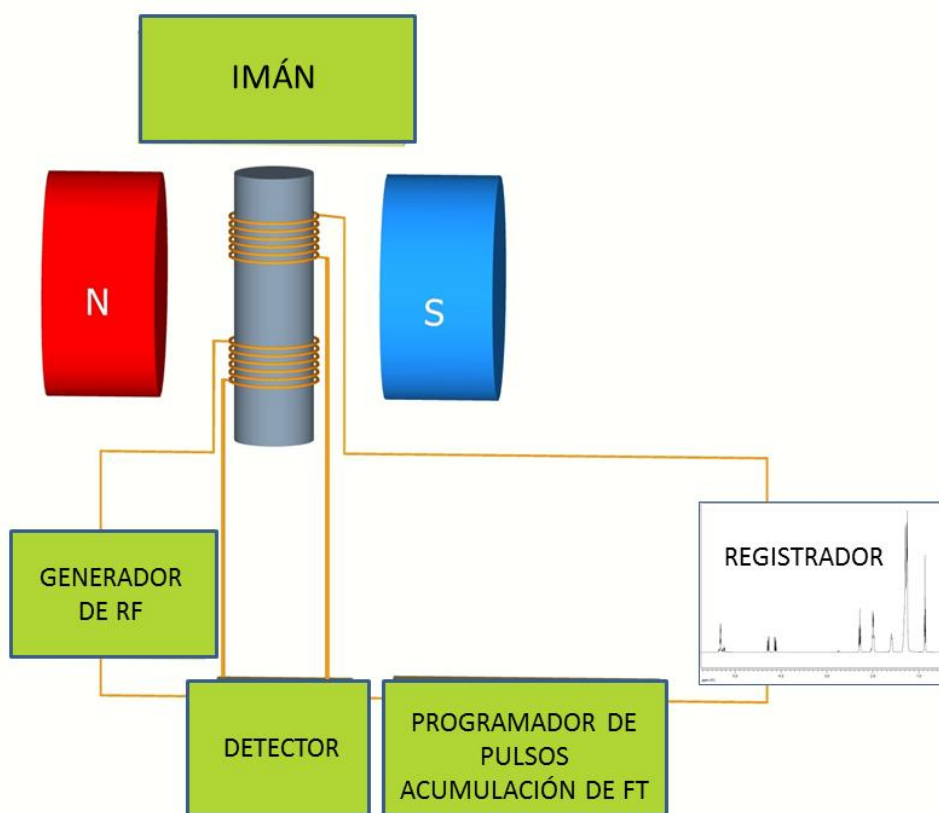


Figura 1.12. Esquema general de un equipo de RMN.

La técnica RMN es muy aplicada en el campo de la alimentación, a productos como mieles, aceites, bebidas, quesos, carnes... Lindner y col. propusieron el uso de las relaciones $D/H(CH_3)$ en etanol obtenido por fermentación de mieles de cítricos para confirmar su autenticidad [295]. Del mismo modo, Cotte y col. estudiaron la relación

D/H para diferenciar ciertas variedades monoflorares de mieles [296], mientras que Lolli y col. aplicaron RMN de alta resolución (HR-NMR) y métodos de análisis multivariante (PCA y GDA) para identificar y clasificar las mieles de cinco fuentes florales diferentes [297]. En el sector de las bebidas, se ha empleado, por ejemplo, para determinar el origen y la calidad de los zumos [298,299], cervezas [300], o vinos [301]. Consonni y Cagliani estudiaron la composición química, física y enzimática del queso parmesano para discriminar geográficamente [302]. Debido a la preocupación por la encefalopatía espongiforme bovina, Jung y col. utilizaron RMN de protón combinado con análisis multivariante para diferenciar el origen de muestras de carne de vacuno [303].

En aceites de oliva, las técnicas más usadas para determinar su autenticidad son RMN de ^1H y ^{13}C , y últimamente también se aplica ^{31}P [304-307]. La RMN de ^1H presenta una alta sensibilidad, ya que el protón tiene una alta abundancia natural (99,985%) y alta constante giromagnética ($26.753 \cdot 10^7$ rad/s·T). Por el contrario, la ^{13}C RMN es menos sensible, ya que la abundancia natural del ^{13}C es sólo el 1,1% y su constante giromagnética es de $6.728 \cdot 10^7$ rad/s·T. Sin embargo, la resolución en los espectros RMN de ^{13}C es significativamente mayor que en los de ^1H RMN, ya que las escalas van desde 0 a 200 ppm para el carbono y de 0 a 12 ppm para el protón. Desde el punto de vista práctico, la adquisición de un espectro de ^{13}C RMN lleva más tiempo que la de uno de ^1H RMN, especialmente cuando se desea un estudio cuantitativo. En el caso del ^{31}P , la resolución es incluso superior a la de ^{13}C RMN pero la aplicación de la técnica al aceite de oliva requiere derivatización usando el reactivo de fósforo 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil dioxafosfolano [308].

Las Figuras 1.13 y 1.14 muestran, respectivamente, el espectro de RMN de ^1H y ^{13}C de una muestra de aceite de oliva virgen extra. Para más detalles sobre su interpretación, véase [172,309-312]. Para el espectro de RMN de ^{31}P , ver [305,307].

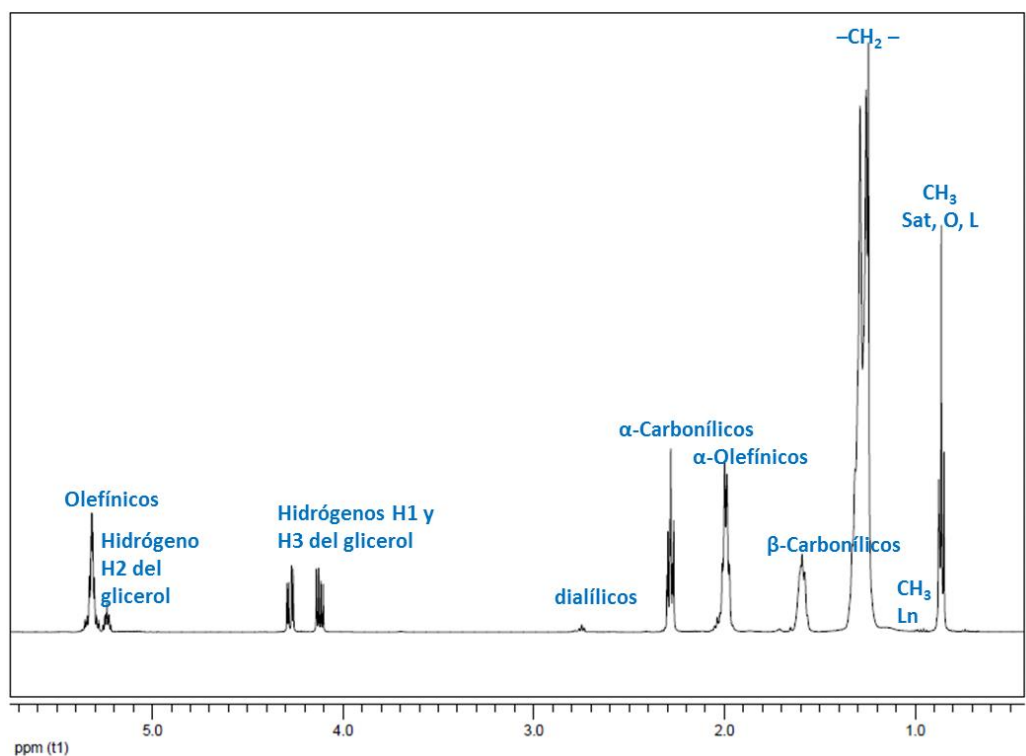


Figura 1.13. Espectro ^1H RMN de un aceite de oliva virgen extra. (Ln: Linolénico, Sat: Saturados, O: Oleico y L: Linoleico)

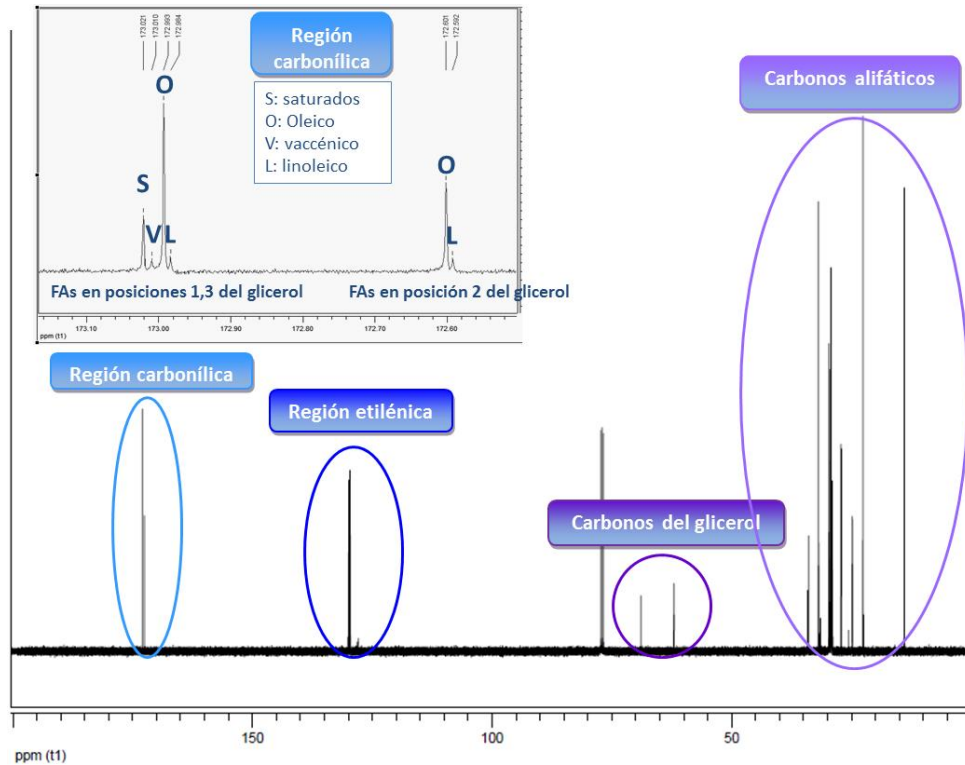


Figura 1.14. Espectro ^{13}C RMN de un aceite de oliva virgen extra.

En el campo de la detección de adulteraciones y autenticidad de los aceites de oliva, Zamora y col. analizaron la fracción insaponificable, por ^{13}C RMN, para discriminar aceites de oliva vírgenes de aceites refinados y aceites de orujo [313]. Sacchi y col. evaluaron la autenticidad y calidad del aceite de oliva virgen extra mediante RMN de ^1H y ^{13}C de alta resolución, detectando adulteraciones de aceites de oliva con aceites de semillas y con aceites de oliva refinado y de orujo de oliva [312]. Mavromoustakos y col. analizaron la región olefínica (o etilénica) del espectro de ^{13}C , la cual consta de doce picos que resuenan entre 127.5 y 130 ppm y que corresponden a los carbonos etilénicos del oleico y linoleico presentes en las posiciones α y β de la molécula de glicerol. Los autores estudiaron 61 muestras de aceite de oliva virgen griego auténticas y 78 muestras de aceite de oliva virgen adulterado con aceites de soja, algodón, maíz y girasol en distintas proporciones a partir del 5% de adulteración. Se obtuvo un 100% éxito en la clasificación del nivel de adulteración cuando el adulterante

Capítulo 1

estaba presente a niveles superiores al 40% y un 80% cuando estaba presente a valores iguales o inferiores al 40%. Además, todas las muestras adulteradas fueron clasificadas correctamente (esto es, en todas ellas se detectó la presencia de adulterante) [314].

Fauhl y col. utilizaron la RMN de protón para analizar mezclas de aceites de oliva con otros aceites de procedencia botánica diferente (avellana y girasol). El método se mostró efectivo para detectar mezclas, presentando ventajas frente a técnicas cromatográficas como rapidez de análisis y de preparación de muestra [315]. Zamora y col. distinguieron por RMM de ^{13}C entre aceites de oliva vírgenes y aceites con alto contenido en ácido linoleico. Además, clasificaron correctamente los aceites de avellana y sus mezclas con aceites de oliva virgen [316].

Guillén y Ruiz describieron la aplicación de RMN de ^1H para determinar el grado de insaturación y la proporción de diferentes grupos acilos en varios aceites comestibles, resultando una herramienta adecuada para evaluar la calidad y la autenticidad en aceites de oliva [317]. En otro estudio, los autores analizaron 36 muestras de aceites comestibles de distinto origen botánico utilizando RMN de ^1H . Se detectaron grandes cantidades de ácido linoleico en aceites de soja y cáñola (9 y 8%, respectivamente), comparados con el 6-8% que contienen los aceites de oliva [318]. García-González y col. emplearon ^1H y ^{13}C RMN con ANN para detectar la presencia de aceites de avellana en aceites de oliva, a niveles superiores al 8% [319]. McKenzi y Koch desarrollaron un método rápido para conocer la autenticidad del aceite de oliva virgen extra, mediante ^{13}C RMN, determinando los principales ácidos grasos (oleico, linoleico y saturados) [320]. Fragaki y col. estudiaron tres tipos de aceites de oliva (virgen extra, refinado y lampante) mediante RMN de ^{31}P . La aplicación de análisis clúster les permitió clasificar satisfactoriamente los tres grupos detectando, asimismo, la adulteración del aceite de oliva virgen extra con los otros aceites a niveles del 5% en

peso [321]. Vigli y col. detectaron adulteraciones de aceites de oliva con aceites de semillas (a niveles del 5% en peso), utilizando los valores de 1,2-diglicéridos, 1,3-diglicéridos, la relación de 1,2-diglicéridos a diglicéridos totales, acidez, índice de yodo y composición de ácidos grasos, mediante RMN de ^1H y ^{31}P [322].

Barison y col. propusieron un método sencillo para determinar la composición de ácidos grasos de aceites comestibles por RMN ^1H , relacionando las áreas de las señales de cada ácido grasos con las señales del glicerol, sin utilizar ecuaciones matemáticas [323].

Dais y Spyros llevaron a cabo una revisión sobre la aplicación de diversas técnicas de RMN (^1H , ^{13}C y ^{31}P) al análisis de aceites de oliva para evaluar su calidad y su autenticidad [324]. De igual forma, Mannina y col. revisaron los principales estudios de RMN llevados a cabo entre 2000 y 2010 para caracterizar aceites de oliva y asegurar su calidad, autenticidad y origen geográfico [325].

En lo que respecta a la determinación del origen geográfico de los aceites de oliva, Mavromoustakos y col. estudiaron los ácidos grasos más abundantes en los triglicéridos de muestras de aceite de oliva virgen cosechados en diferentes zonas geográficas de Grecia, mediante GC y ^{13}C RMN. La cromatografía de gases proporciona información sobre el contenido de ácidos grasos y la RMN de ^{13}C da información adicional de la distribución de los ácidos grasos presentes en el glicerol, permitiendo determinar el origen geográfico y adulteraciones con otros aceites [326]. Shaw y col. discriminaron la variedad y el origen de aceites de oliva vírgenes extra en base al espectro de ^{13}C , aplicando PLS, regresión por componentes principales (PCR) y PCA [327]. Sacco y col. discriminaron entre aceites de oliva vírgenes procedentes de la región de Apulia (Italia) mediante RMN ^1H y análisis estadístico multivariante. La

Capítulo 1

composición de ácidos grasos permitió distinguir entre variedades de aceites de oliva, mientras que los compuestos fenólicos ayudaron a clasificar las muestras según su procedencia geográfica [328]. Mannina y col. estudiaron en diversos trabajos la procedencia geográfica de aceites de oliva virgen extra italianos [329,330]. Fronimaki y col. mediante RMN de ^{31}P , determinaron el contenido de diglicéridos de muestras de aceites de oliva virgen extra, pertenecientes a distintas zonas de Grecia [306]. El método utilizado fue el descrito previamente por Spyros y col. [304] y está basado en la derivatización de los hidrógenos lábiles de los grupos OH, COOH y CHO. Vlahov y col. determinaron el origen geográfico de aceites de oliva con DOP de la región italiana de Apulia mediante RMN de ^{13}C , aplicando análisis de la varianza (ANOVA) y LDA [331]. Rezzi y col. utilizaron la RMN de protón con análisis multivariante (PCA y PLS) para clasificar aceites de oliva de distintas zonas del Mediterráneo [332]. D'Imperio y col. aplicaron RMN de ^1H y ^{13}C junto con procedimientos estadísticos (ANOVA, PCA y LDA) para analizar aceites de oliva de tres zonas geográficas diferentes del Lazio (Italia). Los autores tuvieron en cuenta la influencia de parámetros como altitud de cada zona y las condiciones de riego en la composición del aceite. Encontraron que el contenido en ácidos grasos saturados y en oleico está fuertemente influenciado por las condiciones de riego, mientras que la altitud influye en los compuestos volátiles [11]. Petrakis y col. predijeron la procedencia geográfica de aceites de oliva vírgenes de la variedad Koroneiki, pertenecientes a tres regiones diferentes de Grecia. Se estudiaron ácidos grasos, componentes fenólicos, diacilgliceroles, índice de yodo, esteroles libres y acidez libre, aplicando ^{31}P y ^1H con análisis discriminante canónico (CDA) y árboles de clasificación binaria (CBT), obteniéndose una predicción del lugar de origen del 87% [333].

Del Coco y col. estudiaron mediante RMN de ^1H y quimiometría, 12 mezclas de aceite de oliva distintas comercializadas en EEUU como aceites de procedencia italiana. Como resultado, 9 de esos aceites presentaron características de aceites europeos (más parecidos a aceites griegos y españoles que a italianos), mientras que otros dos presentaron características de aceites tunecinos [334]. Mannina y colaboradores describieron la caracterización geográfica de aceites de oliva, mediante las técnicas de ^1H y ^{13}C [335] y publicaron una revisión en la que se detallaron los resultados más relevantes, obtenidos en el período 2001-2011, en la caracterización de aceites de oliva mediante ^1H RMN, para determinar su calidad, su autenticidad y su origen geográfico [325].

5.4. ADN

La tecnología basada en ADN es una técnica de biología molecular que consiste en el uso de marcadores moleculares que, fundamentalmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplifica un fragmento de ADN, aplicando, para ello, ciclos alternos de altas y bajas temperaturas. En el campo de la autenticidad y trazabilidad de alimentos está siendo cada vez más extendida [336-338], ya que los marcadores basados en ADN son una herramienta valiosa tanto para estudiar una sola composición varietal como un conjunto de ellas [339-342].

Bonizzi y col. aplicaron la técnica para determinar el origen geográfico de quesos [343] y Raspor y col. la utilizaron para evaluar cómo varía la composición de las colonias de levadura para las diferentes variedades de uva [344].

Es una técnica emergente en la determinación de calidad de aceites de oliva, ya que las propiedades químicas de los aceites se pueden ver afectadas por los factores climáticos y ambientales mientras que el ADN del aceite no se ve afectado por el medio

Capítulo 1

ambiente, siendo idéntico al del ADN del árbol. Cresti y col. fueron de los primeros investigadores que trabajaron con ADN de aceites de oliva, obteniendo los ácidos nucleicos a partir de sedimentos [345]. La técnica presenta ciertas ventajas frente a los métodos analíticos, como mayor especificidad, sensibilidad y buen rendimiento [346], siendo el único método de análisis capaz de proporcionar información sobre la identidad de las variedades de aceites de oliva [57]. El inconveniente que presenta es que la extracción de los fragmentos de ADN es complicada, ya que los polisacáridos y los compuestos fenólicos residuales pueden dar amplificaciones de PCR irregulares [347,348], por lo que la fiabilidad de los perfiles de los marcadores moleculares depende de la calidad del ADN extraído [349-351]. Para la extracción de ADN de aceite de oliva se han propuesto varios protocolos [347,350,352].

Algunos de los marcadores moleculares utilizados en la trazabilidad de aceites de oliva son, el polimorfismo de productos amplificados al azar (RAPD: Random amplified polymorphic DNA), repeticiones de secuencia única (SSR: simple sequence repeats), inter secuencias simples repetidas (ISSR: intersimple sequence repeats), regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas (SCAR: sequence-characterized amplified region), polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP: amplified fragment length polymorphism) y polimorfismo por variación de un solo nucleótido (SNP: single nucleotide polymorphism).

RAPDs realiza la amplificación del ADN mediante cebadores arbitrarios, generando cada cebador un número de bandas, obteniéndose por tanto una huella específica para cada especie. Fueron los primeros marcadores que se aplicaron en el estudio de olivar [353] y en la diferenciación de variedades de olivo [345,354]. También se han aplicado para determinar la trazabilidad y la autenticidad de aceite de oliva [355,356], pero pese a ser una técnica rápida, simple, que necesita poca cantidad

de ADN es una técnica poco reproducible [357-359], baja reproducibilidad que puede ser debida a la mala calidad del ADN extraído. AFLPs consiste en la amplificación PCR mediante un rango de fragmentos (50-400 pb), siendo más reproducible que RAPDs. Se ha aplicado a los estudios de la variabilidad genética de las diferentes variedades de olivos que combinan diferentes tipos de cebadores [360]. Pero esta es una técnica que, a pesar de ofrecer mucha información, es compleja, costosa y de poca aplicación al aceite de oliva, ya que para RAPDs la calidad del ADN es muy importante, y una mala calidad puede dar malos resultados. SCARs son fragmentos de ADN amplificados por PCR y diseñados a partir de secuencias de nucleótidos establecidas a partir de RAPDs [348]. La técnica SCAR fue introducida por Paran y Michelmore [361] y presenta la ventaja de que discrimina entre individuos muy similares, debido a su alta densidad en el genoma. Busconi y col. los utilizaron como huellas dactilares de cultivares [362] y Pafundo y col. los aplicaron en la trazabilidad de olivar [363].

En aceite de oliva, la técnica ISSR es menos usada. Pasqualone y col. distinguió entre variedades de olivo italianas, estudiando el ADN extraído de la aceitunas [358]. SSR o microsatélites, son los marcadores más prometedores, son muy informativos y reproducibles ya que utilizan más secuencias de cebadores. En aceites de oliva se emplean para determinar la trazabilidad y el origen geográfico, así como la presencia de otros aceites [347,350,351,364-366]. SNPs son una nueva clase de marcadores, que necesitan alto nivel de información de la secuencia del genoma. Se han utilizado para estudiar la diversidad genética de los olivos, pero hay pocos estudios sobre trazabilidad [339]. Costa, Mafra y Oliveira, en su revisión sobre la autenticidad de aceites vegetales por marcadores de ADN, mostraron las ventajas y los inconvenientes de los principales marcadores utilizados para identificar las especies de origen de los aceites vegetales y la composición varietal del aceite de oliva [352]. La técnica SNP parece ser la más útil,

porque puede apreciar pequeñas diferencias en individuos muy parecidos, pero los marcadores más adecuados para determinar la autenticidad de productos parecen ser los SSR, por su alto poder discriminatorio, su naturaleza codominante, amplia distribución a lo largo del genoma, detección automática y fácil interpretación, si bien hay que tener especial cuidado en la trazabilidad de aceites de oliva monovarietales, debido a la presencia de alelos paternos en la semilla [365]. Pérez-Jiménez y col. utilizaron el genoma presente en los plástidos, en lugar del genoma nuclear, para determinar la trazabilidad varietal de aceites de oliva vírgenes [367] y Agrimonti y col. estudiaron los métodos basados en ADN para determinar la autenticidad varietal describiendo, asimismo, los métodos de extracción y los marcadores más adecuados para generar el “documento de identidad” del aceite de oliva [368].

Algunas otras técnicas basadas en el ADN son RFLPs (fragmentos de restricción de longitud polimórfica), (STS: Sitios de secuencia específica) y SSAPs (Secuencia de amplificación específica de polimorfismo) [369].

5.5. NARIZ Y LENGUA ELECTRÓNICAS

La nariz y la lengua electrónicas (e-nose y e-tongue) se clasifican dentro de los sensores químicos.

La nariz electrónica consiste en un instrumento en el que una serie de sensores químicos electrónicos, que presentan una especificidad parcial y un sistema de reconocimiento apropiado del patrón, pueden reconocer olores simples o complejos [370]. Se empezó a utilizar en los 90 del pasado siglo, principalmente en la industria alimentaria. Angerosa y col. hacen una descripción de esta tecnología [31]. Los sistemas de nariz electrónica constan de tres partes:

- Toma de muestra. Ésta es una parte muy importante, ya que va a influir en la calidad de los resultados. Está fundamentada en la técnica de espacio de cabeza (HS), ya que se van a estudiar compuestos volátiles. Dentro de las técnicas de espacio de cabeza encontramos distintos tipos como espacio de cabeza estático, (SHS), Purga y Trampa (P&T) y espacio de cabeza dinámico (DHS), SPME, microextracción en barra con disolvente (SBME) e extracción dinámica con aguja interior (INDEX) [371].
- Sistema de detección (Sensores): Aquí pasarán los volátiles una vez concentrados en la fase vapor y se medirán sus características físico-químicas mediante sensores de gases en fila, los cuales crean una señal eléctrica cuando reaccionan con la muestra, obteniéndose la “huella olfativa”. Podemos encontrar distintos tipos (óxidos metálicos semiconductores –MOS-, polímeros conductores –CP-, ópticos, gravimétricos/acústicos, por citar sólo algunos de ellos). Últimamente se tiende a emplear nuevos materiales y estructuras en la composición de los sensores con el fin de mejorar la sensibilidad recurriendo, por ejemplo, al uso de sensores nanoestructurados, sensores de grafeno o biosensores [371].
- Reconocimiento de patrones y tratamiento de datos: En este paso se tratarán las huellas olfativas mediante quimiometría (PCA, análisis clúster –CA, PLS, LDA, ANN...) para obtener la información necesaria y poder clasificarla.

Entre las múltiples aplicaciones de la nariz electrónica en el campo de la alimentación [372,373] podemos citar su utilización en bebidas [374-377]. Hay que señalar que en bebidas alcohólicas pueden obtenerse unos resultados erróneos debido a la saturación de la fracción volátil por la presencia de etanol. Para solucionar esto se aplica un tipo de nariz electrónica basada en la espectrometría de masas (HS-MS),

Capítulo 1

evitando las interferencias provocadas por el etanol ya que no se analizan sus iones característicos. También se ha aplicado a carnes [378], a leche [379], y aceites vegetales [380-382]

En aceites de oliva, la nariz electrónica ha sido utilizada por varios autores [134,381-388]. Cerrato-Oliveros y col. utilizaron una nariz electrónica basada en óxidos semiconductores (MOS) para detectar adulteraciones en aceites de oliva vírgenes, mediante el análisis de los compuestos volátiles presentes en las muestras. Emplearon redes neuronales artificiales (ANN), junto con análisis discriminante lineal (LDA) y análisis discriminante cuadrático (QDA), obteniéndose buenos resultados en la diferenciación entre aceites de oliva adulterados y no adulterados, siendo posible identificar el tipo de aceite utilizado en la adulteración (girasol o aceite de orujo de oliva) y cuantificar el porcentaje [389]. Cimato y col. propusieron este método para discriminar entre aceites de oliva vírgenes extra monovarietales de la cuenca mediterránea, ya que las técnicas clásicas (GC, GC-MS, HPLC y panel de cata) consumen más tiempo, son caras y no todas permiten el análisis en línea. Para confirmar las respuestas de la nariz electrónica se utilizó HS-SPME-GC-MS [390]. Ballabio y col. estudiaron aceites de oliva virgen extra de distinta procedencia geográfica, mediante nariz electrónica con distintos sensores [386]. Haddi y col. analizaron el perfil volátil de distintos aceites de oliva procedentes de Marruecos para determinar su origen geográfico, utilizando para ello un sistema de 6 sensores MOS en fila [391].

Una lengua electrónica consiste en un conjunto de sensores químicos no específicos con sensibilidad parcial a diferentes componentes, capaces de analizar líquidos complejos. Los sensores pueden ser electroquímicos (potenciométricos, voltamperiométricos, amperométricos...), de detección de masas, ópticos y biosensores, siendo los primeros, en concreto los potenciométricos, los más usados, ya que permiten

detectar tanto especies moleculares como iónicas y son fáciles de manejar. Al igual que para la nariz electrónica, es necesario el posterior tratamiento de datos para obtener una respuesta que sea de utilidad, aplicando para ello herramientas quimiométricas como PCA, PLS, DA, ANN...

Las lenguas electrónicas son muy utilizadas en el sector alimentario para seguimiento de procesos, evaluación de frescura, autenticidad, detección y análisis cuantitativo, entre otras aplicaciones [392]. Se suelen emplear de modo combinado con narices electrónicas, ya que así se simula el modo como el cerebro humano integra las señales procedentes de los receptores olfativos y gustativos para clasificar y tomar decisiones [393]. Así, por ejemplo, Zakaria y col. usaron esta combinación para clasificar mieles y determinar su adulteración con distintos siropes [394]. Hong y col. la emplearon para detectar la adulteración de zumos de tomate cherry [395,396], mientras que Buratti y col. la aplicaron para clasificar vinos italianos y predecir su amargor [375,376].

En aceites de oliva, Rodríguez-Méndez y col. describieron el uso de la lengua electrónica para su caracterización organoléptica [397]. Cosio y col. estudiaron el empleo de nariz y lengua electrónica, en combinación con análisis multivariante, para verificar el origen geográfico de aceites de oliva virgen extra procedentes de la zona del Lago de Garda (norte de Italia), considerada DOP desde 1998. Los autores concluyeron que, en este caso, la nariz electrónica era una herramienta más apropiada para caracterizar los aceites analizados [398].

Haddi y col. combinaron nariz y lengua electrónicas para estudiar diferentes aceites de oliva virgen procedentes de distintas zonas de Marruecos. La combinación de ambas técnicas permitió mejores resultados que las técnicas por separado, en cuanto a la

identificación del origen geográfico. Las técnicas quimiométricas utilizadas fueron ANOVA, PCA, CA y SVMs [399,400].

6. APLICACIÓN DE QUIMIOMETRÍA AL ACEITE DE OLIVA

Como se pone de manifiesto en las secciones anteriores, la aplicación de quimiometría a los datos que ofrecen las diferentes técnicas (p. ej., técnicas vibracionales, RMN, nariz y lengua electrónicas) es muy importante para ayudar en la determinación de la autenticidad y del origen geográfico de los aceites de oliva.

La International Chemometrics Society (ICS) define la quimiometría como: “La disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos”. El objetivo es seleccionar el mejor procedimiento experimental y tratamiento de los datos de los análisis químicos.

La Quimiometría abarca diversos aspectos, tales como métodos de regresión (para relacionar los espectros con propiedades cuantitativas de las muestras) o métodos de clasificación (para agrupar las muestras de acuerdo a sus espectros).

Seguidamente se hace una breve descripción de las diversas técnicas estadísticas multivariantes utilizadas en quimiometría para la autenticación del aceite de oliva [401-404].

6.1. ANÁLISIS CUALITATIVO

El análisis Cualitativo implica la clasificación de muestras según sus espectros mediante el uso de métodos de reconocimiento de patrones, los cuales pueden ser supervisados o no supervisados.

6.1.1. Métodos de reconocimiento de patrones no supervisados

En estos métodos, las muestras se clasifican sin conocimiento previo, excepto los espectros. El patrón es asignado a una clase desconocida hasta ahora.

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica de análisis multivariante para reducir el número de variables y representar la matriz de datos multivariantes en un espacio de dimensión inferior. Las nuevas variables son combinaciones lineales de las originales y son ortogonales entre sí, evitando la posible presencia de multicolinealidad. PCA se utiliza para visualizar los datos, en una primera fase del análisis exploratorio de los mismos [11,33,72,103,116,118,124,125,130,131,133,134,140,169,212,215,220,221,234,247,250,252,264,267,268,284,286,288,289,291,321,327,328,332,334,405-412]. Existen otros métodos de reconocimiento de patrones no supervisados que pueden ser utilizados para una evaluación preliminar de la información contenida en las matrices de datos, tales como el análisis clúster o por conglomerados (CA) [132,213,252,321,328,329,411]. Este método se basa en la idea de que la similitud está inversamente relacionada con la distancia entre las muestras. Por un lado, los métodos jerárquicos realizan sucesivas divisiones del conjunto de datos y la secuencia de conglomerados puede ser representada mediante un árbol (TCA) o dendrograma. Por otro lado, hay métodos no-jerárquicos, como modelos de mezclas

Gaussianas, *K-means clustering*, DBSCAN (*density based spatial clustering of applications with noise*) o redes neuronales Kohonen.

6.1.2. Métodos de reconocimiento de patrón supervisados

Estos métodos utilizan la información sobre la pertenencia de las muestras a un determinado grupo, clase o categoría con el fin de clasificar las nuevas muestras desconocidas en una de las clases conocidas. De esta manera, una nueva muestra se asocia a una clase predefinida según sean sus correspondientes observaciones.

Existe una primera clasificación entre los métodos centrados en la discriminación, como es el *análisis discriminante lineal* (LDA), y aquellos que hacen más hincapié en la similitud dentro de una clase que en la discriminación entre las clases, como los SIMCA (*soft independent modeling of class analogy*). Los métodos también pueden dividirse en lineales y no lineales. Una tercera clasificación distingue entre métodos paramétricos y no paramétricos, en función de si la distribución normal está subyacente en las reglas de decisión o no, respectivamente.

a. Análisis discriminante lineal (LDA).

LDA es un método no paramétrico lineal y centrado en encontrar los límites óptimos entre las clases. Al igual que PCA es un método de reducción. Sin embargo, mientras que PCA selecciona la dirección que conserva la máxima estructura entre datos en una dimensión menor, LDA selecciona las direcciones en las que se consiga una separación máxima entre las diferentes clases. LDA utiliza la distancia Euclídea para clasificar muestras desconocidas [11,72,102,124-126,128,129,131,175,177,214,253,257,263,313,316,322k,328,329,331,333,389,405,410,413-421].

El Análisis Discriminante Cuadrático (QDA) es un método de clasificación no-lineal y no-paramétrico, que se obtiene como una extensión del LDA en el caso en que

no se asume hipótesis de normalidad y de igualdad de matriz de covarianzas entre clases [389]. El Análisis Discriminante General (GDA) aplica los métodos del Modelo Lineal General (GLM) al problema de análisis de función discriminante [117,248,321]. El Análisis de Función discriminante (DFA) es utilizado para predecir una variable dependiente categórica (llamada variable de agrupación) mediante una o más variables independientes continuas o binarias (llamadas variables de predicción) [72,219,228,267]. El Análisis de Variación Canónica (CVA) es otra técnica discriminante (también conocida como análisis de correlación canónica (CCA)), diferente de LDA en cuanto a que LDA utiliza un vector que contiene la información de pertenencia a una clase mientras que CVA puede utilizar una matriz [169,256,417].

b. K vecinos más cercanos (KNN).

KNN es un método no paramétrico en el cual una muestra desconocida del conjunto de validación se clasifica en función de la clase a la que pertenece la mayoría de los K vecinos más próximos (es decir, las muestras que presenten una distancia Euclídea más baja) en el conjunto de entrenamiento o calibración [119,219].

c. Métodos de modelado.

SIMCA es un método paramétrico que realiza PCA en una clase separada [119,134,213,413-416,419,422-424]. Una muestra desconocida es asignada a la clase descrita por el modelo PCA que produce los errores más pequeños durante la predicción. PLS-DA es una variante del PLS para el caso en que la variable respuesta sea categórica [127,138,141,175,216,220,221,252,256,260-262,268,293,419,423-428]. El UNEQ (*unequal dispersed classes*) deriva del QDA y es también un método paramétrico de modelado de clase que se puede aplicar cuando deben considerarse sólo unas pocas de las variables [422]. Las Técnicas de Función Potencial (POTFUN) estiman la función de densidad de la distribución de probabilidad como la suma de las

contribuciones de cada objeto individual en el conjunto de calibración y, por lo tanto, son muy útiles cuando la distribución multivariante subyacente es muy asimétrica. El Modelado de Rango Multivariante (MRM) es un método sencillo e intuitivo para la construcción de modelos mediante el empleo del rango de los predictores. Los Modelos Analógicos de Modelado CAIMAN (CAMM) constituyen una familia de técnicas de modelado de clase de gran alcance, que construye modelos utilizando distancias (distancias de Mahalanobis a los centroides de clase) como predictores.

d. Métodos no lineales.

Las redes neuronales artificiales (ANN) se definen como estructuras de elementos de procesamiento interconectados, llamados neuronas artificiales o nodos, que colaboran entre sí para producir un estímulo de salida. Son un paradigma de aprendizaje y procesamiento automático inspirado en la forma en que funciona el sistema nervioso animal [218,319,389,420]. Varios tipos de redes neuronales pueden utilizarse para la clasificación: LVQ (*learning neural network vector quantization*) (LVQ) y Redes Neuronales probabilísticas (PNN). La máquina de vectores de soporte (SVM) es un método para la obtención del límite óptimo que separa dos clases exactamente, clasificando no sólo el conjunto de entrenamiento sino también muestras desconocidas [265,290,292]. Los Árboles de Clasificación y Regresión (CART) son un método de generación de árboles en el que los datos se dividen en grupos con el objetivo de explicar una variable de respuesta cualitativa mediante la selección de algunas de las variables independientes de un conjunto más amplio [265,419]. Los árboles de clasificación binaria (CBT) son un caso particular de CART, cuando la variable de respuesta es binaria [333]. La regresión logística (LR) es un tipo particular de un modelo de clasificación probabilística utilizado para predecir una respuesta

binaria categórica en función de una serie de variables independientes mediante un modelo logístico [218].

6.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO.

6.2.1. Regresión Lineal Múltiple (MLR).

La MLR permite explicar una propiedad cuantitativa de las muestras como una función de un número reducido de longitudes de onda espectrales (o números de onda). La selección se basa en la capacidad predictiva de las longitudes de onda [125,253].

6.2.2. Regresión por Componentes Principales (PCR).

La PCR se divide en dos etapas: en primer lugar, los datos del espectro son tratados con PCA; en segundo lugar, se realiza MLR considerando como variables predictoras las componentes principales extraídas en la fase anterior. Dado que los componentes principales son ortogonales entre sí, PCR evita la presencia de multicolinealidad [257,283,327].

6.2.3. Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).

El objetivo del PLS es encontrar los componentes de la matriz de entrada que describen en la medida de lo posible las variaciones en las variables de entrada y que al mismo tiempo tengan la máxima correlación con la variable de respuesta. Los factores resultantes son, como en PCA, ortogonales entre sí, a fin de evitar multicolinealidad [125,130,134,212,213,215,216,219,245-248,250,254,255, 257,263,267,285-287,289,292,293,327,332,406,408,412,414,422,427].

6.2.4. Redes Neuronales Artificiales (ANN).

Las ANN están formadas por distintos niveles. El primero, denominado los “inputs”, son las variables de entrada, absorbancia a longitudes de onda específicas. En la regresión, los resultados (“outputs”) son los valores de contenido y también representan las capas de neuronas artificiales. Las llamadas "capas ocultas" representan el proceso de modelización.

6.2.5. Regresión por medio de Vectores de Soporte (SVR).

Al igual que el método por mínimos cuadrados clásico, los SVR (o regresiones SVM) encuentran una relación lineal entre las variables explicativas y las variables dependientes. El parámetro de coste para determinar el mejor modelo es diferente a los utilizados en los modelos de regresión, razón por la cual pueden ser aplicados a fenómenos no-lineales.

6.2.6. Árboles de Clasificación y Regresión (CART).

En este caso, CART se utiliza con un objetivo de regresión, es decir, en el caso de que la variable respuesta sea cuantitativa. Es un método de construcción de árbol en el que los datos son divididos repetidamente en grupos con el objetivo de explicar una variable respuesta cuantitativa seleccionando algunas variables independientes de un conjunto más amplio.

6.2.7. Análisis de la Varianza (ANOVA).

En el análisis de la varianza (ANOVA) la varianza de la variable dependiente cuantitativa se divide en componentes atribuibles a las diferentes fuentes de variación, asociadas a una o más variables independientes categóricas, denominadas factores. MANOVA es la generalización multivariante, en el caso en que existe un vector de respuesta [11,128,177,321,322,329-331,410].

6.2.8. Regresión inversa por Mínimos Cuadrados (ILS).

ILS es un método de calibración, desarrollado en quimiometría, basado en la ley de Beer inversa, en el que la concentración de un analito se modela en función de la absorbancia. El método genético por mínimos cuadrados inversos (GILS) es una versión modificada del método ILS, en el que un pequeño conjunto de longitudes de onda es seleccionado de una matriz de datos espectrales completa, obteniendo una solución óptima mediante el uso de un algoritmo genético (GA). GA es una técnica de optimización cuyo fundamento es imitar la evolución de las especies, de acuerdo con la teoría darwiniana de la "supervivencia del más apto". En ocasiones, la aplicación de algoritmos genéticos a la solución de problemas de calibración complejos produce resultados mucho mejores que los obtenidos por las técnicas estándar [217,263,286]

7. COMBINACIÓN DE TÉCNICAS

Existen diferentes ejemplos en la bibliografía comparando distintas técnicas analíticas aplicadas el aceite de oliva o describiendo su complementariedad. Algunos de ellos, como el uso combinado de resonancia magnética nuclear (RMN) e IRMS [172,175] IRMS y MS [174] o nariz y lengua electrónicas [400,429] han sido citados en las secciones anteriores. A continuación se muestran otros ejemplos.

En algunos estudios, se comparan técnicas analíticas (FT-NIR y FT-IR aplicando LDA y SIMCA) con un panel de cata de análisis sensorial (atributos olfativos) [415] variando el intervalo de predicción entre 71,6 % y 100 %.

En lo que respecta a la detección de adulteraciones, Spagenberg y col. [430] describieron el uso combinado de GC/MS y composición isotópica en carbono total y

Capítulo 1

CSIA (especialmente $\delta^{13}\text{C}$ 16:0 y $\delta^{13}\text{C}$ 18:1 mediante GC/C/IRMS) para estudiar los casos en los que hay sospecha de adulteraciones (aceite de orujo de oliva, girasol, avellana). Milder-Szkudlarz y Helen compararon diferentes métodos (SPME-GC-FID, nariz electrónica con sensores MOS, SPME-MS y SPME-GC/MS) para la determinación de compuestos volátiles, con el fin de detectar aceites de oliva virgen adulterados con aceite de avellana. Mediante la aplicación de PCA se consiguió detectar adulteraciones a niveles del 5% v/v [409].

Marigheto y col. encontraron que, en sus condiciones experimentales, la espectroscopia MIR en combinación con LDA era preferible al Raman en la detección de adulteraciones [420]. No obstante, encontrar la técnica más eficaz dependerá del estudio que se lleve a cabo. Por ejemplo, Yang y col. en un estudio comparativo de las espectroscopias MIR, NIR y Raman para la cuantificación de aceites de oliva virgen extra y de orujo de oliva mostraron que las mejores correlaciones se obtuvieron con espectroscopia FT-Raman [431]. Sin embargo, en un estudio distinto la espectroscopia FTIR fue la técnica más eficaz para la clasificación de los aceites y grasas cuando se utilizó con CVA, seguida de FT-Raman y FT-NIR (con 98 %, 94% y 93% de precisión en la clasificación, respectivamente) [417].

Baeten y col. aplicaron las técnicas FT-Raman y FT-MIR a toda la muestra de aceite y a la fracción insaponificable. Los autores fueron capaces de detectar la adulteración del aceite de oliva con aceite de avellana a niveles $\geq 8\%$ [421]. Por último, Che Man y Rohman describieron el uso de FTIR, DSC y nariz electrónica para detectar y cuantificar manteca de cerdo en los aceites vegetales, lo cual es especialmente importante para las comunidades musulmana y judía [432].

En cuanto a la determinación del origen geográfico, Alonso Salces y col. estudiaron mediante ^1H -RMN y ^1H y ^{13}C -IRMS las huellas dactilares de aceites de oliva pertenecientes a DOP de 6 países diferentes de Europa, aplicando PCA, LDA y PLS-DA. La incorporación de los datos de IRMS proporcionó una considerable mejora en la clasificación de los aceites según la procedencia geográfica, en comparación con la simple consideración de los datos ^1H -RMN [433]. Casale y col. demostraron la complementariedad entre la información del color del aceite (UV-Vis) y el aroma (nariz electrónica) para verificar el origen geográfico de aceites de oliva virgen extra de tres zonas diferentes de Liguria (Italia). La aplicación de LDA condujo a un 100% de éxito en la clasificación y casi el 100% en la predicción [413]. En un estudio diferente, las huellas dactilares obtenidas por espectroscopia UV-Vis, NIR y MIR se utilizaron para crear unos modelos fiables y comprobar la autenticidad de aceites de oliva vírgenes italianos de la DOP Chianti Classico [422]. Sinelli y col. analizaron mediante NIR y MIR varios aceites de oliva virgen extra monovarietales o mezcla de cultivares. La clasificación de aceites de mezclas de variedades fue mejor utilizando NIR, mientras que la técnica MIR permitió clasificar aceites de oliva monovarietales y mezclas [414].

García-González y Aparicio [434] llevaron a cabo una revisión sobre los desafíos que ha de afrontar la investigación en el sector del aceite de oliva. Los autores agruparon los objetivos en cinco áreas principales, siendo una de ellas la autenticidad y trazabilidad. En este sentido, según lo declarado por los autores, por desgracia, no hay un método rápido y universal que se puede usar para todos aspectos de autenticidad. Por el contrario, cada cuestión debe resolverse recurriendo a la determinación de un parámetro químico concreto mediante técnicas diferentes, ya sean cromatográficas o espectroscópicas.

Capítulo 1

En este sentido, un aspecto importante planteado por los autores es la importancia de la utilización, para determinar la trazabilidad o la caracterización geográfica, de compuestos mayoritarios o minoritarios cuya concentración no cambie con el tiempo pero dependa del cultivar y, en menor medida, del tipo de suelo y del clima.

En cualquier caso, dada la complementariedad de las técnicas analíticas, el futuro sobre la trazabilidad del aceite de oliva pasa por la creación de grandes bases de datos de técnicas cromatográficas, espectroscópicas, isotópicas y datos de ADN. Estas bases de datos, junto con la quimiometría, nos permitirán aplicar la mejor combinación de técnicas para afrontar cada caso particular de trazabilidad de aceites de oliva vírgenes.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.unesco.org/culture/ich/index.php?lg=en&pg=00011#tabs>. 2011. Accesible a 30-07-2014.
2. Elloumi, J.; Ben-Ayed, R.; Aifa, S. An Overview of Olive Oil Biomolecules. *Current Biotechnology* **2012**, *1* (2), 115-124.
3. Angerosa, F.; Mostallino, R.; Basti, C.; Vito, R. Virgin olive oil odour notes: Their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry* **2000**, *68* (3), 283-287.
4. Frankel, E. N. Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59* (3), 785-792.
5. Owen, R. W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Haubner, R.; Würtele, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Olive-oil consumption and health: The possible role of antioxidants. *Lancet Oncology* **2000**, *1* (2), 107-112.
6. <http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/4244-production1-ang/>. 2011. Accesible a 30-07-2014.
7. Reglamento (CE) No 1989/2003 de la Comisión de 6 de noviembre de 2003.
8. Reglamento de Ejecución (UE) No 299/2013 de la Comisión de 26 de marzo de 2013.
9. Lerma García M.J. *Characterization and Authentication of Olive and Other Vegetable Oils*, Springer Theses, DOI: 10.1007/978-3-642-31418-6_1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg ; 2012.
10. Stefanoudaki, E.; Kotsifaki, F.; Koutsaftakis, A. Classification of virgin olive oils of the two major Cretan cultivars based on their fatty acid composition. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **1999**, *76* (5), 623-626.
11. D'Imperio, M.; Mannina, L.; Capitani, D.; Bidet, O.; Rossi, E.; Bucarelli, F. M.; Quaglia, G. B.; Segre, A. NMR and statistical study of olive oils from Lazio: A geographical, ecological and agronomic characterization. *Food Chemistry* **2007**, *105* (3), 1256-1267.
12. Fedeli, E. Lipids of olives. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* **1977**, *15* (1), 57-74.
13. Kiristakis, A.; Christie, W. W. Analysis of edible oils. In *Handbook of Olive oil. Analysis of properties.*, Harwood, J.; Aparicio, R., Eds.; Springer Science+Business Media, Llc.: New York., 2000; pp 29-151.
14. Inglese, P.; Famiani, F.; Galvano, F.; Servili, M.; Esposto, S.; Urbani, S. Factors Affecting Extra-Virgin Olive Oil Composition. In *Horticultural Reviews*, Janick, J., Ed.; John Wiley & Sons: USA, 2010; pp 83-147.

15. Beltrán, G.; Del Rio, C.; Sánchez, S.; Martínez, L. Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, 52 (11), 3434-3440.
16. Marzouk, B.; Zarrouk, M.; Cherif, A. Glycerollipid biosynthesis in ripening olive fruits. *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization* **1990**, 228-230.
17. Ajana, H.; El Antari, A.; Hafidi, A. Fatty acids and sterols evolution during the ripening of olives from the Moroccan Picholine cultivar. *Grasas y Aceites* **1998**, 49 (5-6), 405-410.
18. Montedoro, G.; Garofolo, L. Qualitative characteristics of virgin olive oils. Influence of variables such as variety, environment, preservation, extraction, conditioning of the finished product. *Sostanze Grasse* **1984**, 61 (3), 157-160.
19. Osman, M.; Metzidakis, D.; Gerasopoulos, D.; Kiristakis, A. Qualitative changes in olive oil collected from trees grown at two altitudes. *Sostanze Grasse* **2014**, 71 (4), 187-190.
20. Frías, L.; Gracia, A.; Ferreira, J. Composición en ácidos grasos de frutos con distinto grado de madurez. In *II Seminario Oleícola Internacional. Córdoba (Spain)*, 1985.
21. Boschelle, O.; Mozzon, M.; Giono, A. Typical virgin olive oil. Which are its perspectives in Friuli-Venezia Giulia? *Olivae* **1994**, 50, 31-35.
22. Civantos, L. *Obtención del aceite de oliva virgen*; Agrícola Española: Madrid, 1999.
23. Guinda, A.; Lanzón, A.; Albi, T. Differences in hydrocarbons of virgin olive oils obtained from several olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, 44 (7), 1723-1726.
24. Cercaci, L.; Passalacqua, G.; Poerio, A.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Lercker, G. Composition of total sterols (4-desmethyl-sterols) in extravirgin olive oils obtained with different extraction technologies and their influence on the oil oxidative stability. *Food Chemistry* **2007**, 102 (1), 66-76.
25. Giuffrè, A. M. Evolution of fatty alcohols in olive oils produced in Calabria (Southern Italy) during fruit ripening. *Journal of Oleo Science* **2014**, 63 (5), 485-496.
26. Gandul-Rojas, B.; Cepero, M. R. L.; Mínguez-Mosquera, M. I. Use of chlorophyll and carotenoid pigment composition to determine authenticity of virgin olive oil. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2000**, 77 (8), 853-858.
27. Lerma-García, M. J. Development of Methods for the Determination of Ts, T3s and Sterols in Vegetable Oils. In *Characterization and Authentication of Olive and Other Vegetable Oils, Springer Theses*. 2012; pp 67-103.
28. Cerretani, L.; Lerma-García, M. J.; Herrero-Martínez, J. M.; Gallina-Toschi, T.; Simó-Alfonso, E. F. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils by nanoliquid chromatography with ultraviolet-visible detection using a silica monolithic column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58 (2), 757-761.

29. Bakre, S. M.; Gadmale, D. K.; Toche, R. B.; Gaikwad, V. B. Rapid determination of alpha tocopherol in olive oil adulterated with sunflower oil by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Science and Technology* **2014**, 1-6.
30. Angerosa, F. Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2002**, 104 (9-10), 639-660.
31. Angerosa, F.; Servili, M.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Esposto, S.; Montedoro, G. Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1054 (1-2), 17-31.
32. Procida, G.; Giomo, A.; Cichelli, A.; Conte, L. S. Study of volatile compounds of defective virgin olive oils and sensory evaluation: A chemometric approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2005**, 85 (13), 2175-2183.
33. Runcio, A.; Sorgoná, L.; Mincione, A.; Santacaterina, S.; Poiana, M. Volatile compounds of virgin olive oil obtained from Italian cultivars grown in Calabria. Effect of processing methods, cultivar, stone removal, and antracnose attack. *Food Chemistry* **2008**, 106 (2), 735-740.
34. García-González, D. L.; Aparicio-Ruiz, R.; Aparicio, R. Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2008**, 110 (7), 602-607.
35. Sánchez de Medina, V.; Riachy, M. E.; Priego-Capote, F.; Luque de Castro, M. D. Mass spectrometry to evaluate the effect of the ripening process on phenols of virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2013**, 115 (9), 1053-1061.
36. Alonso-Salces, R. M.; Héberger, K.; Holland, M. V.; Moreno-Rojas, J. M.; Mariani, C.; Bellan, G.; Reniero, F.; Guillou, C. Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry* **2010**, 118 (4), 956-965.
37. Moore, J. C.; Spink, J.; Lipp, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science* **2012**, 77 (4), R118-R126.
38. Garcia, R.; Martins, N.; Cabrita, M. J. Putative markers of adulteration of extra virgin olive oil with refined olive oil: Prospects and limitations. *Food Research International* **2013**, 54 (2), 2039-2044.
39. Sánchez-Hernández, L.; Marina, M. L.; Crego, A. L. A capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry methodology for the determination of non-protein amino acids in vegetable oils as novel markers for the detection of adulterations in olive oils. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218 (30), 4944-4951.
40. Calvano, C. D.; De Ceglie, C.; D'Accolti, L.; Zambonin, C. G. MALDI-TOF mass spectrometry detection of extra-virgin olive oil adulteration with hazelnut oil by analysis of phospholipids using an ionic liquid as matrix and extraction solvent. *Food Chemistry* **2012**, 134 (2), 1192-1198.

41. Gamazo-Vázquez, J.; García-Falcón, M. S.; Simal-Gándara, J. Control of contamination of olive oil by sunflower seed oil in bottling plants by GC-MS of fatty acid methyl esters. *Food Control* **2003**, *14* (7), 463-467.
42. García-Reyes, J. F.; Ferrer, C.; Gómez-Ramos, M. J.; Fernández-Alba, A. R.; Molina-Díaz, A. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2007**, *26* (3), 239-251.
43. López, M. C.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. One step carbon nanotubes-based solid-phase extraction for the gas chromatographic-mass spectrometric multiclass pesticide control in virgin olive oils. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (43), 7346-7350.
44. Marinas, A.; Lafont, F.; Aramendía, M. A.; García, I. M.; Marinas, J. M.; Urbano, F. J. Multiresidue Analysis of Low- and Medium-polarity Pesticides in Olive Oil by GC-MS/MS. In *Olives and olive oil in health and disease prevention*, Preedy, V. R.; Watson, R. R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2010; pp 667-683.
45. Stefanelli, P.; Generali, T.; Barbini, D. A.; Girolimetti, S.; Dommarco, R. Uncertainty estimation in the analysis of pesticide residues in olive oil using data from proficiency tests. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **2013**, *48* (7), 523-529.
46. Rallo, L.; Barranco, D.; Caballero J.M.; del Río, C.; Martín, A.; Tous, J.; Trujillo, I. *Varietades de olivo en España*; Mundi-Prensa: Madrid, 2005.
47. Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. *El cultivo del olivo*; Mundi-Prensa: Madrid, 2008.
48. <http://aplicaciones.mapa.es/pwAgenciaAO/OliverEspañol>. Accesible a 30-07-2014.
49. Estatuto del Vino Ley 26 de mayo de 1933.
50. Ley 25/1970, de 2 de diciembre, de Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes.
51. Decreto N° 3711/1974, de 20 de diciembre de 1974.
52. Reglamento (CEE) No 2081/92 del Consejo de 14 de julio de 1992.
53. Reglamento (UE) No 1151/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de noviembre de 2012.
54. <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/areas-tematicas/industrias-agroalimentarias/calidad-y-promocion-agroalimentaria/denominaciones-de-calidad/aceite-de-oliva.html>. 2014. Accesible a 30-07-2014.
55. Aparicio, R.; Morales, M. T.; Aparicio-Ruiz, R.; Tena, N.; García-González, D. L. Authenticity of olive oil: Mapping and comparing official methods and promising alternatives. *Food Research International* **2013**, *54* (2), 2025-2038.

56. Luykx, D. M. A. M.; van Ruth, S. M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry* **2008**, *107* (2), 897-911.
57. Faria, M. A.; Cunha, S. C.; Paice, A. G.; Oliveira, M. B. P. P. Olive Oil Authenticity Evaluation by Chemical and Biological Methodologies. In *Olives and olive oil in health and disease prevention*, Preedy, V. R.; Watson, R. R., Eds.; Amsterdam: Elsevier, 2010; pp 101-107.
58. Koprivnjak, O.; Moret, S.; Populin, T.; Lagazio, C.; Conte, L. S. Variety differentiation of virgin olive oil based on n-alkane profile. *Food Chemistry* **2005**, *90* (4), 603-608.
59. Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Rivera Del Álamo, R. M.; Salvador, M. D.; Fregapane, G. Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chemistry* **2004**, *86* (4), 485-492.
60. Bucci, R.; Magrí, A. D.; Magrí, A. L.; Marini, D.; Marini, F. Chemical authentication of extra virgin olive oil varieties by supervised chemometric procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50* (3), 413-418.
61. Caponio, F.; Alloggio, V.; Gomes, T. Phenolic compounds of virgin olive oil: Influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry* **1999**, *64* (2), 203-209.
62. D'Imperio, M.; Dugo, G.; Alfa, M.; Mannina, L.; Segre, A. L. Statistical analysis on Sicilian olive oils. *Food Chemistry* **2007**, *102* (3), 956-965.
63. Krichene, D.; Taamalli, W.; Daoud, D.; Salvador, M. D.; Fregapane, G.; Zarrouk, M. Phenolic compounds, tocopherols and other minor components in virgin olive oils of some Tunisian varieties. *Journal of Food Biochemistry* **2007**, *31* (2), 179-194.
64. Luna, G.; Morales, M. T.; Aparicio, R. Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry* **2006**, *98* (2), 243-252.
65. Ríos, J. J.; Gil, M. J.; Gutierrez-Rosales, F. Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1093* (1-2), 167-176.
66. Saitta, M.; Curto, S. L.; Salvo, F.; Bella, G. D.; Dugo, G. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *466* (2), 335-344.
67. Torres, M. M.; Maestri, D. M. The effects of genotype and extraction methods on chemical composition of virgin olive oils from Traslasierra Valley (Córdoba, Argentina). *Food Chemistry* **2006**, *96* (4), 507-511.
68. Tura, D.; Prenzler, P. D.; Bedgood, J.; Antolovich, M.; Robards, K. Varietal and processing effects on the volatile profile of Australian olive oils. *Food Chemistry* **2004**, *84* (3), 341-349.

69. Cichelli, A.; Pertesana, G. P. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: Chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1046* (1-2), 141-146.
70. Gómez-Alonso, S.; Salvador, M. D.; Fregapane, G. Phenolic compounds profile of Cornicabra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50* (23), 6812-6817.
71. Morelló, J. R.; Romero, M. P.; Motilva, M. J. Effect of the maturation of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52* (19), 6002-6009.
72. Nagy, K.; Bongiorno, D.; Avellone, G.; Agozzino, P.; Ceraulo, L.; Vékey, K. High performance liquid chromatography-mass spectrometry based chemometric characterization of olive oils. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1078* (1-2), 90-97.
73. Salvador, M. D.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Fregapane, G. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: A study of five crop seasons. *Food Chemistry* **2003**, *80* (3), 359-366.
74. Brescia, M. A.; Alviti, G.; Liuzzi, V.; Sacco, A. Chemometric Classification of Olive Cultivars Based on Compositional Data of Oils. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2003**, *80* (10), 945-950.
75. Cerretani, L.; Bendini, A.; Del Caro, A.; Piga, A.; Vacca, V.; Caboni, M. F.; Toschi, T. G. Preliminary characterisation of virgin olive oils obtained from different cultivars in Sardinia. *European Food Research and Technology* **2006**, *222* (3-4), 354-361.
76. Matos, L. C.; Cunha, S. C.; Amaral, J. S.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Oliveira, B. P. P. Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices. *Food Chemistry* **2007**, *102* (1), 406-414.
77. Baccouri, O.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Caboni, M. F.; Zarrouk, M.; Pirrone, L.; Miled, D. D. B. Preliminary chemical characterization of Tunisian monovarietal virgin olive oils and comparison with Sicilian ones. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2007**, *109* (12), 1208-1217.
78. Issaoui, M.; Flamini, G.; Brahmi, F.; Dabbou, S.; Hassine, K. B.; Taamali, A.; Chehab, H.; Ellouz, M.; Zarrouk, M.; Hammami, M. Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. *Food Chemistry* **2010**, *119* (1), 220-225.
79. Saba, A.; Mazzini, F.; Raffaelli, A.; Mattei, A.; Salvadori, P. Identification of 9(E),11(E)-18:2 fatty acid methyl ester at trace level in thermal stressed olive oils by GC coupled to acetonitrile CI-MS and CI-MS/MS, a possible marker for adulteration by addition of deodorized olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (12), 4867-4872.

80. Hajimahmoodi, M.; Vander Heyden, Y.; Sadeghi, N.; Jannat, B.; Oveisi, M. R.; Shahbazian, S. Gas-chromatographic fatty-acid fingerprints and partial least squares modeling as a basis for the simultaneous determination of edible oil mixtures. *Talanta* **2005**, *66* (5), 1108-1116.
81. Ollivier, D.; Artaud, J.; Pinatel, C.; Durbec, J. P.; Guérère, M. Triacylglycerol and fatty acid compositions of French virgin olive oils. Characterization by chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (19), 5723-5731.
82. Issaoui, M.; Dabbou, S.; Echbili, A.; Rjiba, I.; Gazzah, N.; Trigui, A.; Hammami, M. Biochemical characterisation of some Tunisia virgin olive oils obtained from different cultivars growing in Sfax National Collection. *Journal of Food, Agriculture and Environment* **2007**, *5* (1), 17-21.
83. Cunha, S. C.; Casal, S.; Oliveira, M. B. P. P. Triacylglycerol profile by HPLC/ELSD as a discriminant parameter of varietal olive oils from Portugal. *Italian Journal of Food Science* **2005**, *17* (4), 447-454.
84. Moreda, W.; Pérez-Camino, M. C.; Cert, A. Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. *Journal of Chromatography A* **2001**, *936* (1-2), 159-171.
85. Angerosa, F.; Basti, C.; Vito, R. Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some Italian cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47* (3), 836-839.
86. Tena, N.; Lazzez, A.; Aparicio-Ruiz, R.; García-González, D. L. Volatile compounds characterizing Tunisian chemlali and chétoui virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55* (19), 7852-7858.
87. Tura, D.; Failla, O.; Bassi, D.; Pedò, S.; Serraiocco, A. Cultivar influence on virgin olive (*Olea europea* L.) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Scientia Horticulturae* **2008**, *118* (2), 139-148.
88. Alves, M. R.; Cunha, S. C.; Amaral, J. S.; Pereira, J. A.; Oliveira, M. B. Classification of PDO olive oils on the basis of their sterol composition by multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *549* (1-2), 166-178.
89. Boskou, G.; Salta, F. N.; Chrysostomou, S.; Mylona, A.; Chiou, A.; Andrikopoulos, N. K. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry* **2006**, *94* (4), 558-564.
90. Flores, G.; Ruiz Del Castillo, M. L.; Herraiz, M.; Blanch, G. P. Study of the adulteration of olive oil with hazelnut oil by on-line coupled high performance liquid chromatographic and gas chromatographic analysis of filbertone. *Food Chemistry* **2006**, *97* (4), 742-749.
91. Bendini, A.; Bonoli, M.; Cerretani, L.; Biguzzi, B.; Lercker, G.; Gallina Toschi, T. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A* **2003**, *985* (1-2), 425-433.

92. Rotondi, A.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Mari, M.; Lercker, G.; Toschi, T. G. Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, 52 (11), 3649-3654.
93. Tasioula-Margari, M.; Okogeri, O. Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC-MS. *Journal of Food Science* **2001**, 66 (4), 530-534.
94. Romani, A.; Pinelli, P.; Mulinacci, N.; Galardi, C.; Vincieri, F. F.; Liberatore, L.; Cichelli, A. HPLC and HRGC analyses of polyphenols and secoiridoid in olive oil. *Chromatographia* **2001**, 53 (5-6), 279-284.
95. Ferrari, C.; Angiuli, M.; Tombari, E.; Righetti, M. C.; Matteoli, E.; Salvetti, G. Promoting calorimetry for olive oil authentication. *Thermochimica Acta* **2007**, 459 (1-2), 58-63.
96. Chiavaro, E.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Barnaba, C.; Vittadini, E.; Cerretani, L.; Bendini, A. Differential scanning calorimetry: A potential tool for discrimination of olive oil commercial categories. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 625 (2), 215-226.
97. Chiavaro, E.; Vittadini, E.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Cerretani, L.; Bendini, A. Differential scanning calorimeter application to the detection of refined hazelnut oil in extra virgin olive oil. *Food Chemistry* **2008**, 110 (1), 248-256.
98. Chatziantoniou, S. E.; Triantafyllou, D. J.; Karayannakidis, P. D.; Diamantopoulos, E. Traceability monitoring of Greek extra virgin olive oil by Differential Scanning Calorimetry. *Thermochimica Acta* **2014**, 576, 9-17.
99. Guimet, F.; Ferré, J.; Boqué, R. Rapid detection of olive-pomace oil adulteration in extra virgin olive oils from the protected denomination of origin "Siurana" using excitation-emission fluorescence spectroscopy and three-way methods of analysis. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 544 (1-2 SPEC. ISS.), 143-152.
100. Cindric, I. J.; Zeiner, M.; Steffan, I. Trace elemental characterization of edible oils by ICP-AES and GFAAS. *Microchemical Journal* **2007**, 85 (1 SPEC. ISS.), 136-139.
101. Zeiner, M.; Steffan, I.; Cindric, I. J. Determination of trace elements in olive oil by ICP-AES and ETA-AAS: A pilot study on the geographical characterization. *Microchemical Journal* **2005**, 81 (2), 171-176.
102. Benincasa, C.; Lewis, J.; Perri, E.; Sindona, G.; Tagarelli, A. Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 585 (2), 366-370.
103. Llorent-Martínez, E. J.; Ortega-Barrales, P.; Fernández-De Córdoba, M. L.; Domínguez-Vidal, A.; Ruiz-Medina, A. Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. *Food Chemistry* **2011**, 127 (3), 1257-1262.

104. Murray, K. K.; Boyd, R. K.; Eberlin, M. N.; John Langley, G.; Li, L.; Naito, Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure and Applied Chemistry* **2013**, 85 (7), 1515-1609.
105. Careri, M.; Bianchi, F.; Corradini, C. Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *Journal of Chromatography A* **2002**, 970 (1-2), 3-64.
106. Corradini, C.; Lantano, C.; Cavazza, A. Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405 (13), 4591-4605.
107. Gómez-Ramos, M. M.; Ferrer, C.; Malato, O.; Agüera, A.; ernández-Alba, A. R. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1287, 24-37.
108. Hernández, F.; Cervera, M. I.; Portolés, T.; Beltrán, J.; Pitarch, E. The role of GC-MS/MS with triple quadrupole in pesticide residue analysis in food and the environment. *Analytical Methods* **2013**, 5 (21), 5875-5894.
109. Motilva, M. J.; Serra, A.; Macia, A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1292, 66-82.
110. Wang, X.; Wang, S.; Cai, Z. The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2013**, 52, 170-185.
111. Aiello, D.; De Luca, D.; Gionfriddo, E.; Naccarato, A.; Napoli, A.; Romano, E.; Russo, A.; Sindona, G.; Tagarelli, A. Multistage mass spectrometry in quality, safety and origin of foods. *European Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 17 (1), 1-31.
112. Castro-Puyana, M.; Herrero, M. Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2013**, 52, 74-87.
113. Picariello, G.; Mamone, G.; Addeo, F.; Ferranti, P. Novel mass spectrometry-based applications of the 'omic': Sciences in food technology and biotechnology. *Food Technology and Biotechnology* **2012**, 50 (3), 286-305.
114. Di Stefano, V.; Avellone, G.; Bongiorno, D.; Cunsolo, V.; Muccilli, V.; Sforza, S.; Dossena, A.; Drahos, L.; Vékey, K. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis. *Journal of Chromatography A* **2012**, 1259, 74-85.
115. Parcerisa, J.; Casals, I.; Boatella, J.; Codony, R.; Rafecas, M. Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of triacylglycerols and gas-liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). *Journal of Chromatography A* **2000**, 881 (1-2), 149-158.

116. Lía, M.; Holcapek, M.; Bohác, M. Statistical evaluation of triacylglycerol composition in plant oils based on high-performance liquid chromatography - Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (15), 6888-6898.
117. Agozzino, P.; Avellone, G.; Bongiorno, D.; Ceraulo, L.; Indelicato, S.; Indelicato, S.; Vékey, K. Determination of the cultivar and aging of Sicilian olive oils using HPLC-MS and linear discriminant analysis. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *45* (9), 989-995.
118. Fasciotti, M.; Pereira Netto, A. D. Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC-APCI-MS-MS. *Talanta* **2010**, *81* (3), 1116-1125.
119. Capote, F. P.; Jiménez, J. R.; De Castro, M. D. L. Sequential (step-by-step) detection, identification and quantitation of extra virgin olive oil adulteration by chemometric treatment of chromatographic profiles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *388* (8), 1859-1865.
120. Sakouhi, F.; Absalon, C.; Flamini, G.; Cioni, P. L.; Kallel, H.; Boukhchina, S. Lipid components of olive oil from Tunisian Cv. Sayali: Characterization and authenticity. *Comptes Rendus - Biologies* **2010**, *333* (9), 642-648.
121. Steenbergen, H.; Hrnčirik, K.; Ermacora, A.; de Koning, S.; Janssen, H. G. Direct analysis of intact glycidyl fatty acid esters in edible oils using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1313*, 202-211.
122. Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Bianchi, G.; Kell, D. B. Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils. *Analyst* **2002**, *127* (11), 1457-1462.
123. Catharino, R. R.; Haddad, R.; Cabrini, L. G.; Cunha, I. B. S.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N. Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: Classification, quality, adulteration, and aging. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (22), 7429-7433.
124. Gómez-Ariza, J. L.; Arias-Borrego, A.; García-Barrera, T.; Beltran, R. Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication. *Talanta* **2006**, *70* (4), 859-869.
125. Lerma-García, M. J.; Herrero-Martínez, J. M.; Ramis-Ramos, G.; Simó-Alfonso, E. F. Evaluation of the quality of olive oil using fatty acid profiles by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* **2008**, *107* (3), 1307-1313.
126. Lerma-García, M. J.; Herrero-Martínez, J. M.; Ramis-Ramos, G.; Simó-Alfonso, E. F. Prediction of the genetic variety of Spanish extra virgin olive oils using fatty acid and phenolic compound profiles established by direct infusion mass spectrometry. *Food Chemistry* **2008**, *108* (3), 1142-1148.
127. Alves, J. O.; Botelho, B. G.; Sena, M. M.; Augusti, R. Electrospray ionization mass spectrometry and partial least squares discriminant analysis applied to the

- quality control of olive oil. *Journal of Mass Spectrometry* **2013**, 48 (10), 1109-1115.
128. Morales, M. T.; Aparicio, R.; Rios, J. J. Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A* **1994**, 668 (2), 455-462.
 129. Marcos Lorenzo, I.; Pérez Pavón, J. L.; Fernández Laespada, M. E.; García Pinto, C.; Moreno Cordero, B. Detection of adulterants in olive oil by headspace-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2002**, 945 (1-2), 221-230.
 130. Peña, F.; Cárdenas, S.; Gallego, M.; Valcárcel, M. Direct olive oil authentication: Detection of adulteration of olive oil with hazelnut oil by direct coupling of headspace and mass spectrometry, and multivariate regression techniques. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1074 (1-2), 215-221.
 131. Oliveros, C. C.; Boggia, R.; Casale, M.; Armanino, C.; Forina, M. Optimisation of a new headspace mass spectrometry instrument: Discrimination of different geographical origin olive oils. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1076 (1-2), 7-15.
 132. López-Feria, S.; Cárdenas, S.; García-Mesa, J. A.; Valcárcel, M. Usefulness of the direct coupling headspace-mass spectrometry for sensory quality characterization of virgin olive oil samples. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 583 (2), 411-417.
 133. López-Feria, S.; Cárdenas, S.; García-Mesa, J. A.; Valcárcel, M. Classification of extra virgin olive oils according to the protected designation of origin, olive variety and geographical origin. *Talanta* **2008**, 75 (4), 937-943.
 134. López-Feria, S.; Cárdenas, S.; García-Mesa, J. A.; Valcárcel, M. Simple and rapid instrumental characterization of sensory attributes of virgin olive oil based on the direct coupling headspace-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1188 (2), 308-313.
 135. Sánchez-Hernández, L.; Nozal, L.; Marina, M. L.; Crego, A. L. Determination of nonprotein amino acids and betaines in vegetable oils by flow injection triple-quadrupole tandem mass spectrometry: A screening method for the detection of adulterations of olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, 60 (4), 896-903.
 136. Biasioli, F.; Gasperi, F.; Aprea, E.; Mott, D.; Boscaini, E.; Mayr, D.; Märk, T. D. Coupling Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry with Linear Discriminant Analysis: A Case Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51 (25), 7227-7233.
 137. Macatelli, M.; Akkermans, W.; Koot, A.; Buchgraber, M.; Paterson, A.; van Ruth, S. Verification of the geographical origin of European butters using PTR-MS. *Journal of Food Composition and Analysis* **2009**, 22 (2), 169-175.
 138. Araghipour, N.; Colineau, J.; Koot, A.; Akkermans, W.; Rojas, J. M. M.; Beauchamp, J.; Wisthaler, A.; Märk, T. D.; Downey, G.; Guillou, C.; Mannina, L.; Ruth, S. Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS. *Food Chemistry* **2008**, 108 (1), 374-383.

139. Aprea, E.; Biasioli, F.; Sani, G.; Cantini, C.; Märk, T. D.; Gasperi, F. Proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS) headspace analysis for rapid detection of oxidative alteration of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (20), 7635-7640.
140. Vezzaro, A.; Boschetti, A.; Dell'Anna, R.; Canteri, R.; Dimauro, M.; Ramina, A.; Ferasin, M.; Giulivo, C.; Ruperti, B. Influence of olive (cv Grignano) fruit ripening and oil extraction under different nitrogen regimes on volatile organic compound emissions studied by PTR-MS technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *399* (7), 2571-2582.
141. Ruiz-Samblás, C.; Tres, A.; Koot, A.; Van Ruth, S. M.; González-Casado, A.; Cuadros-Rodríguez, L. Proton transfer reaction-mass spectrometry volatile organic compound fingerprinting for monovarietal extra virgin olive oil identification. *Food Chemistry* **2012**, *134* (1), 589-596.
142. Karpas, Z. Ion mobility spectrometry: A personal retrospective. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* **2012**, *15* (1), 1-8.
143. Eiceman, G. A.; Schmidt, H. Advances in Ion Mobility Spectrometry of Explosives. In *Aspects of Explosives Detection*, Marshall, M.; Oxley, J.C., Eds.; Amsterdam: Elsevier, 2009; pp 171-202.
144. Ewing, R. G.; Atkinson, D. A.; Eiceman, G. A.; Ewing, G. J. A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds. *Talanta* **2001**, *54* (3), 515-529.
145. Alonso, R.; Rodríguez-Estévez, V.; Domínguez-Vidal, A.; Ayora-Cañada, M. J.; Arce, L.; Valcárcel, M. Ion mobility spectrometry of volatile compounds from Iberian pig fat for fast feeding regime authentication. *Talanta* **2008**, *76* (3), 591-596.
146. Garrido-Delgado, R.; Mercader-Trejo, F.; Sielemann, S.; de Bruyn, W.; Arce, L.; Valcárcel, M. Direct classification of olive oils by using two types of ion mobility spectrometers. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *696* (1-2), 108-115.
147. Garrido-Delgado, R.; Mercader-Trejo, F.; Arce, L.; Valcárcel, M. Enhancing sensitivity and selectivity in the determination of aldehydes in olive oil by use of a Tenax TA trap coupled to a UV-ion mobility spectrometer. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (42), 7543-7549.
148. Garrido-Delgado, R.; Arce, L.; Valcárcel, M. Multi-capillary column-ion mobility spectrometry: A potential screening system to differentiate virgin olive oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *402* (1), 489-498.
149. Aston, F. W. International table of stable isotopes. *Nature* **1942**, *150* (3809), 515.
150. Luo, Y.; Sternberg, L. Deuterium heterogeneity in starch and cellulose nitrate of cam and C3 plants. *Phytochemistry* **1991**, *30* (4), 1095-1098.
151. Martin, G. J.; Martin, M. L. Climatic significance of isotope ratios. *Phytochemistry Reviews* **2003**, *2* (1-2), 179-190.

152. Iacumin, P.; Bernini, L.; Boschetti, T. Climatic factors influencing the isotope composition of Italian olive oils and geographic characterisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23* (3), 448-454.
153. Brenna, J. T. Natural intramolecular isotope measurements in physiology: Elements of the case for an effort toward high-precision position-specific isotope analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, *15* (15), 1252-1262.
154. Brenna, J. T.; Corso, T. N.; Tobias, H. J.; Caimi, R. J. High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16* (5), 227-258.
155. Scrimgeour, C. M. Measurement and applications of stable isotopes in fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2002**, *104* (1), 57-59.
156. Guillou, C.; Lipp, M.; Radovic, B.; Reniero, F.; Schmidt, M.; Anklam, E. Use of pyrolysis-mass spectrometry in food analysis: Applications in the food analysis laboratory of the European Commissions' Joint Research Centre. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **1999**, *49* (1), 329-335.
157. Goodacre, R. Use of pyrolysis mass spectrometry with supervised learning for the assessment of the adulteration of milk of different species. *Applied Spectroscopy* **1997**, *51* (8), 1144-1153.
158. Goodacre, R.; Hammond, D.; Kell, D. B. Quantitative analysis of the adulteration of orange juice with sucrose using pyrolysis mass spectrometry and chemometrics. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **1997**, *40-41*, 135-158.
159. Giménez-Miralles, J. E.; Salazar, D. M.; Solana, I. Regional origin assignment of red wines from Valencia (Spain) by ²H NMR and ¹³C IRMS stable isotope analysis of fermentative ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47* (7), 2645-2652.
160. Ogrinc, N.; Kosir, I. J.; Kocjancic, M.; Kidric, J. Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49* (3), 1432-1440.
161. Suzuki, Y.; Chikaraishi, Y.; Ogawa, N. O.; Ohkouchi, N.; Korenaga, T. Geographical origin of polished rice based on multiple element and stable isotope analyses. *Food Chemistry* **2008**, *109* (2), 470-475.
162. Heaton, K.; Kelly, S. D.; Hoogewerff, J.; Woolfe, M. Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis. *Food Chemistry* **2008**, *107* (1), 506-515.
163. Longobardi, F.; Casiello, G.; Sacco, D.; Tedone, L.; Sacco, A. Characterisation of the geographical origin of Italian potatoes, based on stable isotope and volatile compound analyses. *Food Chemistry* **2011**, *124* (4), 1708-1713.
164. Vinci, G.; Preti, R.; Tieri, A.; Vieri, S. Authenticity and quality of animal origin food investigated by stable-isotope ratio analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2013**, *93* (3), 439-448.

165. Tosun, M. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. *Food Chemistry* **2013**, *138* (2-3), 1629-1632.
166. Zhao, Y.; Zhang, B.; Chen, G.; Chen, A.; Yang, S.; Ye, Z. Recent developments in application of stable isotope analysis on agro-product authenticity and traceability. *Food Chemistry* **2014**, *145*, 300-305.
167. Angerosa, F.; Camera, L.; Cuminini, S.; Gleixner, G.; Reniero, F. Carbon Stable Isotopes and Olive Oil Adulteration with Pomace Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45* (8), 3044-3048.
168. Cristea, G.; Magdas, D. A.; Mirel, V. The use of isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) for vegetable oils authentication. AIP Conference Proceedings. *Processes in isotopes and molecules*, 2011; pp 168-170.
169. Salter, G. J.; Lazzari, M.; Giansante, L.; Goodacre, R.; Jones, A.; Surricchio, G.; Kella, D. B.; Bianchi, G. Determination of the geographical origin of Italian extra virgin olive oil using pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **1997**, *40-41*, 159-170.
170. Angerosa, F.; Bréas, O.; Contento, S.; Guillou, C.; Reniero, F.; Sada, E. Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47* (3), 1013-1017.
171. Aramendía, M. A.; Marinas, A.; Marinas, J. M.; Moreno, J. M.; Moalem, M.; Rallo, L.; Urbano, F. J. Oxygen-18 measurement of Andalusian olive oils by continuous flow pyrolysis/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21* (4), 487-496.
172. Aramendía, M. A.; Marinas, A.; Marinas, J. M.; Sánchez, E.; Urbano, F. J.; Guillou, C.; Moreno Rojas, J. M.; Moalem, M.; Rallo, L. A nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C) and isotope ratio mass spectrometry (d^{13}C , d^2H and d^{18}O) study of andalusian olive oils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24* (10), 1457-1466.
173. Camin, F.; Larcher, R.; Perini, M.; Bontempo, L.; Bertoldi, D.; Gagliano, G.; Nicolini, G.; Versini, G. Characterisation of authentic Italian extra-virgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition. *Food Chemistry* **2010**, *118* (4), 901-909.
174. Camin, F.; Larcher, R.; Nicolini, G.; Bontempo, L.; Bertoldi, D.; Perini, M.; Schlicht, C.; Schellenberg, A.; Thomas, F.; Heinrich, K.; Voerkelius, S.; Horacek, M.; Ueckermann, H.; Froeschl, H.; Wimmer, B.; Heiss, G.; Baxter, M.; Rossmann, A.; Hoogewerff, J. Isotopic and elemental data for tracing the origin of European olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (1), 570-577.
175. Alonso-Salces, R. M.; Moreno-Rojas, J. M.; Holland, M. V.; Reniero, F.; Guillou, C.; Héberger, K. Virgin olive oil authentication by multivariate analyses of ^1H NMR fingerprints and d^{13}C and d^2H data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (9), 5586-5596.

176. Chiavaro, E.; Cerretani, L.; di Matteo, A.; Barnaba, C.; Bendini, A.; Iacumin, P. Application of a multidisciplinary approach for the evaluation of traceability of extra virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2011**, *113* (12), 1509-1519.
177. Karabagias, I.; Michos, C.; Badeka, A.; Kontakos, S.; Stratis, I.; Kontominas, M. G. Classification of Western Greek virgin olive oils according to geographical origin based on chromatographic, spectroscopic, conventional and chemometric analyses. *Food Research International* **2013**, *54* (2), 1950-1958.
178. Silverstein R.M.; Webster F.X.; Kiemle D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; 7th ed.; John Wiley & Sons: USA, 2005.
179. Williams, P. C.; Stevensen, S. G. Near-infrared reflectance analysis: food industry applications. *Trends in Food Science and Technology* **1990**, *1* (C), 44-48.
180. Bellon, V.; Vigneau, J. L.; Sévila, F. Infrared and near-infrared technology for the food industry and agricultural uses: on-line applications. *Food Control* **1994**, *5* (1), 21-27.
181. Benito, M. T. J.; Ojeda, C. B.; Rojas, F. S. Process analytical chemistry: Applications of near infrared spectrometry in environmental and food analysis: An overview. *Applied Spectroscopy Reviews* **2008**, *43* (5), 452-484.
182. Cen, H.; He, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science and Technology* **2007**, *18* (2), 72-83.
183. Osborne, B. G. Recent developments in NIR analysis of grains and grain products. *Cereal Foods World* **2000**, *45* (1), 11-15.
184. Ozaki, Y.; McClure, W. F.; Christy, A. A. *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*; John Wiley & Sons: USA, 2006.
185. Blanco, M.; Villarroya, I. NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2002**, *21* (4), 240-250.
186. Stuart B.H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons: USA, 2004.
187. Büning-Pfaue, H. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry* **2003**, *82* (1), 107-115.
188. Baeten, V.; Aparicio, R.; Marigheto, N. A.; Wilson, R. H. Olive oil analysis by infrared and Raman spectroscopy: methodologies and applications. In *Handbook of olive oil: Analysis and properties*, Harwood, J. L.; Aparicio, R., Eds.; USA, 2000; pp 207-245.
189. Maraboli, A.; Cattaneo, T. M. P.; Giangiacomo, R. Detection of vegetable proteins from soy, pea and wheat isolates in milk powder by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **2002**, *10* (1), 63-69.

190. Borin, A.; Ferrão, M. F.; Mello, C.; Maretto, D. A.; Poppi, R. J. Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *579* (1), 25-32.
191. Kasemsumran, S.; Thanapase, W.; Kiatsoonthon, A. Feasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. *Analytical Sciences* **2007**, *23* (7), 907-910.
192. Mauer, L. J.; Chernyshova, A. A.; Hiatt, A.; Deering, A.; Davis, R. Melamine detection in infant formula powder using near- and mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (10), 3974-3980.
193. Contal, L.; León, V.; Downey, G. Detection and quantification of apple adulteration in strawberry and raspberry purées using visible and near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **2002**, *10* (4), 289-299.
194. Saranwong, S.; Kawano, S. Rapid determination of fungicide contaminated on tomato surfaces using the DESIR-NIR: A system for ppm-order concentration. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **2005**, *13* (3), 169-175.
195. Cocchi, M.; Durante, C.; Foca, G.; Marchetti, A.; Tassi, L.; Ulrici, A. Durum wheat adulteration detection by NIR spectroscopy multivariate calibration. *Talanta* **2006**, *68* (5), 1505-1511.
196. Paradkar, M. M.; Sivakesava, S.; Irudayaraj, J. Discrimination and classification of adulterants in maple syrup with the use of infrared spectroscopic techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2002**, *82* (5), 497-504.
197. León, L.; Daniel Kelly, J.; Downey, G. Detection of apple juice adulteration using near-infrared transreflectance spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2005**, *59* (5), 593-599.
198. Pontes, M. J. C.; Santos, S. R. B.; Araújo, M. C. U.; Almeida, L. F.; Lima, R. A. C.; Gaião, E. N.; Souto, U. T. C. P. Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by near infrared spectrometry. *Food Research International* **2006**, *39* (2), 182-189.
199. Cozzolino, D.; Parker, M.; Damberg, R. G.; Herderich, M.; Gishen, M. Chemometrics and visible-near infrared spectroscopic monitoring of red wine fermentation in a pilot scale. *Biotechnology and Bioengineering* **2006**, *95* (6), 1101-1107.
200. Cozzolino, D.; Kwiatkowski, M. J.; Parker, M.; Cynkar, W. U.; Damberg, R. G.; Gishen, M.; Herderich, M. J. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513* (1), 73-80.
201. Cozzolino, D.; Smyth, H. E.; Gishen, M. Feasibility Study on the Use of Visible and Near-Infrared Spectroscopy Together with Chemometrics to Discriminate between Commercial White Wines of Different Varietal Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (26), 7703-7708.
202. Garde-Cerdán, T.; Lorenzo, C.; Alonso, G. L.; Salinas, M. R. Review of the use of near infrared spectroscopy to determine different wine parameters: Discrimination between wines. *Current Bioactive Compounds* **2012**, *8* (4), 353-369.

203. Williams, P.; Norris, K. *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of Cereal Chemists: USA, 1987.
204. Slaughter, D.; Klueter, H.; Mitchell, A. D.; Norris, K. H. Near infrared reflectance of ground hog carcass composition. In *The 2th Int NIRS conference*, Iwamoto, M.; Kawano, M., Eds.; National food Research Institute: Japan, 1990; pp 148-156.
205. Cornish, G. B. NIR analysis of sausage meat. In *Proc. of the 3th Int. Conference on Near Infrared Spectroscopy*, Biston, R.; Bartiaux-Thill, N., Eds.; Agricultural Research Centre: Belgium, 1991; pp 194-200.
206. Devaux, M. F.; Robert, P.; Qannari, A.; Safar, M.; Vigneau, E. Canonical correlation analysis of mid- and near-infrared oil spectra. *Applied Spectroscopy* **1993**, *47* (7), 1024-1029.
207. Garrido-Varo, A.; García-Olmo, J.; Pérez-Marín, D. Applications in fats and oils. In *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*, Roberts, C. A.; Workman, J. J.; Reeves III, J. B., Eds.; American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America: Madison, Wisconsin, USA, 2004; pp 487-558.
208. Cho, R. K.; Iwamoto, M. The purity identification of sesame oil by Near-Infrared Reflectance spectroscopy. In *The 2th Int. NIRS Conference.*, Iwamoto, M.; Kawano, S., Eds.; National Food Research Institute: Japan, 1990; pp 142-147.
209. Sato, T.; Kawano, S.; Iwamoto, M. Near infrared spectral patterns of fatty acid analysis from fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* **1991**, *68* (11), 827-833.
210. Chen, Y. S.; Chen, A. O. Quality analysis and purity examination of edible vegetable oils by near Infrared Transmittance Spectroscopy. In *Proceedings of the 6th international conference on near infrared spectroscopy.*, Royal Australian Chemical Institute: North Melbourne, 1995; pp 316-323.
211. Garrido-Varo, A.; Pérez-Marín, D.; Bautista-Cruz, J.; Guerrero-Ginel, J. E. Near infrared spectroscopy for quantification of animal-origin fats in fat blends. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **2008**, *16* (3), 281-283.
212. Wesley, I. J.; Pacheco, F.; McGill, A. E. J. Identification of adulterants in olive oils. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **1996**, *73* (4), 515-518.
213. Downey, G.; McIntyre, P.; Davies, A. N. Detecting and quantifying sunflower oil adulteration in extra virgin olive oils from the Eastern Mediterranean by visible and near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50* (20), 5520-5525.
214. Hourant, P.; Baeten, V.; Morales, M. T.; Meurens, M.; Aparicio, R. Oil and fat classification by selected bands of near-infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2000**, *54* (8), 1168-1174.
215. Christy, A. A.; Kasemsumran, S.; Du, Y.; Ozaki, Y. The detection and quantification of adulteration in olive oil by near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Analytical Sciences* **2004**, *20* (6), 935-940.

216. Kasemsumran, S.; Kang, N.; Christy, A.; Ozaki, Y. Partial least squares processing of near-infrared spectra for discrimination and quantification of adulterated olive oils. *Spectroscopy Letters* **2005**, 38 (6), 839-851.
217. Örtürk, B.; Yalcin, A.; Özdemir, D. Determination of olive oil adulteration with vegetable oils by near infrared spectroscopy coupled with multivariate calibration. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **2010**, 18 (3), 191-201.
218. Bertran, E.; Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Montoliu, I. Near infrared spectrometry and pattern recognition as screening methods for the authentication of virgin olive oils of very close geographical origins. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **2000**, 8 (1), 45-52.
219. Downey, G.; McIntyre, P.; Davies, A. N. Geographic classification of extra virgin olive oils from the eastern Mediterranean by chemometric analysis of visible and near-infrared spectroscopic data. *Applied Spectroscopy* **2003**, 57 (2), 158-163.
220. Galtier, O.; Dupuy, N.; Le Dréau, Y.; Ollivier, D.; Pinatel, C.; Kister, J.; Artaud, J. Geographic origins and compositions of virgin olive oils determined by chemometric analysis of NIR spectra. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 595 (1-2 SPEC. ISS.), 136-144.
221. Woodcock, T.; Downey, G.; O'Donnell, C. P. Confirmation of declared provenance of European extra virgin olive oil samples by NIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56 (23), 11520-11525.
222. Guillén, M. D.; Cabo, N. Characterization of edible oils and lard by fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **1997**, 74 (10), 1281-1286.
223. Lachenmeier, D. W. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry* **2007**, 101 (2), 825-832.
224. Vardin, H.; Tay, A.; Ozen, B.; Mauer, L. Authentication of pomegranate juice concentrate using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry* **2008**, 108 (2), 742-748.
225. Holland, J. K.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H. Use of fourier transform infrared spectroscopy and partial least squares regression for the detection of adulteration of strawberry purees. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1998**, 76 (2), 263-269.
226. Pappas, C. S.; Tarantilis, P. A.; Moschopoulou, E.; Moatsou, G.; Kandarakis, I.; Polissiou, M. G. Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry* **2008**, 106 (3), 1271-1277.
227. Woodcock, T.; Fagan, C. C.; O'Donnell, C. P.; Downey, G. Application of near and mid-infrared spectroscopy to determine cheese quality and authenticity. *Food and Bioprocess Technology* **2008**, 1 (2), 117-129.

228. Karoui, R.; Bosset, J. O.; Mazerolles, G.; Kulmyrzaev, A.; Dufour, E. Monitoring the geographic origin of both experimental French Jura hard cheeses and Swiss Gruyère and L'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: A preliminary investigation. *International Dairy Journal* **2005**, *15* (3), 275-286.
229. Al-Jowder, O.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H. Mid-infrared spectroscopy and authenticity problems in selected meats: A feasibility study. *Food Chemistry* **1997**, *59* (2), 195-201.
230. Ellis, D. I.; Broadhurst, D.; Clarke, S. J.; Goodacre, R. Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning. *Analyst* **2005**, *130* (12), 1648-1654.
231. Bertelli, D.; Plessi, M.; Sabatini, A. G.; Lolli, M.; Grillenzoni, F. Classification of Italian honeys by mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy (DRIFTS). *Food Chemistry* **2007**, *101* (4), 1565-1570.
232. Ruoff, K.; Luginbühl, W.; Künzli, R.; Iglesias, M. T.; Bogdanov, S.; Bosset, J. O.; Von Der Ohe, K.; Von Der Ohe, W.; Amadò, R. Authentication of the botanical and geographical origin of honey by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (18), 6873-6880.
233. Etzold, E.; Lichtenberg-Kraag, B. Determination of the botanical origin of honey by Fourier-transformed infrared spectroscopy: An approach for routine analysis. *European Food Research and Technology* **2008**, *227* (2), 579-586.
234. Dupuy, N.; Duponchel, L.; Huvenne, J. P.; Sombret, B.; Legrand, P. Classification of edible fats and oils by principal component analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry* **1996**, *57* (2), 245-251.
235. Goodacre, R.; Anklam, E. Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics as a tool for the rapid detection of other vegetable fats mixed in cocoa butter. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2001**, *78* (10), 993-1000.
236. Al-Alawi, A.; Van de Voort, F. R.; Sedman, J.; Ghetler, A. Automated FTIR analysis of free fatty acids or moisture in edible oils. *JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation* **2006**, *11* (1), 23-29.
237. Bertran, E.; Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Montoliu, I. Determination of olive oil free fatty acid by Fourier transform infrared spectroscopy. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **1999**, *76* (5), 611-616.
238. Rohman, A.; Che Man, Y. B. Analysis of chicken fat as adulterant in cod liver oil using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics. *CYTA - Journal of Food* **2011**, *9* (3), 187-191.
239. Rohman, A.; Che Man, Y. B. Authentication analysis of cod liver oil from beef fat using fatty acid composition and FTIR spectra. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **2011**, *28* (11), 1469-1474.

240. Rohman, A.; Sunarminingsih, R.; Man, Y. B. C. The employment of FTIR spectroscopy and chemometrics for classification and quantification of mutton fat in cod liver oil. *American Journal of Food Technology* **2012**, 7 (3), 151-159.
241. Rohman, A.; Che Man, Y. B.; Ismail, A.; Puziah, H. FTIR spectroscopy combined with multivariate calibration for analysis of cod liver oil in binary mixture with corn oil. *International Food Research Journal* **2011**, 18 (2).
242. Rohman, A.; Man, Y. B. C. Monitoring of virgin coconut oil (VCO) adulteration with palm oil using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Lipids* **2009**, 16 (4), 618-628.
243. Zhang, Q.; Liu, C.; Sun, Z.; Hu, X.; Shen, Q.; Wu, J. Authentication of edible vegetable oils adulterated with used frying oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Chemistry* **2012**, 132 (3), 1607-1613.
244. Deng, D. H.; Xu, L.; Ye, Z. H.; Cui, H. F.; Cai, C. B.; Yu, X. P. FTIR spectroscopy and chemometric class modeling techniques for authentication of Chinese sesame oil. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2012**, 89 (6), 1003-1009.
245. Lai, Y. W.; Katherine Kemsley, E.; Wilson, R. H. Potential of fourier transform infrared spectroscopy for the authentication of vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994**, 42 (5), 1154-1159.
246. Küpper, L.; Heise, H. M.; Lampen, P.; Davies, A. N.; McIntyre, P. Authentication and quantification of extra virgin olive oils by attenuated total reflectance infrared spectroscopy using silver halide fiber probes and partial least-square calibration. *Applied Spectroscopy* **2001**, 55 (5), 563-570.
247. Tay, A.; Singh, R. K.; Krishnan, S. S.; Gore, J. P. Authentication of olive oil adulterated with vegetable oils using Fourier transform infrared spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology* **2002**, 35 (1), 99-103.
248. Ozen, B. F.; Mauer, L. J. Detection of hazelnut oil adulteration using FT-IR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50 (14), 3898-3901.
249. Vlachos, N.; Skopelitis, Y.; Psaroudaki, M.; Konstantinidou, V.; Chatzilazarou, A.; Tegou, E. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 573-574, 459-465.
250. Gurdeniz, G.; Tokatli, F.; Ozen, B. Differentiation of mixtures of monovarietal olive oils by mid-infrared spectroscopy and chemometrics. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2007**, 109 (12), 1194-1202.
251. Allam, M. A.; Hamed, S. F. Application of FTIR spectroscopy in the assessment of olive oil adulteration. *Journal of Applied Sciences Research* **2007**, 3 (2), 102-108.
252. Obeidat, S. M.; Khanfar, M. S.; Obeidat, W. M. Classification of edible oils and uncovering adulteration of virgin olive oil using FTIR with the aid of chemometrics. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **2009**, 3 (3), 2048-2053.

253. Lerma-García, M. J.; Ramis-Ramos, G.; Herrero-Martínez, J. M.; Simó-Alfonso, E. F. Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* **2010**, *118* (1), 78-83.
254. Maggio, R. M.; Cerretani, L.; Chiavaro, E.; Kaufman, T. S.; Bendini, A. A novel chemometric strategy for the estimation of extra virgin olive oil adulteration with edible oils. *Food Control* **2010**, *21* (6), 890-895.
255. Oussama, A.; Elabadi, F.; Platikanov, S.; Kzaiber, F.; Tauler, R. Detection of olive oil adulteration using FT-IR spectroscopy and PLS with variable importance of projection (VIP) scores. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2012**, *89* (10), 1807-1812.
256. Javidnia, K.; Parish, M.; Karimi, S.; Hemmateenejad, B. Discrimination of edible oils and fats by combination of multivariate pattern recognition and FT-IR spectroscopy: A comparative study between different modeling methods. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, *104*, 175-181.
257. Rohman, A.; Man, Y. B. C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Research International* **2010**, *43* (3), 886-892.
258. Rohman, A.; Che Man, Y. B. Quantification and classification of corn and sunflower oils as adulterants in olive oil using chemometrics and FTIR spectra. *The Scientific World Journal* **2012**, *2012*, 250795.
259. Rohman, A.; Man, Y. B. C. The chemometrics approach applied to FTIR spectral data for the analysis of rice bran oil in extra virgin olive oil. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2012**, *110* (1), 129-134.
260. Rohman, A.; Che Man, Y. B.; Hashim, P.; Ismail, A. FTIR spectroscopy combined with chemometrics for analysis of lard adulteration in some vegetable oils. *CYTA - Journal of Food* **2011**, *9* (2), 96-101.
261. Rohman, A.; Che Man, Y. B.; Yusof, F. M. The use of FTIR spectroscopy and chemometrics for rapid authentication of extra virgin olive oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2014**, *91* (2), 207-213.
262. de la Mata, P.; Dominguez-Vidal, A.; Bosque-Sendra, J. M.; Ruiz-Medina, A.; Cuadros-Rodríguez, L.; Ayora-Cañada, M. J. Olive oil assessment in edible oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics. *Food Control* **2012**, *23* (2), 449-455.
263. Tapp, H. S.; Defernez, M.; Kemsley, E. K. FTIR spectroscopy and multivariate analysis can distinguish the geographic origin of extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (21), 6110-6115.
264. Bendini, A.; Cerretani, L.; Di Virgilio, F.; Belloni, P.; Bonoli-Carbognin, M.; Lercker, G. Preliminary evaluation of the application of the FTIR spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. *Journal of Food Quality* **2007**, *30* (4), 424-437.
265. Caetano, S.; Üstün, B.; Hennessy, S.; Smeyers-Verbeke, J.; Melssen, W.; Downey, G.; Buydens, L.; Vander Heyden, Y. Geographical classification of olive oils by the

- application of CART and SVM to their FT-IR. *Journal of Chemometrics* **2007**, *21* (7-9), 324-334.
266. Gurdeniz, G.; Ozen, B.; Tokatli, F. Classification of Turkish olive oils with respect to cultivar, geographic origin and harvest year, using fatty acid profile and mid-IR spectroscopy. *European Food Research and Technology* **2008**, *227* (4), 1275-1281.
267. Hennessy, S.; Downey, G.; O'Donnell, C. P. Confirmation of Food Origin Claims by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics: Extra Virgin Olive Oil from Liguria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (5), 1735-1741.
268. Aouidi, F.; Dupuy, N.; Artaud, J.; Roussos, S.; Msallem, M.; Perraud-Gaime, I.; Hamdi, M. Discrimination of five Tunisian cultivars by Mid InfraRed spectroscopy combined with chemometric analyses of olive *Olea europaea* leaves. *Food Chemistry* **2012**, *131* (1), 360-366.
269. Ellis, D. I.; Brewster, V. L.; Dunn, W. B.; Allwood, J. W.; Golovanov, A. P.; Goodacre, R. Fingerprinting food: Current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (17), 5706-5727.
270. Raman, C. V.; Krishnan, K. S. A new type of secondary radiation. *Nature* **1928**, *121* (3048), 501-502.
271. Colthup N.B.; Daly L.H.; Wiberley S.E. *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*, Academic Press, San Diego, USA, 1990.
272. Das, R. S.; Agrawal, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy* **2011**, *57* (2), 163-176.
273. Almeida, M. R.; Oliveira, K. D. S.; Stephani, R.; De Oliveira, L. F. C. Fourier-transform Raman analysis of milk powder: A potential method for rapid quality screening. *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *42* (7), 1548-1552.
274. Uysal, R. S.; Boyaci, I. H.; Genis, H. E.; Tamer, U. Determination of butter adulteration with margarine using Raman spectroscopy. *Food Chemistry* **2013**, *141* (4), 4397-4403.
275. Goodacre, R.; Radovic, B. S.; Anklam, E. Progress toward the rapid nondestructive assessment of the floral origin of European honey using dispersive Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2002**, *56* (4), 521-527.
276. Kim, Y.; Lee, S.; Chung, H.; Choi, H.; Cha, K. Improving Raman spectroscopic differentiation of the geographical origin of rice by simultaneous illumination over a wide sample area. *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, *40* (2), 191-196.
277. El-Abassy, R. M.; Donfack, P.; Materny, A. Assessment of conventional and microwave heating induced degradation of carotenoids in olive oil by VIS Raman spectroscopy and classical methods. *Food Research International* **2010**, *43* (3), 694-700.

278. Bailey, G. F.; Horvat, R. J. Raman spectroscopic analysis of the cis/trans isomer composition of edible vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1972**, *49* (8), 494-498.
279. Sadeghi-Jorabchi, H.; Wilson, R. H.; Belton, P. S.; Edwards-Webb, J. D.; Coxon, D. T. Quantitative analysis of oils and fats by Fourier transform Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1991**, *47* (9-10), 1449-1458.
280. Sadeghi-Jorabchi, H.; Hendra, P. J.; Wilson, R. H.; Belton, P. S. Determination of the total unsaturation in oils and margarines by fourier transform raman spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1990**, *67* (8), 483-486.
281. Grasselli, J. G.; Bulkin, B. J. *Analytical Raman Spectroscopy*; Wiley: New York, 1991.
282. Aparicio, R.; Baeten, V. Fats and oils authentication by FT-Raman. *OCL - Oleagineux Corps gras Lipides* **1998**, *5* (4), 293-295.
283. Baeten, V.; Meurens, M.; Morales, M. T.; Aparicio, R. Detection of Virgin Olive Oil Adulteration by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44* (8), 2225-2230.
284. Baeten, V.; Hourant, P.; Morales, M. T.; Aparicio, R. Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (7), 2638-2646.
285. El-Abassy, R. M.; Donfack, P.; Materny, A. Rapid determination of free fatty acid in extra virgin olive oil by raman spectroscopy and multivariate analysis. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2009**, *86* (6), 507-511.
286. López-Díez, E. C.; Bianchi, G.; Goodacre, R. Rapid quantitative assessment of the adulteration of virgin olive oils with hazelnut oils using Raman spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (21), 6145-6150.
287. Heise, H. M.; Damm, U.; Lampen, P.; Davies, A. N.; McIntyre, P. S. Spectral variable selection for partial least squares calibration applied to authentication and quantification of extra virgin olive oils using Fourier transform Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2005**, *59* (10), 1286-1294.
288. Zou, M. Q.; Zhang, X. F.; Xiao-Hua, Q. I.; Han-Lu, M.; Dong, Y.; Chun-Wei, L. I. U.; Guo, X. U. N.; Wang, H. Rapid authentication of olive oil adulteration by raman spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (14), 6001-6006.
289. El-Abassy, R. M.; Donfack, P.; Materny, A. Visible Raman spectroscopy for the discrimination of olive oils from different vegetable oils and the detection of adulteration. *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, *40* (9), 1284-1289.
290. Zhang, X. F.; Zou, M. Q.; Qi, X. H.; Liu, F.; Zhang, C.; Yin, F. Quantitative detection of adulterated olive oil by Raman spectroscopy and chemometrics. *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *42* (9), 1784-1788.

291. Zhang, X.; Qi, X.; Zou, M.; Liu, F. Rapid authentication of olive oil by Raman spectroscopy using principal component analysis. *Analytical Letters* **2011**, *44* (12), 2209-2220.
292. Dong, W.; Zhang, Y.; Zhang, B.; Wang, X. Rapid prediction of fatty acid composition of vegetable oil by Raman spectroscopy coupled with least squares support vector machines. *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, *44* (12), 1739-1745.
293. Korifi, R.; Le Dréau, Y.; Molinet, J.; Artaud, J.; Dupuy, N. Composition and authentication of virgin olive oil from French PDO regions by chemometric treatment of Raman spectra. *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *42* (7), 1540-1547.
294. Gutowsky, H. S.; Kistiakowsky, G. B.; Pake, G. E.; Purcell, E. M. Structural investigations by means of nuclear magnetism. I. Rigid crystal lattices. *The Journal of Chemical Physics* **1949**, *17* (10), 972-981.
295. Lindner, P.; Bermann, E.; Gamarnik, B. Characterization of Citrus Honey by Deuterium NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44* (1), 139-140.
296. Cotte, J. F.; Casabianca, H.; Lhéritier, J.; Perrucchiotti, C.; Sanglar, C.; Waton, H.; Grenier-Loustalot, M. F. Study and validity of ¹³C stable carbon isotopic ratio analysis by mass spectrometry and ²H site-specific natural isotopic fractionation by nuclear magnetic resonance isotopic measurements to characterize and control the authenticity of honey. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *582* (1), 125-136.
297. Lolli, M.; Bertelli, D.; Plessi, M.; Sabatini, A. G.; Restani, C. Classification of Italian honeys by 2D HR-NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (4), 1298-1304.
298. Spraul, M.; Rinke, P.; Moitrier, S. NMR fruit juice screening ensures quality control. *Laboratory Equipment* **2007**, *43* (10).
299. Cuny, M.; Vigneau, E.; Le Gall, G.; Colquhoun, I.; Lees, M.; Rutledge, D. N. Fruit juice authentication by ¹H NMR spectroscopy in combination with different chemometrics tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390* (1), 419-427.
300. Lachenmeier, D. W.; Frank, W.; Humpfer, E.; Schäfer, H.; Keller, S.; Mörtter, M.; Spraul, M. Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. *European Food Research and Technology* **2005**, *220* (2), 215-221.
301. Weekley, A. J.; Bruins, P.; Sisto, M.; Augustine, M. P. Using NMR to study full intact wine bottles. *Journal of Magnetic Resonance* **2003**, *161* (1), 91-98.
302. Consonni, R.; Cagliani, L. R. Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by ¹H NMR spectroscopy. *Talanta* **2008**, *76* (1), 200-205.
303. Jung, Y.; Lee, J.; Kwon, J.; Lee, K. S.; Ryu, D. H.; Hwang, G. S. Discrimination of the geographical origin of beef by ¹H NMR-based metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (19), 10458-10466.

304. Spyros, A.; Dais, P. Application of ³¹P NMR spectroscopy in food analysis. 1. Quantitative determination of the mono- and diglyceride composition of olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48* (3), 802-805.
305. Dais, P.; Spyros, A. ³¹P NMR spectroscopy in the quality control and authentication of extra-virgin olive oil: A review of recent progress. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2007**, *45* (5), 367-377.
306. Fronimaki, P.; Spyros, A.; Christophoridou, S.; Dais, P. Determination of the diglyceride content in Greek virgin olive oils and some commercial olive oils by employing ³¹P NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50* (8), 2207-2213.
307. Dais, P.; Hatzakis, E. Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *765*, 1-27.
308. Enzo P.; Benincasa C.; Innocenzo M. Olive Oil Traceability. *Olive Germplasm: The olive Cultivation, Table and Olive Oil Industry in Italy* **2012**, 265-286.
309. Guillén, M. D.; Ruiz, A. High resolution ¹H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends in Food Science and Technology* **2001**, *12* (9), 328-338.
310. Hidalgo, F. J.; Zamora, R. Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: Recent advances and future perspectives. *Trends in Food Science and Technology* **2003**, *14* (12), 499-506.
311. Mannina, L.; Luchinat, C.; Emanuele, M. C.; Segre, A. Acyl positional distribution of glycerol tri-esters in vegetable oils: A ¹³C NMR study. *Chemistry and Physics of Lipids* **1999**, *103* (1-2), 47-55.
312. Sacchi, R.; Addeo, F.; Paolillo, L. ¹H and ¹³C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1997**, *35*, S133-S145.
313. Zamora, R.; Navarro, J. L.; Hidalgo, F. J. Identification and classification of olive oils by high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1994**, *71* (4), 361-364.
314. Mavromoustakos, T.; Zervou, M.; Bonas, G.; Kolocouris, A.; Petrakis, P. Novel analytical method to detect adulteration of virgin olive oil by other oils. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2000**, *77* (4), 405-411.
315. Fauhl, C.; Reniero, F.; Guillou, C. ¹H NMR as a tool for the analysis of mixtures of virgin olive oil with oils of different botanical origin. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2000**, *38* (6), 436-443.
316. Zamora, R.; Alba, V.; Hidalgo, F. J. Use of high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of virgin olive oils. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2001**, *78* (1), 89-94.
317. Guillén, M. D.; Ruiz, A. Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2003**, *105* (11), 688-696.

318. Guillén, M. D.; Ruiz, A. Edible oils: Discrimination by ¹H nuclear magnetic resonance. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2003**, 83 (4), 338-346.
319. García-González, D. L.; Mannina, L.; D'Imperio, M.; Segre, A. L.; Aparicio, R. Using ¹H and ¹³C NMR techniques and artificial neural networks to detect the adulteration of olive oil with hazelnut oil. *European Food Research and Technology* **2004**, 219 (5), 545-548.
320. McKenzie, J. M.; Koch, K. R. Rapid analysis of major components and potential authentication of South African olive oils by quantitative ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *South African Journal of Science* **2004**, 100 (7-8), 349-354.
321. Fragaki, G.; Spyros, A.; Siragakis, G.; Salivaras, E.; Dais, P. Detection of extra virgin olive oil adulteration with lampante olive oil and refined olive oil using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53 (8), 2810-2816.
322. Vigli, G.; Philippidis, A.; Spyros, A.; Dais, P. Classification of edible oils by employing ³¹P and ¹H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51 (19), 5715-5722.
323. Barison, A.; Da Silva, C. W. P.; Campos, F. R.; Simonelli, F.; Lenz, C. A.; Ferreira, A. G. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2010**, 48 (8), 642-650.
324. Dais, P.; Spyros, A. Nuclear Magnetic Resonance. In *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Picó, Y., Eds.; Amsterdam: Elsevier, 2012; pp 91-115.
325. Mannina, L.; Sobolev, A. P. High resolution NMR characterization of olive oils in terms of quality, authenticity and geographical origin. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2011**, 49 (SUPPL. 1), S3-S11.
326. Mavromoustakos, T.; Zervou, M.; Theodoropoulou, E.; Panagiotopoulos, D.; Bonas, G.; Day, M.; Helmis, A. ¹³C NMR analysis of the triacylglycerol composition of Greek virgin olive oils. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1997**, 35, S3-S7.
327. Shaw, A. D.; Di Camillo, A.; Vlahov, G.; Jones, A.; Bianchi, G.; Rowland, J.; Kell, D. B. Discrimination of the variety and region of origin of extra virgin olive oil using ¹³C NMR and multivariate calibration with variable reduction. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 348 (1-3), 357-374.
328. Sacco, A.; Brescia, M. A.; Liuzzi, V.; Reniero, F.; Guillou, C.; Ghelli, S.; Van Der Meer, P. Characterization of Italian olive oils based on analytical and nuclear magnetic resonance determinations. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2000**, 77 (6), 619-625.
329. Mannina, L.; Patumi, M.; Proietti, N.; Bassi, D.; Segre, A. L. Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high-field ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49 (6), 2687-2696.

330. Mannina, L.; Patumi, M.; Proietti, N.; Segre, A. L. P.D.O. (protected designation of origin): Geographical characterization of Tuscan extra virgin olive oils using high-field ¹H NMR spectroscopy. *Italian Journal of Food Science* **2001**, *13* (1), 53-63.
331. Vlahov, G.; Del Re, P.; Simone, N. Determination of geographical origin of olive oils using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. I - Classification of olive oils of the Puglia region with denomination of protected origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (19), 5612-5615.
332. Rezzi, S.; Axelson, D. E.; Héberger, K.; Reniero, F.; Mariani, C.; Guillou, C. Classification of olive oils using high throughput flow ¹H NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *552* (1-2), 13-24.
333. Petrakis, P. V.; Agiomyrgianaki, A.; Christophoridou, S.; Spyros, A.; Dais, P. Geographical characterization of Greek virgin olive oils (cv. Koroneiki) using ¹H and ³¹P NMR fingerprinting with canonical discriminant analysis and classification binary trees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (9), 3200-3207.
334. del Coco, L.; Schena, F. P.; Fanizzi, F. P. ¹H nuclear magnetic resonance study of olive oils commercially available as Italian products in the United States of America. *Nutrients* **2012**, *4* (5), 343-355.
335. Mannina, L.; Segre, A. L. NMR and Olive Oils: A Geographical Characterization. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Preedy, V. R.; Watson, R. R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2010; pp 117-124.
336. Agrimonti, C.; Marmiroli, N. DNA extraction and analysis from feeds and foods: A tool for traceability. In *DNA Binding and DNA Extraction: Methods, Applications and Limitations*, Zhou, C.; Ling, X., Eds.; Nova Science Publishers, Inc: New York, 2012; pp 181-204.
337. Martins-Lopes, P.; Gomes, S.; Pereira, L.; Guedes-Pinto, H. Molecular markers for food traceability. *Food Technology and Biotechnology* **2013**, *51* (2), 198-207.
338. Rasmussen, R. S.; Morrissey, M. T. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2008**, *7* (3), 280-295.
339. Consolandi, C.; Palmieri, L.; Severgnini, M.; Maestri, E.; Marmiroli, N.; Agrimonti, C.; Baldoni, L.; Donini, P.; De Bellis, G.; Castiglioni, B. A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis. *European Food Research and Technology* **2008**, *227* (5), 1429-1438.
340. Martins-Lopes, P.; Gomes, S.; Santos, E.; Guedes-Pinto, H. DNA markers for Portuguese olive oil fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (24), 11786-11791.
341. Pafundo, S.; Gullí, M.; Marmiroli, N. Multiplex real-time PCR using SYBR[®] GreenER[™] for the detection of DNA allergens in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *396* (5), 1831-1839.

342. Pasqualone, A.; Montemurro, C.; Ashtar, S.; Caponio, F.; Ferrara, E.; Saponari, M.; Al Ibrahim, A.; Al Rahman Kalhout, A.; Blanco, A. Set up of a DNA bank of *Olea europaea* L. The objective being cultivar traceability in olive oil. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **2008**, 85 (2), 83-91.
343. Bonizzi, I.; Feligini, M.; Aleandri, R.; Enne, G. Genetic traceability of the geographical origin of typical Italian water buffalo Mozzarella cheese: A preliminary approach. *Journal of Applied Microbiology* **2007**, 102 (3), 667-673.
344. Raspor, P.; Milek, D. M.; Polanc, J.; Smole Možina, S.; Cadež, N. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology* **2006**, 109 (1-2), 97-102.
345. Cresti, M.; Linskens, H. F.; Mulcahy, D. L.; Bush, S.; Di Stilio, V.; Xu, M. Y.; Vignani, R.; Cimato, A. Preliminary communication about the identification of DNA in leaves and in olive oil of *Olea europaea*. *Advances in Horticultural Science* **1996**, (2), 105-107.
346. Montealegre, C.; Alegre, M. L. M.; García-Ruiz, C. Traceability markers to the botanical origin in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58 (1), 28-38.
347. Testolin, R.; Lain, O. DNA extraction from olive oil and PCR amplification of microsatellite markers. *Journal of Food Science* **2005**, 70 (1), C108-C112.
348. Ben-Ayed, R.; Kamoun-Grati, N.; Rebai, A. An overview of the authentication of olive tree and oil. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2013**, 12 (2), 218-227.
349. Breton, C.; Claux, D.; Metton, I.; Skorski, G.; Bervillé, A. Comparative Study of Methods for DNA Preparation from Olive Oil Samples to Identify Cultivar SSR Alleles in Commercial Oil Samples: Possible Forensic Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, 52 (3), 531-537.
350. Ben-Ayed, R.; Grati-Kamoun, N.; Moreau, F.; Rebaï, A. Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars. *European Food Research and Technology* **2009**, 229 (5), 757-762.
351. Muzzalupo, I.; Pellegrino, M.; Perri, E. Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destoned fruits. *European Food Research and Technology* **2007**, 224 (4), 469-475.
352. Costa, J.; Mafra, I.; Oliveira, M. B. P. P. Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. *Trends in Food Science and Technology* **2012**, 26 (1), 43-55.
353. Belaj, A.; Trujillo, I.; De la Rosa, R.; Rallo, L.; Giménez, M. J. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **2001**, 126 (1), 64-71.

354. Khadari, B.; Breton, C.; Moutier, N.; Roger, J. P.; Besnard, G.; Bervillé, A.; Dosba, F. The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theoretical and Applied Genetics* **2003**, *106* (3), 521-529.
355. Pasqualone, A.; Di Rienzo, V.; Nasti, R.; Blanco, A.; Gomes, T.; Montemurro, C. Traceability of Italian Protected Designation of Origin (PDO) table olives by means of microsatellite molecular markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61* (12), 3068-3073.
356. Muzzalupo, I.; Perri, E. Recovery and characterisation of DNA from virgin olive oil. *European Food Research and Technology* **2002**, *214* (6), 528-531.
357. Claros, M. G.; Crespillo, R.; Aguilar, M. L.; Cánovas, F. M. DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europaea* L.). *Euphytica* **2000**, *116* (2), 131-142.
358. Pasqualone, A.; Caponio, F.; Blanco, A. Inter-simple sequence repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. *European Food Research and Technology* **2001**, *213* (3), 240-243.
359. Sanz-Cortés, F.; Badenes, M. L.; Paz, S.; Íñiguez, A.; Llácer, G. Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **2001**, *126* (1), 7-12.
360. Grati-Kamoun, N.; Mahmoud, F. L.; Rebaï, A.; Gargouri, A.; Panaud, O.; Saar, A. Genetic diversity of Tunisian olive tree (*Olea europaea* L.) cultivars assessed by AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **2006**, *53* (2), 265-275.
361. Paran, I.; Michelmore, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* **1993**, *85* (8), 985-993.
362. Busconi, M.; Sebastiani, L.; Fogher, C. Development of SCAR markers for germplasm characterisation in olive tree (*Olea europea* L.). *Molecular Breeding* **2006**, *17* (1), 59-68.
363. Pafundo, S.; Agrimonti, C.; Maestri, E.; Marmioli, N. Applicability of SCAR markers to food genomics: Olive oil traceability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55* (15), 6052-6059.
364. Ben-Ayed, R.; Grati-Kamoun, N.; Sans-Grout, C.; Moreau, F.; Rebai, A. Characterization and authenticity of virgin olive oil (*Olea europaea* L.) cultivars by microsatellite markers. *European Food Research and Technology* **2012**, *234* (2), 263-271.
365. Doveri, S.; O'Sullivan, D. M.; Lee, D. Non-concordance between genetic profiles of olive oil and fruit: A cautionary note to the use of DNA markers for provenance testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (24), 9221-9226.
366. Vietina, M.; Agrimonti, C.; Marmioli, M.; Bonas, U.; Marmioli, N. Applicability of SSR markers to the traceability of monovarietal olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2011**, *91* (8), 1381-1391.

367. Pérez-Jiménez, M.; Besnard, G.; Dorado, G.; Hernandez, P. Varietal Tracing of Virgin Olive Oils Based on Plastid DNA Variation Profiling. *PLoS ONE* **2013**, *8* (8), e70507.
368. Agrimonti, C.; Vietina, M.; Pafundo, S.; Marmioli, N. The use of food genomics to ensure the traceability of olive oil. *Trends in Food Science and Technology* **2011**, *22* (5), 237-244.
369. Dorado, G.; De la Rosa, R.; Dorado, P.; Martín, A. Marcadores Moleculares. In *Varietades de olivo en España*, Ediciones Mundi Prensa ed.; Rallo, L.; Barranco, D.; Caballero, J. M.; Martín, A.; Tous, J.; Trujillo, I., Eds.; Mundi Prensa: Madrid, 2005; pp 421-430.
370. Gardner, J. W.; Bartlett, P. N. A brief history of electronic noses. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1994**, *18*, 210-211.
371. Gutiérrez, J.; Horrillo, M. C. Advances in artificial olfaction: Sensors and applications. *Talanta* **2014**, *124*, 95-105.
372. Mallikarjunan, P. Electronic Nose Applications in the Food Industry. In *Nondestructive Testing of Food Quality*, Irudayaraj, J.; Reh, C., Eds.; Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK, 2008; pp 237-281.
373. López-Feria, S.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Simplifying chromatographic analysis of the volatile fraction of foods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27* (9), 794-803.
374. Gardner, J. W.; Bartlett, P. N. *Electronic Noses: Principles and Applications*; Oxford University Press: New York, 1999.
375. Buratti, S.; Benedetti, S.; Scampicchio, M.; Pangerod, E. C. Characterization and classification of Italian Barbera wines by using an electronic nose and an amperometric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *525* (1), 133-139.
376. Buratti, S.; Ballabio, D.; Benedetti, S.; Cosio, M. S. Prediction of Italian red wine sensorial descriptors from electronic nose, electronic tongue and spectrophotometric measurements by means of Genetic Algorithm regression models. *Food Chemistry* **2007**, *100* (1), 211-218.
377. Di Natale, C.; Paollesse, R.; Macagnano, A.; Mantini, A.; D'Amico, A.; Ubigli, M.; Legin, A.; Lvova, L.; Rudnitskaya, A.; Vlasov, Y. Application of a combined artificial olfaction and taste system to the quantification of relevant compounds in red wine. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2000**, *69* (3), 342-347.
378. Vernat-Rossi, V.; Garcia, C.; Talon, R.; Denoyer, C.; Berdagué, J. L. Rapid discrimination of meat products and bacterial strains using semiconductor gas sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1996**, *37* (1-2), 43-48.
379. Capone, S.; Epifani, M.; Quaranta, F.; Siciliano, P.; Taurino, A.; Vasanelli, L. Monitoring of rancidity of milk by means of an electronic nose and a dynamic PCA analysis. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2001**, *78* (1-3), 174-179.

380. Gan, H. L.; Man, Y. B. C.; Tan, C. P.; NorAini, I.; Nazimah, S. A. H. Characterisation of vegetable oils by surface acoustic wave sensing electronic nose. *Food Chemistry* **2005**, *89* (4), 507-518.
381. Cosio, M. S.; Ballabio, D.; Benedetti, S.; Gigliotti, C. Evaluation of different storage conditions of extra virgin olive oils with an innovative recognition tool built by means of electronic nose and electronic tongue. *Food Chemistry* **2007**, *101* (2), 485-491.
382. González Martín, Y.; Cerrato Oliveros, M. C.; Pérez Pavón, J. L.; García Pinto, C.; Moreno Cordero, B. Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors and pattern recognition techniques: Characterisation of vegetable oils. *Analytica Chimica Acta* **2001**, *449* (1-2), 69-80.
383. García-González, D. L.; Aparicio, R. Virgin olive oil quality classification combining neural network and MOS sensors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (12), 3515-3519.
384. González Martín, Y.; Luis Pérez Pavón, J.; Moreno Cordero, B.; García Pinto, C. Classification of vegetable oils by linear discriminant analysis of Electronic Nose data. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *384* (1), 83-94.
385. Cosio, M. S.; Benedetti, S.; Buratti, S.; Scampicchio, M.; Mannino, S. Application of the Electronic Nose in Olive Oil Analyses. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Preedy, V. R.; Watson, R. R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2010; pp 553-559.
386. Ballabio, D.; Cosio, M. S.; Mannino, S.; Todeschini, R. A chemometric approach based on a novel similarity/diversity measure for the characterisation and selection of electronic nose sensors. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *578* (2), 170-177.
387. Taurino, A.; Capone, S.; Distante, C.; Epifani, M.; Rella, R.; Siciliano, P. Recognition of olive oils by means of an integrated sol-gel SnO₂ Electronic Nose. *Thin Solid Films* **2002**, *418* (1), 59-65.
388. López-Feria, S.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Sensory quality characterization of virgin olive oil samples by direct analysis of the volatile fraction. In *Olive Oil and Health*, Quiles, J. L.; Ramírez-Tortosa, M. C.; Yaqoob, P., Eds.; CABI: Cambridge, USA, 2010; pp 509-524.
389. Cerrato Oliveros, M. C.; Pérez Pavón, J. L.; García Pinto, C.; Fernández Laespada, M. E.; Moreno Cordero, B.; Forina, M. Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as a fast alternative for the detection of adulteration of virgin olive oils. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *459* (2), 219-228.
390. Cimato, A.; Dello Monaco, D.; Distante, C.; Epifani, M.; Siciliano, P.; Taurino, A. M.; Zuppa, M.; Sani, G. Analysis of single-cultivar extra virgin olive oils by means of an Electronic Nose and HS-SPME/GC/MS methods. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2006**, *114* (2), 674-680.
391. Haddi, Z.; Amari, A.; Ould Ali, A.; El Bari, N.; Barhoumi, H.; Maaref, A.; Jaffrezic-Renault, N.; Bouchikhi, B. Discrimination and identification of geographical origin virgin olive oil by an e-nose based on MOS sensors and pattern recognition techniques. *Procedia Engineering*, 2011; pp 1137-1140.

392. Escuder-Gilabert, L.; Peris, M. Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *665* (1), 15-25.
393. Baldwin, E. A.; Bai, J.; Plotto, A.; Dea, S. Electronic noses and tongues: Applications for the food and pharmaceutical industries. *Sensors* **2011**, *11* (5), 4744-4766.
394. Zakaria, A.; Shakaff, A. Y. M.; Masnan, M. J.; Ahmad, M. N.; Adom, A. H.; Jaafar, M. N.; Ghani, S. A.; Abdullah, A. H.; Aziz, A. H. A.; Kamarudin, L. M.; Subari, N.; Fikri, N. A. A biomimetic sensor for the classification of honeys of different floral origin and the detection of adulteration. *Sensors* **2011**, *11* (8), 7799-7822.
395. Hong, X.; Wang, J. Detection of adulteration in cherry tomato juices based on electronic nose and tongue: Comparison of different data fusion approaches. *Journal of Food Engineering* **2014**, *126*, 89-97.
396. Hong, X.; Wang, J.; Qiu, S. Authenticating cherry tomato juices-Discussion of different data standardization and fusion approaches based on electronic nose and tongue. *Food Research International* **2014**, *60*, 173-179.
397. Rodríguez-Méndez, M. L.; Apetrei, C.; De Saja, J. A. Electronic Tongues Purposely Designed for the Organoleptic Characterization of Olive Oils. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Preedy, V. R.; Watson, R. R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2010; pp 525-532.
398. Cosio, M. S.; Ballabio, D.; Benedetti, S.; Gigliotti, C. Geographical origin and authentication of extra virgin olive oils by an electronic nose in combination with artificial neural networks. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *567* (2), 202-210.
399. Haddi, Z.; Boughrini, M.; Ihlou, S.; Amari, A.; Mabrouk, S.; Barhoumi, H.; Maaref, A.; Bari, N. E.; Llobet, E.; Jaffrezic-Renault, N.; Bouchikhi, B. Geographical classification of Virgin Olive Oils by combining the electronic nose and tongue. *Proceedings of IEEE Sensors, 11th IEEE Sensors Conference.2012*.
400. Haddi, Z.; Alami, H.; El Bari, N.; Tounsi, M.; Barhoumi, H.; Maaref, A.; Jaffrezic-Renault, N.; Bouchikhi, B. Electronic nose and tongue combination for improved classification of Moroccan virgin olive oil profiles. *Food Research International* **2013**, *54* (2), 1488-1498.
401. Alam, T. M.; Alam, M. K. Chemometric Analysis of NMR Spectroscopy Data: A Review. *Annual Reports on NMR Spectroscopy* **2004**, *54*, 41-80.
402. Berrueta, L. A.; Alonso-Salces, R. M.; Héberger, K. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1158* (1-2), 196-214.
403. Jain, A. K.; Duin, R. P. W.; Mao, J. Statistical pattern recognition: A review. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **2000**, *22* (1), 4-37.
404. Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *44* (3 SPEC. ISS.), 683-700.

405. Oliveri, P.; Casale, M.; Casolino, M. C.; Baldo, M. A.; Nizzi Grifi, F.; Forina, M. Comparison between classical and innovative class-modelling techniques for the characterisation of a PDO olive oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 399 (6), 2105-2113.
406. Sato, T. Application of principal-component analysis on near-infrared spectroscopic data of vegetable oils for their classification. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1994**, 71 (3), 293-298.
407. Wesley, I. J.; Barnes, R. J.; McGill, A. E. J. Measurement of adulteration of olive oils by near-infrared spectroscopy. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **1995**, 72 (3), 289-292.
408. Fang, G.; Goh, J. Y.; Tay, M.; Lau, H. F.; Li, S. F. Y. Characterization of oils and fats by ¹H NMR and GC/MS fingerprinting: Classification, prediction and detection of adulteration. *Food Chemistry* **2013**, 138 (2-3), 1461-1469.
409. Mildner-Szkudlarz, S.; Jelen, H. H. The potential of different techniques for volatile compounds analysis coupled with PCA for the detection of the adulteration of olive oil with hazelnut oil. *Food Chemistry* **2008**, 110 (3), 751-761.
410. Longobardi, F.; Ventrella, A.; Napoli, C.; Humpfer, E.; Schütz, B.; Schäfer, H.; Kontominas, M. G.; Sacco, A. Classification of olive oils according to geographical origin by using ¹H NMR fingerprinting combined with multivariate analysis. *Food Chemistry* **2012**, 130 (1), 177-183.
411. Schulz, H.; Özkan, G.; Baranska, M.; Krüger, H.; Özcan, M. Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **2005**, 39 (2), 249-256.
412. Ranalli, A.; De Mattia, G.; Patumi, M.; Proietti, P. Quality of virgin olive oil as influenced by origin area. *Grasas y Aceites* **1999**, 50 (4), 249-259.
413. Casale, M.; Armanino, C.; Casolino, C.; Forina, M. Combining information from headspace mass spectrometry and visible spectroscopy in the classification of the Ligurian olive oils. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 589 (1), 89-95.
414. Sinelli, N.; Casiraghi, E.; Tura, D.; Downey, G. Characterisation and classification of Italian virgin olive oils by near- and mid-infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **2008**, 16 (3), 335-342.
415. Sinelli, N.; Cerretani, L.; Egidio, V. D.; Bendini, A.; Casiraghi, E. Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity. *Food Research International* **2010**, 43 (1), 369-375.
416. Sinelli, N.; Casale, M.; Di Egidio, V.; Oliveri, P.; Bassi, D.; Tura, D.; Casiraghi, E. Varietal discrimination of extra virgin olive oils by near and mid infrared spectroscopy. *Food Research International* **2010**, 43 (8), 2126-2131.
417. Yang, H.; Irudayaraj, J.; Paradkar, M. M. Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry* **2005**, 93 (1), 25-32.

418. Vlahov, G. ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy to determine olive oil grades. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 577 (2), 281-287.
419. Alonso-Salces, M.; Héberger, A.; Holland, M. V.; Moreno-Rojas, J. M.; Mariani, C.; Bellan, G.; Reniero, F.; Guillou, C. Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry* **2010**, 118 (4), 956-965.
420. Marigheto, N. A.; Kemsley, E. K.; Defernez, M.; Wilson, R. H. A comparison of mid-infrared and raman spectroscopies for the authentication of edible oils. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **1998**, 75 (8), 987-992.
421. Baeten, V.; Pierna, J. A. F.; Dardenne, P.; Meurens, M.; García-González, D. L.; Paricio-Ruiz, R. Detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by FT-Raman and FT-MIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53 (16), 6201-6206.
422. Casale, M.; Oliveri, P.; Casolino, C.; Sinelli, N.; Zunin, P.; Armanino, C.; Forina, M.; Lanteri, S. Characterisation of PDO olive oil Chianti Classico by non-selective (UV-visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical techniques. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 712, 56-63.
423. Galtier, O.; Abbas, O.; Le Dréau, Y.; Rebufa, C.; Kister, J.; Artaud, J.; Dupuy, N. Comparison of PLS1-DA, PLS2-DA and SIMCA for classification by origin of crude petroleum oils by MIR and virgin olive oils by NIR for different spectral regions. *Vibrational Spectroscopy* **2011**, 55 (1), 132-140.
424. Dellaa, Y.; Korifi, R.; Le Dréau, Y.; Artaud, J.; Dupuy, N. Prediction of geographical origin of virgin olive oil RDOs by chemometric treatment of Raman spectra. AIP Conference Proceedings. *22nd International Conference on Raman Spectroscopy*. 2010; pp 562-563.
425. Alonso-Salces, M. R.; Moreno-Rojas, J. M.; Holland, M. V.; Guillou, C. *Authentication of virgin olive oil using NMR and isotopic fingerprinting*; Nova Science Publishers: New York, 2011.
426. Alonso-Salces, M. R.; Moreno-Rojas, J. M.; Holland, M. V.; Guillou, C. Authentication of virgin olive oil by ^1H -NMR and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{2}\text{H}$ -IRMS. In *Olive Oil and Health*, Quiles, J. L.; Ramírez-Tortosa, M. C.; Yaqoob, P., Eds.; CABI: Cambridge, USA, 2010; pp 73-110.
427. Dupuy, N.; Galtier, O.; Le Dréau, Y.; Pinatel, C.; Kister, J.; Artaud, J. Chemometric analysis of combined NIR and MIR spectra to characterize French olives. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2010**, 112 (4), 463-475.
428. Dupuy, N.; Galtier, O.; Ollivier, D.; Vanloot, P.; Artaud, J. Comparison between NIR, MIR, concatenated NIR and MIR analysis and hierarchical PLS model. Application to virgin olive oil analysis. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 666 (1-2), 23-31.
429. Haddi, Z.; Boughrini, M.; Ihlou, S.; Amari, A.; Mabrouk, S.; Barhoumi, H.; Maaref, A.; Bari, N. E.; Llobet, E.; Jaffrezic-Renault, N.; Bouchikhi, B. Geographical classification of Virgin Olive Oils by combining the electronic nose and tongue. *Proceedings of IEEE Sensors*. 2012.

430. Spangenberg, J. E.; Macko, S. A.; Hunziker, J. Characterization of Olive Oil by Carbon Isotope Analysis of Individual Fatty Acids: Implications for Authentication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (10), 4179-4184.
431. Yang, H.; Irudayaraj, J. Comparison of near-infrared, Fourier transform-infrared, and Fourier transform-Raman methods for determining olive pomace oil adulteration in extra virgin olive oil. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2001**, *78* (9), 889-895.
432. Che Man, Y. B.; Rohman, A. Detection of lard in vegetable oils. *Lipid Technology* **2011**, *23* (8), 180-182.
433. Alonso-Salces, R. M.; Moreno-Rojas, J. M.; Holland, M. V.; Reniero, F.; Guillou, C.; Serra, F.; Segebarth, N. NMR and isotopic fingerprinting for food characterization. *European Commission EUR 22724EN*. **2007**.
434. García-González, D. L.; Aparicio, R. Research in olive oil: Challenges for the near future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (24), 12569-12577.

**CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE LAS
MUESTRAS Y RESULTADOS
OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE
GASES COMO TÉCNICA DE
REFERENCIA**

ÍNDICE

1.	CLASIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS.....	135
1.1	NOMENCLATURA	136
1.2	OBTENCIÓN DEL ACEITE	152
2.	CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	153
2.1.	MATERIALES Y MÉTODOS	153
2.2.	RESULTADOS DE ÁCIDOS GRASOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC).....	155
3.	BIBLIOGRAFÍA	170

CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS Y RESULTADOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES COMO TÉCNICA DE REFERENCIA

1. CLASIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS

Las muestras utilizadas en nuestro estudio pertenecen a siete campañas consecutivas (desde la campaña 2004-2005 hasta la 2010-2011) y a distintas variedades de aceitunas (Sorani, Zaity, Gordal, Frantoio, Picual, Hojiblanca, Arbequina...). En cuanto a la procedencia, contamos con: muestras que se encuentran en el mismo entorno climático y presentan trazabilidad y pureza varietal garantizada, procedentes del banco de Germoplasma de Córdoba; muestras multivarietales con una variedad predominante (Hojiblanca o Picual), procedentes de la Cooperativa Hojiblanca (aceites obtenidos en almazaras distribuidas en las provincias de Córdoba y Málaga) y de distintas DOP andaluzas; muestras de variedad Picual cultivadas a distintas altitudes en distintos puntos de la geografía andaluza y muestras procedentes del banco de Germoplasma de Tarragona (para realizar estudios comparativos). Además, en la Campaña 1 (2004-2005) se estudiaron variedades procedentes de Siria y de Estepa (Sevilla) así como algunos aceites vegetales y en la Campaña 2 (2005-2006) se seleccionaron aceites comerciales ecológicos y no ecológicos. Los datos de las campañas 1 y 2 fueron descritos en la Tesis Doctoral del Dr. Mustafa Moalem [1], siendo incorporados a este estudio con el fin de abarcar un período de tiempo mayor contribuyendo, de este modo, a la robustez de la base de datos.

1.1 NOMENCLATURA

Para designar las series que componen nuestro conjunto muestral, a cada grupo se le asigna un prefijo alfanumérico, según su procedencia y a cada campaña se le ha asignado un número (del 1 al 7), tal y como se muestra a continuación:

Tabla 2.1. Nomenclatura de las muestras.

Campanña	Numeración	Procedencia	Designación
2004-2005	1	Banco Germoplasma Córdoba	G
2005-2006	2	Cooperativa Hojiblanca	H
2006-2007	3	Denominaciones Origen	DO
2007-2008	4	Distintas altitudes	A
2008-2009	5	Banco Germoplasma Tarragona	GT
2009-2010	6	Siria	S
2010-2011	7	Estepa	E
		Aceites vegetales	V
		Aceites comerciales ecológicos	B
		Aceites comerciales no ecológicos	C
		Aceite de Estepa adulterado con distintos aceites vegetales (G:girasol, A: avellana, L:lino y M: maíz)	EG, EA, EL, EM

Así, cada serie vendrá determinada por la designación y la numeración correspondiente. Por ejemplo, la Serie H2, corresponde a muestras del grupo Hojiblanca de la campaña 2005-2006. Asimismo, cada muestra dentro de su serie, tendrá un número que corresponde a su referencia interna (RI). Siguiendo con el mismo ejemplo, 5H2, se refiere a la muestra 5 de la serie H2.

En las *Tablas 2.2. a 2.21.* se resumen los datos sobre identificación de las muestras, aportándose además información complementaria sobre las mismas.

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

Tabla 2.2. Muestras del Banco de Germoplasma del IFAPA en Córdoba correspondientes a la campaña 2004-2005. Se incluyen algunas de Siria (S) y de Estepa (Sevilla) (E) de la misma campaña.

Serie	RI	Variedad	Observaciones			
			Índice madurez	Fila	Árbol	Fecha de recogida
G1	1	Zaity	1	26	22	21/ 12/2004
G1	2	Zaity	2	26	22	21/ 12/2004
G1	3	Zaity	3	26	22	21/ 12/2004
G1	4	Arbequina	1	2	5	21/ 12/2004
G1	5	Arbequina	2	2	5	21/ 12/2004
G1	6	Arbequina	3	2	5	21/ 12/2004
G1	9	Arbequina	3	6	9	21/ 12/2004
G1	10	Frantoio	1	12	3	21/ 12/2004
G1	11	Frantoio	2	12	3	21/ 12/2004
G1	12	Frantoio	3	12	3	21/ 12/2004
G1	13	Frantoio	2	8	3	21/ 12/2004
G1	14	Frantoio	3	8	3	21/ 12/2004
G1	15	Frantoio	4	8	3	21/ 12/2004
G1	16	Gordal Vélez Rubio	1	10	18	21/ 12/2004
G1	17	Gordal Vélez Rubio	2	10	18	21/ 12/2004
G1	18	Gordal Vélez Rubio	3	10	18	21/ 12/2004
G1	19	Gordal Vélez Rubio	1	14	17	21/ 12/2004
G1	20	Gordal Vélez Rubio	2	14	17	21/ 12/2004
G1	21	Gordal Vélez Rubio	3	14	17	21/ 12/2004
G1	22	Zaity	2	26	22	11/1/2005
G1	23	Zaity	3	26	22	11/1/2005
G1	24	Zaity	4	26	22	11/1/2005
G1	25	Arbequina	2	2	5	11/1/2005
G1	26	Arbequina	3	2	5	11/1/2005
G1	27	Arbequina	4	2	5	11/1/2005
G1	28	Arbequina	2	42	18	11/1/2005
G1	29	Arbequina	3	42	18	11/1/2005
G1	30	Arbequina	4	42	18	11/1/2005
G1	31	Frantoio	2	12	3	11/1/2005
G1	32	Frantoio	3	12	3	11/1/2005
G1	33	Frantoio	4	12	3	11/1/2005
G1	34	Frantoio	2	8	3	11/1/2005
G1	35	Frantoio	3	8	3	11/1/2005
G1	36	Frantoio	4	8	3	11/1/2005
G1	37	Gordal Vélez Rubio	2	10	18	11/1/2005
G1	38	Gordal Vélez Rubio	3	10	18	11/1/2005
G1	39	Gordal Vélez Rubio	4	10	18	11/1/2005

G1	40	Gordal Vélez Rubio	2	14	17	11/1/2005
G1	41	Gordal Vélez Rubio	3	14	17	11/1/2005
G1	42	Gordal Vélez Rubio	4	14	17	11/1/2005
G1	43	Zaity	3	26	22	31/ 01/2005
G1	44	Zaity	4	26	22	31/ 01/2005
G1	45	Zaity	5	26	22	31/ 01/2005
G1	46	Arbequina	3	2	5	31/ 01/2005
G1	47	Arbequina	5	2	5	31/ 01/2005
G1	48	Arbequina	3	42	18	31/ 01/2005
G1	49	Arbequina	5	42	18	31/ 01/2005
G1	50	Frantoio	2	12	3	31/ 01/2005
G1	51	Frantoio	3	12	3	31/ 01/2005
G1	52	Frantoio	4	12	3	31/ 01/2005
G1	53	Frantoio	2	8	3	31/ 01/2005
G1	54	Frantoio	3	8	3	31/ 01/2005
G1	55	Frantoio	4	8	3	31/ 01/2005
G1	56	Gordal Vélez Rubio	2	10	18	31/ 01/2005
G1	57	Gordal Vélez Rubio	3	10	18	31/ 01/2005
G1	58	Gordal Vélez Rubio	5	10	18	31/ 01/2005
G1	59	Gordal Vélez Rubio	2	14	17	31/ 01/2005
G1	60	Gordal Vélez Rubio	3	14	17	31/ 01/2005
G1	61	Gordal Vélez Rubio	5	14	17	31/ 01/2005
G1	62	Picual	4	-	-	31/ 01/2005
E1	63	Hojiblanca	3,7	-	-	20/ 01/2005
E1	64	Manzanilla	3,7	-	-	17/ 12/2004
E1	65	Arbequina	1,8	-	-	26/ 11/2004
S1	66	Sorani antes de la lluvia	1	-	-	2003
S1	67	Sorani antes de la lluvia	2	-	-	2003
S1	68	Sorani antes de la lluvia	3	-	-	2003
S1	69	Sorani antes de la lluvia	4	-	-	2003
S1	70	Sorani después de la lluvia	5	-	-	2003
S1	71	Sorani después de la lluvia	2	-	-	2003
G1*	72	Sorani	3.3	-	-	2003
G1	73	Zaity	3	-	-	2003
G1	74	Kaesi	3	-	-	2003
G1	75	Kelb et Ter	3	-	-	2003
G1	80	Arbequina	3	-	-	31/ 01/2005

* Del banco de germoplasma de Cabra (Córdoba).

Tabla 2.3. Muestras de aceites vegetales comerciales de la campaña 2004-2005.

Serie	RI	Variedad
V1	76	Aceite de soja y girasol alto Oleico (Soy Plus-La Española)
V1	77	Aceite de Maíz (Asuna-Koipe)
V1	78	Aceite de Girasol y soja (Sojasol-Koipesol-Koipe)
V1	79	Aceite refinado de Girasol (Fuensol- Mueloliva)

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

Tabla 2.4. Muestras del Grupo Hojiblanca, de la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	Procedencia	Zona
H2	1*	Picual	Coop.Oliv.Ntra.Sra.Villaviciosa	Villaviciosa de Córdoba (Córdoba)
H2	2	Picual	SCA. Ntro. Padre Jesús	La Rambla (Córdoba)
H2	3*	Picual	Coop. Del Campo. San Antonio Abad	Obejo (Córdoba)
H2	4	Picual	SCA Ntra. Sra Rosario	Teba (Málaga)
H2	5*	Picual	SCA Ntra. Sra Del Carmen	Hinojosa del Duque (Córdoba)
H2	6	Picual	Las Cinco Villas SCA	Los Blázquez (Córdoba)
H2	7	Picual	Agr. Oliv. Virgen del Campo. SCA	Cañete de Las Torres (Córdoba)
H2	8	Picual	SCA Del Campo Ntra. Sra Del Valle	Morente (Córdoba)
H2	9	Picual	SCA Del Campo Ntra. Sra Del Valle	Santaella (Córdoba)
H2	10*	Picual	Coop. Oliv. Ntra. Sra. Merced. SCA	Montoro (Córdoba)
H2	11	Picual	Olivarera San Isidro, SCA	Espejo (Córdoba)
H2	12***	Picual	SCA Ntra. Sra. de Piedad	Iznájar (Córdoba)
H2	13*	Picual	Coop.Oliv.San Rafael, SCA	Villaharta (Córdoba)
H2	14*	Picual	Olivarera De Montoro, SCA	Montoro (Córdoba)
H2	15*	Picual	Oliv. Santiago Apóstol. SCA	Villanueva del Rey (Córdoba)
H2	16	Picual	Coop.Oliv. San José	Valenzuela (Córdoba)
H2	17	Picual	Coop.Oliv.Virgen Estrella, SCA	Villa del Río (Córdoba)
H2	18	Hojiblanca	SCA Purísima Santiago COPUSAN	Alozaina (Málaga)
H2	19**	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Remedios	Antequera (Málaga)
H2	20	Hojiblanca	SCA. Virgen De Las Virtudes	Fuente de Piedra (Málaga)
H2	21*	Picual	Coop.Agr. Ntra Madre Del Sol, SCA	Adamuz (Córdoba)
H2	22**	Hojiblanca	SCA. La Purísima	Archidona (Málaga)
H2	23**	Hojiblanca	SCA. Purísima Concepción	Alameda (Málaga)
H2	24**	Hojiblanca	Oleoalgaidas. SCA	Villanueva de Algaidas (Málaga)
H2	25**	Hojiblanca	SCA San Benito	Campillos (Málaga)
H2	26**	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra Rosario	Humilladero (Málaga)
H2	27	Hojiblanca	SCA San Isidro Labrador	Palenciana (Córdoba)
H2	28	Hojiblanca	SCA Virgen De La Oliva	Mollina (Málaga)
H2	29	Hojiblanca	SCA San Cosme y San Damián	Almargen (Málaga)
H2	30**	Hojiblanca	SCA San Juan	Villanueva del Rosario (Málaga)
H2	31***	Hojiblanca	SCA Olivarera De Lucena	Lucena (Córdoba)
H2	32**	Hojiblanca	Olivarera Del Trabuco	Villanueva del Trabuco (Málaga)
H2	33	Hojiblanca	SCA Aruega	Archidona (Málaga)
H2	34	Hojiblanca	SCA Oliv. Santa Rita	Villanueva de Tapia (Málaga)
H2	35	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra .Candelaria	Colmenar (Málaga)

Capítulo 2

H2	36***	Hojiblanca	SCA Oliv. Nra.Sra.Araceli	Lucena (Córdoba)
H2	37	Hojiblanca	SCA San Juan Bautista	Cuevas Bajas (Málaga)
H2	38	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra .Gracia	Villanueva de Algaidas (Málaga)
H2	39	Hojiblanca	SCA San Justo y Ntra. Sra Carmen	Villanueva de Algaidas (Málaga)
H2	40	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra Carmen	Cuevas San Marcos (Málaga)
H2	41	Hojiblanca	SCA Oliv. San José	Llanos de Don Juan (Córdoba)
H2	42	Picual	Coop.Oliv. San Isidro Espejo	Espejo (Córdoba)

* Pertencientes a la DOP Montoro-Adamuz

**Pertencientes a la DOP Antequera

***Pertencientes a la DOP Lucena

Tabla 2.5. Muestras de aceite de la variedad Picual procedentes de distintas altitudes, de la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	Localización	Latitud	Longitud	Altitud (m)
A2	47	Picual	Iznalloz (Granada)	37°43 N	3°58 O	935
A2	44	Picual	Alcaudete (Jaén)	37°56 N	4°30 O	645
A2	45	Picual	Martos (Jaén)	37°37 N	4°19 O	550
A2	46	Picual	Mancha Real (Jaén)	37°47 N	3°36 O	436
A2	43	Picual	Baena (Córdoba)	37°52 N	4°46 O	334
A2	48	Picual	El Carpio (Córdoba)	37°35 N	4°06 O	165

Tabla 2.6. Muestras del Banco de Germoplasma de Córdoba correspondientes a la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	Observaciones		
			Índice Madurez	Fila	Árbol
G2	49	Picual	--	--	--
G2	50	Zaity	1	13	14
G2	51	Zaity	3	13	14
G2	52	Arbequina	1	2	5
G2	53	Arbequina	3	2	5
G2	54	Frantoio	3	8	3
G2	55	Picual de Estepa	3	7	3
G2	56	Hojiblanca	3	50	8
G2	57	Koroneiki	1	8	13
G2	58	Empeltre	3	4	4
G2	59	Trylia	3	14	12
G2*	60	Sorani	3	1	9
G2**	63	Hojiblanca	--	--	--

*Banco de germoplasma de Cabra

** De Menjibar (Jaén)

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

Tabla 2.7. Algunos aceites comerciales de la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Observaciones
B2	61	Variedad Nevadillo Negro , aceite ecológico (Pozoblanco) secano
C2	62	Variedad Arbequina. .M. Hacendado
C2	63	Variedad Hojiblanca. M. Hacendado
B2	64	Marca Olivalle: Cultivo Ecológico. Pozoblanco
C2	65	Variedad Picual M. Hacendado
C2	66	Marca 1881 Osuna Sevilla. Mezcla de variedades

Tabla 2.8. Muestras del Grupo Hojiblanca, de la campaña 2006-2007.

Serie	RI	Variedad	Procedencia	Zona	Fecha	Kg
H3	1*	Picual	Coop.Oliv.Ntra.Sra.Villaviciosa	Villaviciosa (Córdoba)	03/07/07	44000
H3	2	Picual	SCA Ntro.Padre Jesús	La Rambla (Córdoba)	03/07/07	45000
H3	3*	Picual	Coop. Del Campo San Antonio Abad	Obejo (Córdoba)	03/07/07	18500
H3	4	Picual	SCA Ntra.Sra Rosario	Teba (Málaga)	--	31000
H3	5*	Picual	SCA Ntra.Sra. del Carmen	Hinojosa del Duque (Córdoba)	03/07/07	50000
H3	6	Picual	Las Cinco Villas SCA	Los Blázquez (Córdoba)	02/07/07	26500
H3	7	Picual	Agr. Oliv. Virgen del Campo SCA	Cañete de las Torres (Córdoba)	02/07/07	67000
H3	8	Picual	SCA del CampoNtra.Sra Del Valle	Morente (Córdoba)	03/07/07	29000
H3	9	Picual	SCA del CampoNtra.Sra Del Valle	Santaella (Córdoba)	03/07/07	50000
H3	10*	Picual	Coop.Oliv.Ntra.Sra.Merced SCA	Montoro (Córdoba)	03/07/07	60000
H3	11	Picual	Olivarera San Isidro, SCA	Espejo (Córdoba)	02/07/07	305000
H3	12***	Picual	SCA.Ntra.Sra. de Piedad	Iznájar (Córdoba)	03/07/07	40000
H3	13*	Picual	Coop.Oliv.San Rafael,SCA	Villaharta (Córdoba)	03/07/07	20000
H3	14*	Picual	Olivarera de Montoro SCA	Montoro (Córdoba)	03/07/07	37000
H3	15*	Picual	Oliv.Santiago Apóstol, SCA	Villanueva del Rey (Córdoba)	03/07/07	50000
H3	16	Picual	Coop.Oliv. San José	Valenzuela (Córdoba)	03/07/07	190000
H3	17	Picual	Coop.Oliv.Virgen Estrella. SCA	Villa del Río (Córdoba)	03/07/07	97000
H3	18	Hojiblanca	SCA Purísima Santiago COPUSAN	Alozaina (Málaga)	02/07/07	20500
H3	19**	Hojiblanca	SCA Ntra.Sra Remedios	Antequera (Málaga)	02/07/07	50000
H3	20	Hojiblanca	SCA Virgen de las Virtudes	Fuente de Piedra	03/07/07	23500

Capítulo 2

				(Málaga)		
H3	21*	Picual	Coop.Agr. Ntra Madre del Sol, SCA	Adamuz (Córdoba)	02/07/07	43000
H3	22**	Hojiblanca	SCA olivarera La Purísima	Archidona (Málaga)	02/07/07	445500
H3	23**	Hojiblanca	SCA Purísima Concepción	Alameda (Málaga)	02/07/07	47000
H3	24**	Hojiblanca	Olealgaidas. SCA	Villanueva de Algaidas (Málaga)	03/07/07	101000
H3	25**	Hojiblanca	SCA San Benito	Campillos (Málaga)	02/07/07	50000
H3	26**	Hojiblanca	SCA Ntra Sra Rosario	Humilladero (Málaga)	03/07/07	50000
H3	27	Hojiblanca	SCA San Isidro Labrador	Palenciana (Córdoba)	03/07/07	236000
H3	28	Hojiblanca	SCA Virgen de la Oliva	Mollina (Málaga)	03/07/07	34000
H3	29	Hojiblanca	SCA San Cosme Y San Damián	Almargen (Málaga)	02/07/07	50000
H3	30**	Hojiblanca	SCA San Juan	Villanueva del Rosario (Málaga)	03/07/07	19000
H3	31***	Hojiblanca	SCA Olivarera de Lucena	Lucena (Córdoba)	03/07/07	49000
H3	32**	Hojiblanca	Olivarera del Trabuco	Villanueva del Trabuco (Málaga)	03/07/07	101500
H3	33	Hojiblanca	SCA Aruega	Archidona (Málaga)	02/07/07	24000
H3	34	Hojiblanca	SCA Oliv. Santa Rita	Villanueva de Tapia (Málaga)	03/07/07	85000
H3	35	Hojiblanca	SCA Ntra.Sra. Candelaria	Colmenar (Málaga)	02/07/07	20000
H3	36***	Hojiblanca	SCA Oliv.Ntra.Sra. Araceli	Lucena (Córdoba)	03/07/07	52000
H3	37	Hojiblanca	SCA San Juan Bautista	Cuevas Bajas (Málaga)	02/07/07	150000
H3	38	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Gracia	Villanueva de Algaidas (Málaga)	03/07/07	89000
H3	39	Hojiblanca	SCA San Justo y Ntra. Sra. Carmen	Villanueva de Algaidas (Málaga)	03/07/07	17000
H3	40	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Carmen	Cuevas de San Marco (Málaga)	02/07/07	245000
H3	41	Hojiblanca	SCA. Oliv. San José	Llanos de Don Juan (Córdoba)	03/07/07	370000
H3	42***	Picual	--	Aguilar de la Frontera (Córdoba)	03/07/07	50000
H3	43	Hojiblanca	--	Los Corrales (Sevilla)	02/07/07	40000
H3	44***	Hojiblanca	--	Benamejé	02/07/07	48700

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

				(Córdoba)		
H3	45	Hojiblanca	--	El Saucejo (Sevilla)	03/07/07	50000
H3	46	Hojiblanca	--	Marchena (Sevilla)	03/07/07	34000

* Pertencientes a DOP Montoro-Adamuz

** Pertencientes a DOP Antequera

***Pertencientes a DOP Lucena

Tabla 2.9. Muestras de aceite de la variedad Picual de distinta altitud, de la campaña 2006-2007.

Serie	RI	Variedad	Localización	Latitud	Longitud	Altitud
A3	47	Picual	Iznalloz (Granada)	37° 43N	3° 58 O	935
A3	53	Picual	Alcaudete (Jaén)	37° 56N	4° 30 O	645
A3	52	Picual	Martos (Jaén)	37° 37N	9° 19 O	550
A3	51	Picual	Mancha Real (Jaén)	37° 47N	3° 36 O	436
A3	50	Picual	Baena (Córdoba)	37° 52N	4° 46 O	334
A3	48	Picual	El Carpio (Córdoba)	37° 35N	4° 06 O	165

Tabla 2.10. Muestras procedentes de los bancos de germoplasma (Tarragona, Córdoba y Jaén), campaña 2006-2007.

Serie	RI	Variedad	Localización
GT3	56	Arbequina	Mora Ebro (Tarragona)
GT3-S	57	Hojiblanca	Mora Ebro (Tarragona)
GT3-R	58	Hojiblanca	Mora Ebro (Tarragona)
GT3-S	59	Picual	Mora Ebro (Tarragona)
GT3-R	60	Picual	Mora Ebro (Tarragona)
G3	61	Arbequina	Villa Llano- Menjibar (Jaén)
G3	62	Picual	Villa Llano Menjibar (Jaén)

S= Secano; R= Regadío

Tabla 2.11. Muestras de aceite ecológico, campaña 2006-2007.

Serie	RI	Variedad	Localización
B3 (secano)	54	Nevadillo Negro	Pozoblanco ("Finca particular")
B3 (regadío)	55	Hojiblanca	Pozoblanco ("Finca particular")

Tabla 2.12. Muestras del Grupo Hojiblanca, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Variedad	Procedencia	Zona	Fecha	Kg
H4	1*	Picual	Coop.Oliv.Ntra.Sra.Villaviciosa	Villaviciosa (Córdoba)	25/04/08	49000
H4	2	Picual	SCA Ntro.Padre Jesús	La Rambla (Córdoba)	25/04/08	45000
H4	3*	Picual	Coop. del Campo San Antonio Abad	Obejo (Córdoba)	25/04/08	21300
H4	4	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Rosario	Teba (Málaga)	25/04/08	49000
H4	5*	Picual	SCA Ntra. Sra. del Carmen	Hinojosa del Duque (Córdoba)	25/04/08	50000

Capítulo 2

H4	6	Picual	Las Cinco Villas SCA	Los Blázquez (Córdoba)	25/04/08	26500
H4	7	Picual	Agr. Oliv. Virgen del Campo, SCA	Cañete de las Torres (Córdoba)	25/04/08	48000
H4	8	Picual	SCA del Campo Ntra.Sra Del Valle	Morente (Córdoba)	25/04/08	29500
H4	9	Picual	SCA del Campo Ntra.Sra Del Valle	Santaella (Córdoba)	25/04/08	50000
H4	10*	Picual	Coop. Oliv. Ntra. Sra. Merced, SCA	Montoro (Córdoba)	25/04/08	60000
H4	11	Picual	Olivarera San Isidro, SCA	Espejo (Córdoba)	25/04/08	300000
H4	12***	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. de Piedad	Iznájar (Córdoba)	25/04/08	42000
H4	13*	Picual	Coop. Oliv. San Rafael, SCA	Villaharta (Córdoba)	25/04/08	20750
H4	14*	Picual	Olivarera de Montoro, SCA	Montoro (Córdoba)	25/04/08	38000
H4	15*	Picual	Oliv. Santiago Apóstol, SCA	Villanueva del Rey (Córdoba)	25/04/08	50500
H4	16	Picual	Coop. Oliv. San José	Valenzuela (Córdoba)	25/04/08	195000
H4	17	Picual	Coop. Oliv. Virgen Estrella, SCA	Villa del Río (Córdoba)	25/04/08	97500
H4	18	Hojiblanca	SCA. Purísima Santiago COPUSAN	Alozaina (Málaga)	25/04/08	20500
H4	19**	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Remedios	Antequera (Málaga)	25/04/08	50000
H4	20	Hojiblanca	SCA. Virgen de las Virtudes	Fuente de Piedra (Málaga)	25/04/08	23500
H4	21*	Picual	Coop.Agr. Ntra Madre del Sol, SCA	Adamuz (Córdoba)	25/04/08	53000
H4	22**	Hojiblanca	SCA La Purísima	Archidona (Málaga)	25/04/08	444500
H4	23**	Hojiblanca	SCA Purísima Concepción	Alameda (Málaga)	25/04/08	49000
H4	24**	Hojiblanca	Olealgaidas. SCA	Villanueva de Algaidas (Málaga)	25/04/08	101000
H4	25**	Hojiblanca	SCA San Benito	Campillos (Málaga)	25/04/08	76000
H4	26**	Hojiblanca	SCA Ntra Sra Rosario	Humilladero (Málaga)	25/04/08	50000
H4	27	Hojiblanca	SCA San Isidro Labrador	Palenciana (Córdoba)	25/04/08	228000
H4	28	Hojiblanca	SCA Virgen de la Oliva	Mollina (Málaga)	25/04/08	34000
H4	29	Hojiblanca	SCA San Cosme y San Damián	Almargen (Málaga)	25/04/08	49300
H4	30**	Hojiblanca	SCA San Juan	Villanueva del Rosario (Málaga)	25/04/08	31500
H4	31***	Hojiblanca	SCA Olivarera de Lucena	Lucena (Córdoba)	25/04/08	10410
H4	32**	Hojiblanca	Olivarera del Trabuco	Villanueva del Trabuco	25/04/08	102000

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

				(Málaga)		
H4	33	Hojiblanca	SCA Aruega	Archidona (Málaga)	25/04/08	25000
H4	34	Hojiblanca	SCA Oliv. Santa Rita	Villanueva de Tapia (Málaga)	25/04/08	75000
H4	35	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Candelaria	Colmenar (Málaga)	25/04/08	47000
H4	36***	Hojiblanca	SCA Oliv. Ntra. Sra. Araceli	Lucena (Córdoba)	25/04/08	52000
H4	37	Hojiblanca	SCA San Juan Bautista	Cuevas Bajas (Málaga)	25/04/08	95000
H4	38	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Gracia	Villanueva de Algaidas (Málaga)	25/04/08	89000
H4	39	Hojiblanca	SCA San Justo y Ntra Sra Carmen	Villanueva de Algaidas (Málaga)	25/04/08	230000
H4	40	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Carmen	Cuevas de San Marco (Málaga)	25/04/08	245000
H4	41	Hojiblanca	SCA Oliv. San José	Llanos de Don Juan (Córdoba)	25/04/08	362000
H4	42***	Hojiblanca	--	Aguilar de la Frontera (Córdoba)	25/04/08	51000
H4	43	Hojiblanca	--	Los Corrales (Sevilla)	25/04/08	40000
H4	44***	Hojiblanca	--	Benamejé (Córdoba)	25/04/08	49000
H4	45	Hojiblanca	--	El Saucejo (Sevilla)	25/04/08	50000
H4	46	Hojiblanca	--	Marchena (Sevilla)	25/04/08	34000
H4	47	Hojiblanca	--	COEPA Estepa (Sevilla)	25/04/08	5000

* Pertencientes a la DOP Montoro-Adamuz

**Pertencientes a la DOP Antequera

***Pertencientes a al DOP Lucena

Tabla 2.13. Muestras de Denominaciones de Origen, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Variedad	Procedencia	Zona
DO4	1	Arbequina, Hojiblanca, Manzanilla, Lechín y Picual	--	C.R.D.O. Estepa
DO4	2	Hojiblanca	--	C.R.D.O. Estepa
DO4	3	Hojiblanca y Arbequina	--	C.R.D.O. Estepa
DO4	4	Arbequina	--	C.R.D.O. Estepa
DO4	14	Royal	--	C.R.D.O. Sierra Cazorla
DO4	15	Picual	--	C.R.D.O. Sierra Cazorla
DO4	16	Hojiblanca 100%	--	C.R.D.O. Priego De Córdoba
DO4	17	Picudo 100%	--	C.R.D.O. Priego De Córdoba

DO4	18	Hojiblanca 50%, Picudo 50%	--	C.R.D.O. Priego De Córdoba
DO4	19	Lucio	Almazara Casería de la Virgen. Alomartes- Illora	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO4	20	Picudo 70%, Hojiblanca 30%	Aceites Algarinejo. Algarinejo	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO4	21	Picual	M ^a Josefa Liñán. Villanueva Mesía	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO4	22	Picudo	Aceites Algarinejo. SCA	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO4	23	Hojiblanca	Aceites Fuentes de Cesna. Algarinejo	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO4	24	Picual	Puerto Lope SCA.	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO4	25	Picual , Picudo y Hojiblanca (Ecológico)	Núñez de Prado	C.R.D.O Baena (Córdoba)
DO4	26	Picudo 100%	Duque de Baena	C.R.D.O Baena (Córdoba)

Tabla 2.14. Muestras de Germoplasma (Córdoba y Tarragona), campaña 2007/2008.

Serie	RI	Variedad	Procedencia	Fecha
G4	1	Manzanilla de Sevilla	Córdoba	16/10/2007
G4	2	Picual	Córdoba	16/10/2007
G4	3	Frantoio	Córdoba	16/10/2007
G4	4	Sourani	Córdoba	5/11/2007
G4	5	Hojiblanca	Córdoba	6/11/2007
G4	6	Arbequina	Córdoba	6/11/2007
G4	7	Koroneiki	Córdoba	13/12/2007
G4	8	Zaity	Córdoba	-----
GT4-S	9	Hojiblanca secano	Mora de Ebro	-----
GT4-R	10	Arbequina	Constanti	-----
GT4-R	11	Picual	Constanti	-----
GT4-S	12	Hojiblanca	Mora de Ebro	23/11/2007
GT4-S	13	Picual	Mora de Ebro	23/11/2007
GT4-S	14	Arbequina	Mora de Ebro	-----
GT4-R	15	Arbequina	Mora de Ebro	-----
GT4-S	16	Hojiblanca	Mora de Ebro	-----
GT4-S	17	Arbequina	Mora de Ebro	-----
GT4-R	18	Arbequina	Mora de Ebro	-----
GT4-R	19	Arbequina	Mora de Ebro	-----

S= Secano; R= Regadío

*Identificación de las muestras y resultados obtenidos por
cromatografía de gases como técnica de referencia*

Tabla 2.15. Muestras del Grupo Hojiblanca, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Variedad	Procedencia	Zona
H5	1*	Picual	Coop. Oliv. Ntra. Sra. Villaviciosa	Villaviciosa (Córdoba)
H5	2	Picual	SCA Ntro.Padre Jesús	La Rambla (Córdoba)
H5	3*	Picual	Coop. del Campo San Antonio Abad	Obejo (Córdoba)
H5	4	Hojiblanca	SCA Ntra.Sra. Rosario	Teba (Málaga)
H5	5*	Picual	SCA Ntra. Sra. del Carmen	Hinojosa del Duque (Córdoba)
H5	6	Picual	Las Cinco Villas SCA	Los Blázquez (Córdoba)
H5	7	Picual	Agr. Oliv. Virgen del Campo, SCA	Cañete de las Torres (Córdoba)
H5	8	Picual	SCA Del Campo Ntra.Sra. del Valle	Morente (Córdoba)
H5	9	Picual	SCA Del Campo Ntra.Sra. del Valle	Santaella (Córdoba)
H5	10*	Picual	Coop. Oliv. Ntra. Sra. Merced, SCA	Montoro (Córdoba)
H5	11	Picual	Olivarera San Isidro, SCA	Espejo (Córdoba)
H5	12***	Hojiblanca	SCA Ntra .Sra. de Piedad	Iznájar (Córdoba)
H5	13*	Picual	Coop. Oliv. San Rafael, SCA	Villaharta (Córdoba)
H5	14*	Picual	Olivarera de Montoro, SCA	Montoro (Córdoba)
H5	15*	Picual	Oliv. Santiago Apóstol, SCA	Villanueva del Rey (Córdoba)
H5	16	Picual	Coop. Oliv. San José	Valenzuela (Córdoba)
H5	17	Picual	Coop. Oliv. Virgen Estrella, SCA	Villa del Rio (Córdoba)
H5	18	Hojiblanca	SCA. Santiago COPUSAN	Alozaina (Málaga)
H5	19**	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Remedios	Antequera (Málaga)
H5	20	Hojiblanca	SCA. Virgen de las Virtudes	Fuente de Piedra (Málaga)
H5	21*	Picual	Coop.Agr. Ntra Madre del Sol, SCA	Adamuz (Córdoba)
H5	22**	Hojiblanca	SCA La Purísima	Archidona (Málaga)
H5	23**	Hojiblanca	SCA Purísima Concepción	Alameda (Málaga)
H5	24**	Hojiblanca	Olealgaidas, SCA	Villanueva de Algaidas (Málaga)
H5	25**	Hojiblanca	SCA San Benito	Campillos (Málaga)
H5	26**	Hojiblanca	SCA Ntra Sra. Rosario	Humilladero (Málaga)
H5	27	Hojiblanca	SCA San Isidro Labrador	Palenciana (Córdoba)
H5	28	Hojiblanca	SCA Virgen de la Oliva	Mollina (Málaga)
H5	29	Hojiblanca	SCA. San Cosme y San Damián	Almargen (Málaga)
H5	30**	Hojiblanca	SCA San Juan	Villanueva del Rosario (Málaga)
H5	31***	Hojiblanca	SCA Olivarera de Lucena	Lucena (Córdoba)
H5	32**	Hojiblanca	Olivarera del Trabuco	Villanueva del Trabuco (Málaga)
H5	33	Hojiblanca	SCA Arvega	Archidona (Málaga)
H5	34	Hojiblanca	SCA Oliv. Santa Rita	Villanueva de Tapia (Málaga)
H5	35	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Candelaria	Colmenar (Málaga)
H5	36***	Hojiblanca	SCA Oliv. Ntra. Sra. Araceli	Lucena (Córdoba)

H5	37	Hojiblanca	SCA San Juan Bautista	Cuevas Bajas (Málaga)
H5	38	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Gracia	Villanueva de Algaidas (Málaga)
H5	39	Hojiblanca	SCA. San Justo y Ntra. Sra. Carmen	Villanueva de Algaidas (Málaga)
H5	40	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Carmen	Cuevas de San Marco (Málaga)
H5	41	Hojiblanca	SCA Oliv. San José	Llanos de Don Juan (Córdoba)
H5	42***	Hojiblanca	--	Aguilar de la Frontera
H5	43	Hojiblanca	--	Los Corrales (Sevilla)
H5	44***	Hojiblanca	--	Benamejí
H5	45	Hojiblanca	--	El Saucejo
H5	46	Hojiblanca	--	Marchena
H5	47	Picual	--	COEPA Estepa (Sevilla)

* Pertencientes a la DOP Montoro-Adamuz

**Pertencientes a la DOP Antequera

***Pertencientes a la DOP Lucena

Tabla 2.16. Muestras de Denominaciones de Origen, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Variedad	Procedencia	Zona
DO5	1	Arbequina, Hojiblanca, Manzanilla, Lechín y Picual	--	C.R.D.O. Estepa
DO5	2	Hojiblanca	--	C.R.D.O. Estepa
DO5	3	Hojiblanca y Arbequina	--	C.R.D.O. Estepa
DO5	4	Arbequina	--	C.R.D.O. Estepa
DO5	14	Royal	SCA "Bética Aceitera" Quesada	C.R.D.O. Sierra Cazorla
DO5	15	Picual	SCA "Sto. Tomás Apóstol" Sto. Tomé	C.R.D.O. Sierra Cazorla
DO5	16	Hojiblanca 100%	--	C.R.D.O. Priego De Córdoba
DO5	17	Picudo 100%	--	C.R.D.O. Priego De Córdoba
DO5	18	Hojiblanca 50%, Picudo 50%	--	C.R.D.O. Priego De Córdoba
DO5	19	Lucio- Regadío	Almazara Casería de la Virgen. Alomartes-Illora	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO5	20	Picudo 70%, Hojiblanca 30%	Aceites Algarinejo. Algarinejo	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO5	21	Picual- Regadío	Mª Josefa Liñán. Villanueva Mesía	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO5	23	Hojiblanca	Aceites Fuentes de Cesna. Algarinejo	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO5	24	Picual	Puerto Lope SCA.	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO5	27	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	SCA Ntra. Sr. De los Remedios	C.R.D.O. Sierra De Cádiz
DO5	28	Lechín, Manzanilla, Verdial, Hojiblanca(+), Picual,	SCA El Agro de Setenil de las Bodegas	C.R.D.O. Sierra De Cádiz

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

		Alameña y Arbequina. 50% riego mantenimiento.		
DO5	29	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	SCA San Juan Bautista	C.R.D.O. Sierra De Cádiz
DO5	30	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	SCA San Juan Bautista	C.R.D.O. Sierra De Cádiz
DO5	31	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	SCA Sierra del Terril	C.R.D.O. Sierra De Cádiz
DO5	32	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	SCA Sierra del Terril	C.R.D.O. Sierra De Cádiz

Tabla 2.17. Muestras procedentes del Banco de Germoplasma, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Variedad	Procedencia
G5	1	Manzanilla de Sevilla	Córdoba
G5	2	Picual	Córdoba
G5	3	Frantoio	Córdoba
G5	4	Trylia	Córdoba
G5	5	Hojiblanca	Córdoba
G5	6	Arbequina	Córdoba
G5	7	Empeltre	Córdoba
G5	8	Zaiti	Córdoba
G5	9	Picual de Estepa	Córdoba

Tabla 2.18. Muestras del Grupo Hojiblanca, campaña 2009-2010.

Serie	RI	Variedad	Procedencia	Zona
H6	1*	Picual	Coop. Oliv. Ntra. Sra. Villaviciosa	Villaviciosa (Córdoba)
H6	3*	Picual	Coop. Del Campo San Antonio Abad	Obejo (Córdoba)
H6	10*	Picual	Coop. Oliv. Ntra. Sra. Merced., SCA	Montoro (Córdoba)
H6	14*	Picual	Olivarera de Montoro, SCA	Montoro (Córdoba)
H6	15*	Picual	Oliv. Santiago Apóstol, SCA	Villanueva del Rey (Córdoba)
H6	19**	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Remedios	Antequera (Málaga)
H6	21*	Picual	Coop. Agr. Ntra. Madre del Sol, SCA	Adamuz (Córdoba)
H6	22**	Hojiblanca	SCA La Purísima	Archidona (Málaga)
H6	23**	Hojiblanca	SCA Purísima Concepción	Alameda (Málaga)
H6	24**	Hojiblanca	Olealgaidas. SCA	Villanueva de Algaidas (Málaga)
H6	25**	Hojiblanca	SCA San Benito	Campillos (Málaga)
H6	26**	Hojiblanca	SCA Ntra Sra. Rosario	Humilladero (Málaga)

* Pertencientes a la DOP Montoro-Adamuz

**Pertencientes a la DOP Antequera

***Pertencientes a la DOP Lucena

Tabla 2.19. Muestras de Denominaciones de Origen, campaña 2009-2010.

Serie	RI	Variedad	Procedencia	Zona
DO6	1	Estepa virgen	--	C.R.D.O. Estepa
DO6	2	Hojiblanca	--	C.R.D.O. Estepa
DO6	3	Hojiblanca y Arbequina	--	C.R.D.O. Estepa
DO6	4	Arbequina	--	C.R.D.O. Estepa
DO6	5	Hojiblanca	--	C.R.D.O. Antequera
DO6	10	Picual (Zona I- Campiña) Riego	Bedmar	C.R.D.O. Sierra Mágina
DO6	11	Picual (Zona II:Sierra-Campiña) Riego	Torres	C.R.D.O. Sierra Mágina
DO6	12	Picual (Zona III: Campiña-Sierra) Riego+Secano	Pegalajar	C.R.D.O. Sierra Mágina
DO6	13	Picual (Zona IV: Sierra) Riego	Solera	C.R.D.O. Sierra Mágina
DO6	14	Royal	La Iruela-Secano	C.R.D.O. Sierra Cazorla
DO6	15	Picual	Quesada- Riego	C.R.D.O. Sierra Cazorla
DO6	16	Hojiblanca 100%	--	C.R.D.O. Priego De Córdoba
DO6	17	Picudo 100%	--	C.R.D.O. Priego De Córdoba
DO6	18	Hojiblanca 50%, Picudo 50%	--	C.R.D.O. Priego De Córdoba
DO6	20	Picudo	Aceites Algarinejo. Algarinejo	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO6	21	Picual	Fab. Aceite "El Buen Pastor" Montefrío	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO6	22	Picudo chorreo	SCA San Francisco de Asís. Montefrío	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO6	23	Multivarietal	Casería De La Virgen. Alomartes-Illora	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO6	24	Picual	Agriconsum SA Tocón-Illora	C.R.D.O. Poniente De Granada
DO6	27	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	SCA Ntra. Sra. de Los Remedios (Olvera, Cádiz)	C.R.D.O. Sierra De Cádiz
DO6	28	Lechín, Manzanilla, Verdial, Hojiblanca(+), Picual, Alameña y Arbequina. 50% riego mantenimiento.	SCA Las Pilas (Olvera, Cádiz)	C.R.D.O. Sierra De Cádiz
DO6	29	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	SCA San Juan Bautista (Villanueva De San Juan, Sevilla)	C.R.D.O. Sierra De Cádiz
DO6	31	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	SCA Sierra Del Terril (Algámitas, Sevilla)	C.R.D.O. Sierra De Cádiz
DO6	33	Picual y Royal	--	C.R.D.O. Sierra De Segura
DO6	34	Picual y Royal	--	C.R.D.O. Sierra De Segura

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

DO6	35	Picual y Royal	--	C.R.D.O. Sierra De Segura
DO6	36	Picual y Royal	--	C.R.D.O. Sierra De Segura
DO6	37	Picual y Royal	--	C.R.D.O. Sierra De Segura
DO6	38	Picual y Royal	--	C.R.D.O. Sierra De Segura

Tabla 2.20. Muestras del Grupo Hojiblanca, campaña 2010-2011.

Serie	RI	Variedad	Procedencia	Zona
H7	1	Picual	Coop. Oliv. Ntra. Sra. Villaviciosa	Villaviciosa (Córdoba)
H7	3	Picual	Coop. del Campo San Antonio Abad	Obejo (Córdoba)
H7	10	Picual	Coop. Oliv. Ntra. Sra. Merced, SCA	Montoro (Córdoba)
H7	14	Picual	Olivarera de Montoro, SCA	Montoro (Córdoba)
H7	15	Picual	Oliv. Santiago Apóstol, SCA	Villanueva del Rey (Córdoba)
H7	19	Hojiblanca	SCA Ntra. Sra. Remedios	Antequera (Málaga)
H7	21	Picual	Coop. Agr. Ntra Madre del Sol, SCA	Adamuz (Córdoba)
H7	22	Hojiblanca	SCA La Purísima	Archidona (Málaga)
H7	23	Hojiblanca	SCA Purísima Concepción	Alameda (Málaga)
H7	24	Hojiblanca	Olealgaidas, SCA	Villanueva de Algaidas (Málaga)
H7	25	Hojiblanca	SCA San Benito	Campillos (Málaga)
H7	26	Hojiblanca	SCA Ntra Sra. Rosario	Humilladero (Málaga)

Tabla 2.21. Muestras de Denominaciones de Origen, campaña 2010-2011.

Serie	Ri	Variedad	Procedencia	Zona
DO7	1	Estepa virgen	--	C.R.D.O. Estepa
DO7	2	Hojiblanca	--	C.R.D.O. Estepa
DO7	3	Hojiblanca y Arbequina	--	C.R.D.O. Estepa
DO7	4	Arbequina	--	C.R.D.O. Estepa
DO7	14	Royal	La Iruela-Secano	C.R.D.O. Sierra Cazorla
DO7	15	Picual	Pozo Alcón- Riego	C.R.D.O. Sierra Cazorla
DO7	16	Hojiblanca 100%	Carcabuey	C.R.D.O. Priego de Córdoba
DO7	17	Picudo 100%	Carcabuey	C.R.D.O. Priego de Córdoba
DO7	18	Hojiblanca 80%, Picudo 20%	Priego de Córdoba	C.R.D.O. Priego de Córdoba
DO7	20	Picudo (C1-11)	Aceites Algarinejo. Algarinejo	C.R.D.O. Poniente de Granada

DO7	21	Picual (C9-11)	Puerto Lope SCA. Moclín (Granada)	C.R.D.O. Poniente de Granada
DO7	22	Picudo –Chorro (C611)	SCA. San Francisco de Asís. Montefrío	C.R.D.O. Poniente de Granada
DO7	23	Predominio Picual (C711)	Casería de la Virgen. Illora	C.R.D.O. Poniente de Granada
DO7	24	Picual (8-11)	Agriconsum SA Illora	C.R.D.O. Poniente de Granada
DO7	25	Hojiblanca (C2-11)	Aceites Fuentes de Cesna. Algarinejo	C.R.D.O. Poniente de Granada
DO7	26	Hojiblanca (C411)	SCA San Lorenzo Zagra-Granada	C.R.D.O. Poniente de Granada
DO7	27	Hojiblanca (A2011)	Almazara Ángela Jayena-Granada	C.R.D.O. Poniente de Granada
DO7	29	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	SCA Ntra. Sra. D los Remedios (Olvera, Cádiz)	C.R.D.O. Sierra de Cádiz
DO7	31	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	SCA San Antón (Pruna, Sevilla)	C.R.D.O. Sierra de Cádiz

1.2 OBTENCIÓN DEL ACEITE

Los aceites que forman nuestra base de datos, a excepción de los vegetales (V), son aceites de oliva virgen extra. Las muestras han sido suministradas por la Cooperativa Hojiblanca y por las distintas DOPs que han participado en el estudio. Estos aceites han sido obtenidos en almazaras mediante sistema continuo de dos fases, muy extendido en España, a diferencia de otros países, el cual permite reducir la cantidad de subproductos líquidos, ya que por un lado se obtiene el aceite y por otro el alperujo (alpechín y orujo) [2].

Las muestras de la primera campaña (2004-2005), fueron obtenidas por el sistema de ABENCOR [3,4]

2. CROMATOGRAFÍA DE GASES

Como ya se indicó en el *Apartado 1 del Capítulo 1*, una vez construida la base de datos se evaluó, entre otros aspectos, la capacidad predictiva en el contenido en ácidos grasos a partir de los correspondientes espectros de RMN, MIR, NIR y Raman. Para ello, fue preciso realizar la determinación de dicho contenido mediante el método de referencia (cromatografía de gases).

Los métodos oficiales para el control del aceite de oliva y de orujo de oliva de la Unión Europea (UE) [5] y del Comité Oleícola Internacional (COI) [6,7] incluyen la determinación de ácidos grasos en la aplicación de varios criterios de pureza. La determinación de ácidos grasos requiere la preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) y su posterior análisis mediante cromatografía de gases con una buena repetibilidad y reproducibilidad [8].

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis correspondientes a las tres primeras campañas fueron realizados por el Laboratorio Agroalimentario de Córdoba y el Departamento de Agronomía y las cuatro campañas restantes se analizaron en el Departamento de Química Orgánica, utilizándose un equipo de Cromatografía de Gases Agilent 7890A con una columna capilar (SGE FORTE BPX-70 de 50m x 220 μ m x 0.25 μ m) y las siguientes condiciones de trabajo:

- Temperatura del horno: 180°C al inicio, durante 15 minutos, para luego subir a 240°C con una rampa de 4°C/min manteniéndose durante 5 minutos.
- Temperatura del detector: 260°C.
- Temperatura del inyector: 250°C.

Capítulo 2

- Volumen de muestra inyectado: 1 μ L.

Se ha utilizado el método de transesterificación en frío, indicado para aceites con un índice de acidez inferior a 3,3° [5,6]. El procedimiento es el siguiente:

En un tubo roscado de 5 mL pesar, aproximadamente, 0,1 g de la muestra de aceite. Añadir 2 mL de n-heptano y agitar. Añadir 0,2 mL de una disolución 2N de KOH en metanol. Poner el tapón provisto de la junta PTFE, cerrarlo bien y agitar enérgicamente durante 30 segundos. Dejar reposar hasta que la disolución de la parte superior resulte nítida. Decantar la capa superior, que es la que contiene los ésteres metílicos. La disolución de n-heptano está lista para inyectarla en el cromatógrafo. Es aconsejable mantener la disolución en el frigorífico hasta el momento de realizar el análisis cromatográfico. No se recomienda almacenar la disolución durante más de 12 horas [5].

Para calcular la composición en ácidos grasos se han de tener en cuenta:

Ácido graso	Nomenclatura	Cálculo
Mirístico*	C14:0	
Palmítico	C16:0	Suma de las áreas de los picos correspondientes a los ésteres metílicos y etílicos.
Palmitoleico	C16:1	Suma de las áreas de los picos correspondientes a los isómeros ω 9 y ω 7 del éster metílico.
Margárico	C17:0	
Margaroleico	C17:1	
Esteárico	C18:0	
Oleico+Vaccénico**	C18:1	Suma de las áreas de los picos correspondientes a los isómeros ω 9 y ω 7 del éster metílico, el éster etílico y los isómeros trans del éster metílico.
Linoleico	C18:2	Suma de las áreas de los picos correspondientes a los ésteres metílicos y etílicos y a los isómeros trans del éster metílico.
Araquídico o	C20:0	

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

aráquico		
Linolénico	C18:3	Suma de las áreas del éster metílico y de los isómeros trans del éster metílico.
Gadoleico	C20:1	
Behénico*	C22:0	
Lignocérico*	C24:0	

*En aceite de oliva se encuentran en cantidades insignificantes

**El Oleico (C-18:1_{n-7}) se cuantifica unido al Vaccénico (C-18:1_{n-9}) ya que en esta técnica, a diferencia de RMN, no se consigue una separación entre ambos.

El cálculo del porcentaje de cada ácido graso se efectuará según la siguiente fórmula: $\%X = (\text{Área X} \times 100) / \text{área total}$

2.2. RESULTADOS DE ÁCIDOS GRASOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

A continuación se muestran los valores de los distintos ácidos grasos para la totalidad de las muestras de nuestro estudio, obtenidos mediante Cromatografía de Gases (GC). Esta técnica es considerada como técnica de referencia.

Tabla 2.22. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie G1 (campana 2004 –2005). También se incluyen 3 de la serie E1 y 6 de la S1.

Serie	RI	Palmitico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Esteárico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Aráquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
G1	1	11,9	0,6	0,2	0,2	4,3	74,7	6,5	0,6	0,8	0,3	4,8	10,7	17,2	75,8	7,1
G1	2	12,4	0,6	0,2	0,3	4,2	73,3	7,4	0,6	0,7	0,3	4,7	9,4	17,5	74,5	8,0
G1	3	12,3	0,7	0,2	0,3	4,1	73,0	7,9	0,6	0,7	0,3	4,8	8,8	17,3	74,3	8,5
G1	4	15,4	1,4	0,1	0,4	1,8	67,5	12,0	0,7	0,4	0,3	4,6	5,5	17,7	69,6	12,7
G1	5	15,5	1,6	0,1	0,3	1,7	66,9	12,5	0,7	0,4	0,3	4,6	5,3	17,7	69,1	13,2
G1	6	15,8	2,0	0,1	0,3	1,6	66,4	12,4	0,7	0,4	0,3	4,6	5,3	17,9	69,0	13,1
G1	9	17,4	3,0	0,1	0,3	1,6	62,3	13,4	1,0	0,5	0,3	4,1	4,6	19,6	65,9	14,4
G1	10	12,1	0,8	0,1	0,2	2,3	75,6	7,3	0,8	0,5	0,4	5,7	9,5	15,0	77,0	8,1
G1	11	12,4	0,9	0,1	0,2	2,2	75,1	7,5	0,8	0,5	0,4	5,6	9,2	15,2	76,6	8,3
G1	12	13,4	1,4	0,1	0,2	2,2	71,4	9,8	0,8	0,4	0,3	5,2	6,9	16,1	73,3	10,6
G1	14	12,5	1,1	0,1	0,2	2,3	74,1	8,0	0,8	0,5	0,4	5,5	8,6	15,4	75,8	8,8
G1	15	13,2	1,6	0,0	0,2	2,3	71,9	9,2	0,8	0,4	0,3	5,2	7,4	15,9	74,0	10,0

Capítulo 2

G1	16	15,1	1,2	0,1	0,2	2,7	61,8	17,0	1,2	0,5	0,3	4,5	3,5	18,4	63,5	18,2
G1	17	15,3	1,3	0,1	0,1	2,9	58,8	19,7	1,2	0,5	0,3	4,3	2,9	18,8	60,5	20,9
G1	18	15,2	1,3	0,1	0,2	3,3	57,4	20,8	1,1	0,5	0,2	4,3	2,7	19,1	59,1	21,9
G1	19	14,9	1,3	0,1	0,1	2,8	63,2	15,7	1,1	0,5	0,3	4,5	3,9	18,3	64,9	16,8
G1	20	15,0	1,4	0,1	0,2	3,1	60,5	18,0	1,1	0,5	0,3	4,4	3,3	18,7	62,4	19,1
G1	21	15,2	1,5	0,0	0,1	3,3	58,3	19,8	1,0	0,5	0,2	4,3	2,9	19,0	60,1	20,8
G1	22	11,4	0,5	0,2	0,2	4,4	74,8	6,9	0,6	0,7	0,3	5,0	10,1	16,7	75,8	7,5
G1	23	11,6	0,6	0,2	0,2	4,3	73,7	7,8	0,6	0,7	0,3	5,0	9,0	16,8	74,8	8,4
G1	24	11,8	0,6	0,2	0,3	4,3	72,1	9,3	0,6	0,7	0,3	4,9	7,4	17,0	73,3	9,9
G1	25	14,5	1,2	0,1	0,3	1,8	69,9	10,7	0,7	0,4	0,4	5,0	6,3	16,8	71,8	11,4
G1	26	14,9	1,4	0,1	0,3	1,7	68,4	11,8	0,7	0,4	0,3	4,9	5,6	17,1	70,4	12,5
G1	27	15,3	1,9	0,1	0,3	1,6	67,9	11,6	0,6	0,4	0,3	4,8	5,8	17,4	70,4	12,2
G1	28	14,6	1,4	0,1	0,3	1,7	69,1	11,5	0,7	0,4	0,4	5,0	5,8	16,8	71,2	12,2
G1	29	15,0	1,7	0,1	0,3	1,6	67,9	12,0	0,7	0,4	0,3	4,8	5,5	17,1	70,2	12,7
G1	30	16,2	2,3	0,1	0,3	1,6	64,8	13,3	0,8	0,4	0,3	4,5	4,8	18,3	67,7	14,1
G1	31	11,9	0,7	0,1	0,2	2,3	76,1	7,2	0,8	0,4	0,4	5,8	9,8	14,7	77,4	8,0
G1	32	12,6	1,0	0,1	0,2	2,2	73,7	8,8	0,8	0,4	0,4	5,6	7,9	15,3	75,3	9,6
G1	33	13,4	1,5	0,0	0,2	2,2	70,9	10,3	0,8	0,4	0,3	5,3	6,6	16,0	72,9	11,1
G1	35	12,2	1,1	0,1	0,2	2,2	74,5	8,1	0,8	0,4	0,4	5,7	8,6	14,9	76,2	8,9
G1	36	13,0	1,6	0,0	0,2	2,1	72,1	9,4	0,8	0,4	0,3	5,4	7,3	15,5	74,2	10,2
G1	37	14,8	1,2	0,1	0,2	2,8	60,7	18,4	1,2	0,5	0,3	4,5	3,2	18,2	62,4	19,6
G1	38	14,6	1,2	0,1	0,2	3,1	60,1	18,9	1,1	0,5	0,3	4,5	3,1	18,3	61,8	20,0
G1	39	14,9	1,3	0,0	0,1	3,5	56,4	21,9	1,1	0,5	0,2	4,3	2,5	18,9	58,0	23,0
G1	40	14,8	1,2	0,1	0,1	2,9	61,4	17,7	1,1	0,5	0,3	4,5	3,4	18,3	63,0	18,8
G1	41	15,3	1,5	0,0	0,1	3,7	54,3	23,4	1,1	0,5	0,2	4,1	2,3	19,5	56,1	24,5
G1	42	14,7	1,3	0,0	0,2	3,3	60,0	18,8	1,1	0,5	0,3	4,4	3,1	18,5	61,8	19,9
G1	44	11,1	0,5	0,2	0,3	4,7	73,5	8,2	0,6	0,7	0,3	5,0	8,5	16,7	74,6	8,8
G1	45	11,1	0,6	0,1	0,3	4,3	72,7	9,4	0,6	0,7	0,3	5,2	7,4	16,2	73,9	10,0
G1	46	14,3	1,4	0,1	0,3	1,7	69,3	11,5	0,7	0,4	0,3	5,0	5,9	16,5	71,3	12,2
G1	47	14,4	1,7	0,1	0,3	1,6	69,2	11,5	0,6	0,4	0,3	5,1	5,9	16,5	71,5	12,1
G1	48	14,8	1,5	0,1	0,3	1,6	68,6	11,6	0,7	0,4	0,4	4,9	5,7	16,9	70,8	12,3
G1	49	15,1	1,7	0,1	0,3	1,6	66,9	12,7	0,8	0,4	0,3	4,8	5,1	17,2	69,2	13,5
G1	50	11,6	0,7	0,1	0,2	2,3	75,5	8,2	0,7	0,4	0,4	6,0	8,5	14,4	76,8	8,9
G1	51	12,4	0,9	0,1	0,2	2,3	72,6	9,9	0,8	0,4	0,4	5,6	6,9	15,2	74,1	10,7
G1	52	13,4	1,3	0,0	0,2	2,2	69,8	11,6	0,8	0,4	0,3	5,2	5,8	16,0	71,6	12,4
G1	53	11,6	0,8	0,1	0,2	2,2	76,1	7,5	0,7	0,4	0,4	6,0	9,4	14,3	77,5	8,2
G1	54	12,2	1,0	0,1	0,2	2,2	74,2	8,7	0,7	0,4	0,3	5,7	8,1	14,9	75,7	9,4
G1	55	13,2	1,6	0,0	0,2	2,2	71,3	10,1	0,7	0,4	0,3	5,3	6,8	15,8	73,4	10,8
G1	56	14,2	1,1	0,1	0,1	2,9	62,5	17,3	1,1	0,5	0,3	4,7	3,5	17,7	64,0	18,4
G1	57	14,2	1,1	0,1	0,2	3,3	60,7	18,9	1,0	0,4	0,3	4,6	3,1	18,0	62,3	19,9
G1	58	14,7	1,3	0,0	0,1	3,7	56,0	22,4	1,0	0,5	0,2	4,3	2,5	18,9	57,6	23,4
G1	59	14,3	1,1	0,1	0,1	2,9	62,7	17,0	1,1	0,5	0,3	4,6	3,6	17,8	64,2	18,1
G1	60	14,4	1,2	0,1	0,2	3,2	59,7	19,5	1,1	0,4	0,3	4,5	3,0	18,1	61,4	20,6

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

G1	61	14,8	1,4	0,0	0,1	3,6	56,1	22,3	1,0	0,4	0,2	4,3	2,5	18,8	57,8	23,3
G1	62	11,6	1,1	0,1	0,1	2,7	79,6	3,6	0,7	0,4	0,3	5,8	19,2	14,8	81,1	4,3
E1	63	8,9	0,5	0,2	0,3	3,7	75,0	10,0	0,8	0,4	0,3	6,6	7,1	13,2	76,1	10,8
E1	64	8,6	0,7	0,1	0,3	3,4	72,3	12,9	1,1	0,4	0,3	7,0	5,3	12,5	73,6	14,0
E1	65	16,3	1,5	0,1	0,3	1,8	66,1	12,6	0,6	0,4	0,3	4,4	5,2	18,6	68,2	13,2
S1	66	15,6	0,9	0,1	0,2	3,9	67,9	9,8	0,7	0,6	0,3	3,9	6,6	20,2	69,3	10,5
S1	67	15,3	0,8	0,1	0,3	3,8	68,6	9,6	0,6	0,6	0,3	4,0	6,8	19,8	70,0	10,2
S1	68	15,4	0,8	0,1	0,3	3,9	66,7	11,5	0,6	0,5	0,3	4,0	5,6	19,9	68,1	12,1
S1	69	15,5	0,9	0,2	0,3	3,9	65,9	11,9	0,7	0,6	0,3	4,0	5,4	20,2	67,4	12,6
S1	70	15,2	0,9	0,1	0,2	3,7	64,7	13,6	0,7	0,5	0,3	4,1	4,6	19,5	66,1	14,3
S1	71	15,2	0,8	0,1	0,3	3,8	66,2	12,3	0,6	0,5	0,3	4,1	5,2	19,6	67,6	12,9
G1	72	11,7	0,5	0,2	0,3	3,8	71,0	11,1	0,6	0,5	0,3	5,2	6,2	16,2	72,1	11,7
G1	73	13,6	0,9	0,2	0,3	4,5	69,9	9,0	0,7	0,7	0,3	4,3	7,4	19,0	71,4	9,7
G1	74	12,6	0,5	0,1	0,3	2,8	61,1	20,9	0,9	0,5	0,4	5,2	2,9	16,0	62,3	21,8
G1	75	13,1	0,9	0,2	0,5	2,2	66,0	15,3	1,1	0,4	0,4	5,3	4,1	15,9	67,8	16,4
V1	76	4,0	0,1	0,0	0,1	3,7	79,7	11,8	0,1	0,3	0,2	11,5	6,7	8,0	80,1	11,9
V1	77	10,9	0,1	0,1	0,3	2,0	29,5	55,9	0,7	0,4	0,2	6,5	0,5	13,4	30,1	56,6
V1	78	7,4	0,1	0,1	0,2	3,6	45,4	40,8	1,9	0,3	0,2	7,8	1,1	11,4	45,9	42,7
V1	79	6,5	0,1	0,0	0,2	3,9	31,7	57,0	0,1	0,3	0,2	8,3	0,6	10,7	32,2	57,1
G1	80	15,7	1,9	0,1	0,4	1,6	65,9	13,0	0,8	0,4	0,3	4,6	5,0	17,8	68,5	13,8

Tabla 2.23. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie H2, de la campaña 2005 – 2006.

Serie	RI	Palmitico	Palmitoleico	Margarico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccenico	Linoleico	Linolenico	Araquico	Gadolico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H2	1	11,5	0,9	0,1	0,2	3,3	75,6	6,8	0,7	0,5	0,3	5,5	10,3	15,4	77,0	7,5
H2	2	11,2	1,1	0,1	0,1	3,3	78,3	4,5	0,7	0,4	0,2	5,7	15,3	15,0	79,7	5,2
H2	3	11,4	0,8	0,1	0,1	3,6	71,6	10,6	0,8	0,5	0,3	5,4	6,4	15,6	72,8	11,4
H2	4	10,4	0,8	0,1	0,1	3,6	78,6	4,9	0,6	0,4	0,3	5,9	14,5	14,5	79,8	5,5
H2	5	11,8	1,0	0,1	0,1	3,5	73,9	8,0	0,7	0,4	0,2	5,3	8,6	15,8	75,2	8,7
H2	6	11,6	0,9	0,1	0,2	3,3	74,2	8,1	0,7	0,4	0,3	5,5	8,6	15,4	75,6	8,8
H2	7	11,6	1,1	0,1	0,1	3,3	78,2	4,2	0,6	0,4	0,2	5,5	16,6	15,4	79,6	4,8
H2	8	11,3	1,1	0,1	0,1	3,4	78,2	4,4	0,7	0,4	0,2	5,6	15,6	15,2	79,6	5,1
H2	9	11,9	1,2	0,1	0,1	3,3	76,9	5,0	0,7	0,4	0,2	5,4	13,8	15,7	78,4	5,7
H2	10	11,3	1,1	0,1	0,1	3,5	78,3	4,2	0,7	0,4	0,2	5,5	16,3	15,3	79,7	4,9
H2	11	11,2	1,0	0,1	0,1	3,5	78,2	4,4	0,7	0,4	0,2	5,6	15,6	15,2	79,5	5,1
H2	12	10,6	0,8	0,1	0,2	3,2	74,6	8,8	0,7	0,4	0,3	6,0	8,0	14,3	75,9	9,5
H2	13	10,9	0,9	0,1	0,2	3,3	75,7	7,3	0,8	0,4	0,3	5,8	9,5	14,7	77,1	8,1
H2	14	11,1	1,1	0,1	0,1	3,3	78,6	4,2	0,7	0,4	0,3	5,7	16,4	14,9	80,1	4,9
H2	15	11,2	0,9	0,1	0,2	3,3	75,4	7,3	0,7	0,4	0,3	5,7	9,6	15,0	76,8	8,0

H2	16	11,0	1,0	0,1	0,1	3,6	78,1	4,8	0,6	0,4	0,2	5,6	14,7	15,1	79,4	5,4
H2	17	10,9	1,0	0,1	0,1	3,4	79,0	4,1	0,7	0,4	0,2	5,8	16,7	14,8	80,3	4,8
H2	18	11,3	0,9	0,1	0,1	2,6	74,3	8,9	0,7	0,5	0,4	5,9	7,9	14,5	75,7	9,6
H2	19	10,8	0,8	0,2	0,2	3,1	76,8	6,5	0,7	0,4	0,3	5,9	10,9	14,5	78,1	7,2
H2	20	10,3	0,7	0,2	0,2	3,4	78,0	5,6	0,7	0,4	0,3	6,0	12,6	14,3	79,2	6,3
H2	21	12,0	1,3	0,1	0,1	3,1	76,7	5,2	0,8	0,4	0,2	5,4	13,1	15,6	78,3	6,0
H2	22	9,8	0,7	0,2	0,2	3,5	78,4	5,7	0,7	0,4	0,3	6,2	12,4	13,9	79,6	6,4
H2	23	9,5	0,6	0,2	0,3	3,4	78,2	6,1	0,7	0,5	0,3	6,3	11,7	13,6	79,4	6,8
H2	24	9,3	0,6	0,2	0,3	3,4	78,5	6,0	0,7	0,5	0,3	6,5	11,9	13,4	79,7	6,7
H2	25	9,4	0,6	0,2	0,3	3,5	78,4	6,0	0,7	0,5	0,3	6,4	11,9	13,6	79,6	6,7
H2	26	9,5	0,6	0,2	0,3	3,5	78,4	6,0	0,7	0,5	0,3	6,3	11,9	13,7	79,6	6,7
H2	27	9,9	0,7	0,2	0,3	3,3	78,4	5,8	0,7	0,4	0,3	6,3	12,3	13,8	79,7	6,5
H2	28	10,3	0,6	0,2	0,3	3,5	77,6	5,9	0,7	0,5	0,3	5,9	11,9	14,5	78,8	6,6
H2	29	9,7	0,6	0,2	0,3	3,5	77,5	6,6	0,7	0,5	0,3	6,2	10,8	13,9	78,7	7,3
H2	30	9,2	0,6	0,2	0,2	3,5	78,2	6,6	0,7	0,4	0,3	6,5	10,9	13,3	79,3	7,3
H2	31	10,6	0,8	0,2	0,2	3,4	77,0	6,2	0,7	0,4	0,3	5,8	11,4	14,6	78,3	6,9
H2	32	9,7	0,7	0,1	0,2	3,5	78,9	5,5	0,6	0,4	0,3	6,3	13,1	13,7	80,1	6,1
H2	33	9,7	0,6	0,2	0,3	3,3	78,4	5,9	0,7	0,4	0,3	6,3	12,1	13,6	79,6	6,6
H2	34	9,1	0,6	0,2	0,3	3,5	78,4	6,4	0,7	0,4	0,3	6,6	11,2	13,2	79,6	7,1
H2	35	8,1	0,5	0,2	0,3	3,5	78,0	7,8	0,7	0,5	0,3	7,1	9,3	12,3	79,1	8,5
H2	36	9,1	0,6	0,2	0,3	3,4	78,2	6,6	0,7	0,5	0,3	6,6	10,9	13,2	79,4	7,3
H2	37	9,2	0,6	0,2	0,3	3,4	78,6	6,0	0,7	0,5	0,3	6,5	11,9	13,3	79,8	6,7
H2	38	8,1	0,5	0,2	0,3	3,6	78,8	6,8	0,7	0,5	0,3	7,1	10,7	12,4	79,9	7,5
H2	39	8,4	0,5	0,2	0,3	3,5	79,0	6,6	0,7	0,5	0,3	6,9	11,0	12,6	80,1	7,3
H2	40	8,3	0,5	0,2	0,3	3,5	78,3	7,3	0,7	0,5	0,3	7,0	9,9	12,5	79,4	8,0
H2	41	8,4	0,5	0,2	0,3	3,5	78,9	6,7	0,7	0,5	0,3	6,9	10,8	12,6	80,0	7,4
H2	42	11,6	1,1	0,1	0,1	3,5	77,8	4,4	0,7	0,4	0,3	5,4	15,6	15,6	79,3	5,1

Tabla 2.24. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie A2, de la campaña 2005 – 2006.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Araquico	Gadoléico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
A2	43	11,1	1	0,1	0,1	3,1	80,2	3	0,7	0,4	0,3	5,8	22,1	14,7	81,6	3,7
A2	44	11,7	1,1	0,1	0,1	3,2	78,2	3,9	0,8	0,5	0,2	5,4	16,9	15,5	79,6	4,7
A2	45	11,2	0,9	0,1	0,1	3,2	79,6	3,4	0,8	0,4	0,2	5,7	19,2	14,9	80,8	4,2
A2	46	11,6	1	0,1	0,1	3,1	79,3	3,3	0,8	0,4	0,3	5,6	19,7	15,2	80,7	4,1
A2	47	11	1	0,1	0,1	3,1	79,4	4	0,6	0,3	0,2	5,9	17,5	14,5	80,7	4,6
A2	48	13,1	1,2	0,1	0,1	2	71,9	9,9	0,9	0,4	0,3	5,4	6,8	15,6	73,5	10,8

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

Tabla 2.25. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie G2, de la campaña 2005 – 2006.

Serie	RI	Palmitico	Palmitoleico	Margarico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccenico	Linoleico	Linolenico	Araquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
G2	49	11,6	1,0	0,1	0,1	3,1	79,5	3,0	0,8	0,4	0,3	5,6	21,3	15,2	80,9	3,8
G2	50	14,2	0,9	0,2	0,3	1,6	73,8	7,1	0,7	0,8	0,3	5,0	9,7	16,8	75,3	7,8
G2	51	12,8	0,8	0,2	0,2	4,9	72,0	7,1	0,6	0,8	0,3	4,3	9,5	18,7	73,3	7,7
G2	52	15,3	1,6	0,1	0,3	2,0	68,3	11,0	0,6	0,4	0,3	4,6	6,1	17,8	70,5	11,6
G2	53	14,5	1,8	0,1	0,2	1,8	69,8	10,4	0,5	0,4	0,3	4,9	6,6	16,8	72,1	10,9
G2	54	13,7	1,3	0,1	0,1	2,5	71,4	9,4	0,6	0,4	0,3	5,0	7,3	16,7	73,1	10,0
G2	55	12,8	0,8	0,1	0,1	3,3	72,0	9,2	0,8	0,5	0,3	5,6	21,3	16,7	73,2	10,0
G2	56	12,3	1,1	0,1	0,1	2,3	73,5	8,6	1,1	0,4	0,3	5,0	9,7	15,1	75,0	9,7
G2	57	11,6	0,9	0,1	0,1	2,5	77,4	5,5	0,8	0,5	0,4	4,3	9,5	14,7	78,8	6,3
G2	58	14,1	1,2	0,1	0,3	1,8	70,8	9,8	0,8	0,4	0,4	4,6	6,1	16,4	72,7	10,6
G2	59	12,6	1,1	0,2	0,3	3,3	75,1	5,8	0,6	0,5	0,3	4,9	6,6	16,6	76,8	6,4
G2	60	10,9	0,9	0,1	0,1	4,1	77,5	5,0	0,6	0,4	0,3	5,0	7,3	15,5	78,8	5,6
G2	63	10,8	0,8	0,1	0,2	3,0	79,7	3,9	0,7	0,4	0,3	5,9	17,6	14,3	81,0	4,6

Tabla 2.26. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie correspondiente a aceites comerciales, de la campaña 2005 – 2006.

Serie	RI	Palmitico	Palmitoleico	Margarico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccenico	Linoleico	Linolenico	Araquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
B2	61	13,3	0,8	0,1	0,1	4,8	53,0	25,9	1,1	0,6	0,2	4,3	2,0	18,8	54,1	27,0
C2	62	15,7	1,9	0,1	0,3	1,9	67,9	10,7	0,7	0,4	0,3	4,5	6,2	18,1	70,4	11,4
C2	63	9,9	0,7	0,2	0,3	3,3	78,0	6,0	0,7	0,5	0,3	6,2	11,8	13,9	79,3	6,7
B2	64	11,8	1,0	0,1	0,1	3,2	77,1	5,2	0,7	0,4	0,2	5,4	13,3	15,5	78,4	5,9
C2	65	13,1	1,1	0,1	0,2	3,5	73,9	6,6	0,7	0,5	0,2	4,8	10,3	17,2	75,4	7,3
C2	66	11,1	0,9	0,2	0,3	3,5	74,9	7,5	0,7	0,5	0,3	5,5	9,3	14,3	81,0	4,6

Tabla 2.27. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie H3, de la campaña 2006 – 2007.

Serie	RI	Palmitico	Palmitoleico	Margarico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccenico	Linoleico	Linolenico	Aráquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H3	1	12,1	0,9	0,1	0,2	2,7	76,2	6,4	0,7	0,4	0,2	5,5	10,9	15,3	77,5	7,1
H3	2	11,2	1,1	0,1	0,1	3,0	78,5	4,6	0,8	0,4	0,2	5,8	14,8	14,7	79,9	5,4
H3	3	11,5	0,9	0,1	0,1	3,2	73,6	9,1	0,8	0,4	0,2	5,6	7,6	15,2	74,8	9,9
H3	4	10,2	0,7	0,1	0,1	3,5	79,3	4,7	0,6	0,4	0,2	6,0	15,2	14,2	80,3	5,3
H3	5	12,3	1,2	0,1	0,1	2,8	75,1	6,8	0,8	0,4	0,2	5,4	10,1	15,6	76,6	7,6
H3	6	11,6	1,0	0,1	0,1	3,0	74,4	8,2	0,8	0,4	0,3	5,6	8,4	15,1	75,8	9,0
H3	7	10,5	1,0	0,1	0,1	4,0	77,8	5,1	0,7	0,4	0,2	5,7	13,6	15,0	79,1	5,8
H3	8	11,1	1,2	0,1	0,1	3,0	78,6	4,4	0,7	0,4	0,2	5,8	15,7	14,6	80,1	5,1
H3	9	11,3	1,1	0,1	0,1	3,3	78,2	4,5	0,7	0,4	0,2	5,6	15,3	15,1	79,6	5,2
H3	10	11,0	1,2	0,1	0,1	3,2	78,7	4,4	0,7	0,4	0,2	5,8	15,7	14,7	80,2	5,1
H3	11	10,9	1,1	0,1	0,1	3,3	78,9	4,2	0,7	0,4	0,2	5,8	16,4	14,7	80,3	4,9
H3	12	7,8	0,5	0,2	0,2	3,5	76,4	9,7	0,8	0,4	0,3	7,4	7,4	11,9	77,4	10,5
H3	13	10,4	0,9	0,1	0,1	3,0	77,6	6,4	0,7	0,4	0,3	6,2	11,1	13,9	78,9	7,1
H3	14	11,4	1,1	0,1	0,1	3,0	78,9	4,0	0,8	0,3	0,2	5,8	16,7	14,8	80,3	4,8
H3	15	11,4	0,9	0,1	0,2	2,6	76,7	6,7	0,7	0,4	0,3	5,9	10,6	14,5	78,1	7,4
H3	16	10,9	1,0	0,1	0,1	3,9	77,4	5,1	0,8	0,4	0,2	5,5	13,3	15,3	78,7	5,9
H3	17	11,3	1,1	0,1	0,1	3,3	78,8	4,0	0,7	0,4	0,2	5,6	17,1	15,1	80,2	4,7
H3	18	10,4	0,9	0,1	0,1	2,7	75,2	8,8	0,8	0,5	0,4	6,3	8,0	13,7	76,6	9,6
H3	19	9,6	0,6	0,2	0,2	3,3	77,1	7,5	0,7	0,4	0,3	6,4	9,5	13,5	78,2	8,2
H3	20	8,7	0,5	0,2	0,2	3,5	77,2	8,0	0,7	0,4	0,3	6,8	9,0	12,8	78,2	8,7
H3	21	11,5	1,1	0,1	0,1	3,2	77,8	4,8	0,8	0,4	0,2	5,6	14,1	15,2	79,2	5,6
H3	22	8,6	0,5	0,1	0,2	3,7	77,9	7,3	0,7	0,4	0,3	6,8	9,9	12,8	78,9	8,0
H3	23	8,3	0,5	0,2	0,2	3,5	77,4	8,2	0,7	0,4	0,3	7,0	8,8	12,4	78,4	8,9
H3	24	9,4	0,7	0,1	0,2	3,4	77,4	7,3	0,7	0,4	0,3	6,5	9,8	13,3	78,6	8,0
H3	25	9,5	0,6	0,1	0,2	3,5	78,1	6,3	0,7	0,4	0,3	6,4	11,3	13,5	79,2	7,0
H3	26	9,8	0,6	0,1	0,2	3,3	77,2	7,1	0,8	0,4	0,3	6,3	9,9	13,6	78,3	7,9
H3	27	9,3	0,6	0,2	0,2	3,3	76,3	8,4	0,7	0,4	0,3	6,6	8,5	13,2	77,4	9,1
H3	28	9,2	0,6	0,2	0,2	3,5	77,8	7,0	0,7	0,4	0,3	6,5	10,3	13,3	78,9	7,7
H3	29	9,7	0,7	0,1	0,2	3,1	76,0	8,7	0,7	0,4	0,3	6,5	8,2	13,3	77,2	9,4
H3	30	7,9	0,5	0,2	0,2	3,7	78,5	7,4	0,7	0,4	0,3	7,2	9,8	12,2	79,5	8,1
H3	31	10,1	0,7	0,1	0,2	3,5	76,9	6,9	0,7	0,4	0,3	6,1	10,3	14,1	78,1	7,6
H3	32	9,3	0,6	0,1	0,2	3,4	78,0	6,9	0,7	0,4	0,3	6,6	10,4	13,2	79,1	7,6
H3	33	7,9	0,5	0,2	0,2	3,6	77,6	8,4	0,7	0,4	0,3	7,3	8,6	12,1	78,6	9,1
H3	34	8,5	0,6	0,1	0,2	3,4	77,6	8,1	0,7	0,4	0,3	7,1	8,9	12,4	78,7	8,8
H3	35	8,4	0,6	0,2	0,2	3,4	77,5	8,1	0,7	0,4	0,3	7,1	8,9	12,4	78,6	8,8
H3	36	9,7	0,7	0,1	0,2	3,7	76,1	7,7	0,9	0,4	0,3	6,2	9,0	13,9	77,3	8,6
H3	37	8,2	0,6	0,2	0,3	3,6	77,8	7,7	0,7	0,4	0,3	7,1	9,4	12,4	79,0	8,4

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

H3	38	8,1	0,5	0,2	0,3	3,6	77,8	7,8	0,7	0,4	0,3	7,1	9,3	12,3	78,9	8,5
H3	39	7,7	0,5	0,2	0,3	3,7	77,4	8,6	0,7	0,4	0,3	7,3	8,4	12,0	78,5	9,3
H3	40	8,5	0,5	0,2	0,2	3,6	77,4	8,0	0,7	0,4	0,3	6,9	9,0	12,7	78,4	8,7
H3	41	8,2	0,6	0,2	0,2	3,6	77,2	8,3	0,7	0,4	0,3	7,0	8,7	12,4	78,3	9,0
H3	42	10,8	0,8	0,1	0,1	3,3	78,8	4,6	0,7	0,4	0,2	5,8	15,1	14,6	79,9	5,3
H3	43	8,6	0,5	0,2	0,2	3,5	77,2	8,2	0,7	0,4	0,3	6,9	8,8	12,7	78,2	8,9
H3	44	8,6	0,6	0,2	0,3	3,5	76,9	8,4	0,7	0,4	0,3	6,9	8,6	12,7	78,1	9,1
H3	45	10,8	0,9	0,1	0,1	3,2	77,6	5,9	0,7	0,4	0,2	5,9	11,9	14,5	78,8	6,6
H3	46	12,8	1,1	0,2	0,3	2,8	69,6	11,5	0,8	0,4	0,3	5,2	5,8	16,2	71,3	12,3

Tabla 2.28. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie A3, de la campaña 2006 – 2007.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Aráquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
A3	47	10,2	0,8	0,1	0,2	3,4	80,4	3,9	0,5	0,3	0,2	6,1	18,5	14,0	81,4	4,4
A3	48	12,6	1,5	0,1	0,1	3,5	74,0	6,9	0,8	0,4	0,2	5,0	9,8	16,6	75,8	7,7
A3	50	11,2	1,0	0,1	0,1	4,2	76,5	5,6	0,6	0,4	0,2	5,3	12,6	15,9	77,8	6,2
A3	51	11,1	1,1	0,1	0,1	5,4	73,4	7,4	0,7	0,4	0,2	4,9	9,2	17,0	74,8	8,1
A3	52	10,5	1,0	0,1	0,1	4,2	77,3	5,4	0,8	0,4	0,2	5,6	12,7	15,2	78,6	6,2
A3	53	13,1	1,1	0,1	0,1	5,1	69,5	9,6	0,7	0,4	0,2	4,3	6,9	18,7	70,9	10,3

Tabla 2.29. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie B3, de la campaña 2006 – 2007.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Aráquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
B3-S	54	12,6	0,8	0,1	0,1	4,4	60,3	19,9	1,0	0,5	0,2	4,7	2,9	17,6	61,4	20,9
B3-R	55	11,5	0,2	0,1	0,1	1,7	79,7	3,5	0,7	0,3	0,2	6,2	19,1	13,6	80,2	4,2

S=Secano; R=Regadío

Tabla 2.30. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de las series G3 y GT3, de la campaña 2006 – 2007.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Aráquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
GT3	56	13,9	1,4	0,1	0,2	1,9	70,6	10,3	0,7	0,4	0,3	5,1	6,6	16,3	72,5	11,0
GT3	57	11,3	0,8	0,1	0,2	3,1	73,2	9,5	1,0	0,4	0,3	5,7	7,1	14,9	74,5	10,5
GT3-S	58	11,3	0,8	0,1	0,2	3,4	71,5	10,9	0,9	0,4	0,3	5,6	6,2	15,2	72,8	11,8
GT3-R	59	12,7	1,3	0,1	0,1	3,3	75,6	5,5	0,8	0,4	0,2	5,1	12,3	16,5	77,2	6,3

Capítulo 2

GT3-S	60	11,9	1,1	0,1	0,1	3,0	78,5	3,9	0,7	0,4	0,2	5,5	17,4	15,4	79,9	4,6
G3-R	61	15,4	1,8	0,1	0,2	2,0	67,0	12,1	0,6	0,3	0,3	4,6	5,5	17,8	69,3	12,7
G3	62	10,7	1,2	0,1	0,1	3,1	79,0	4,6	0,7	0,3	0,2	6,0	15,2	14,2	80,5	5,3

Tabla 2.31. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie H4, de la campaña 2007 – 2008.

Serie	RI	Palmitico	Palmitoleico	Margarico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccenico	Linoleico	Linolenico	Araquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H4	1	11,6	0,8	0,1	0,2	2,8	76,9	6,2	0,7	0,4	0,3	5,7	11,3	14,9	78,2	6,9
H4	2	12,2	0,8	0,2	0,2	3,5	76,9	5,1	0,6	0,3	0,2	5,2	13,7	16,2	78,1	5,7
H4	3	10,9	0,7	0,1	0,1	3,4	74,5	8,9	0,7	0,4	0,3	5,8	7,9	14,8	75,6	9,6
H4	4	8,8	0,7	0,1	0,2	3,6	78,8	6,4	0,7	0,4	0,3	6,8	11,3	12,9	80,0	7,1
H4	5	11,4	0,8	0,1	0,1	3,2	75,8	7,2	0,7	0,4	0,3	5,6	9,7	15,1	77,0	7,9
H4	6	10,8	0,7	0,1	0,1	3,3	75,8	7,8	0,7	0,4	0,2	5,8	9,0	14,6	76,8	8,5
H4	7	11,8	1,0	0,1	0,2	3,6	76,9	4,9	0,6	0,4	0,2	5,3	14,2	15,9	78,3	5,5
H4	8	10,9	0,8	0,1	0,2	4,3	75,6	6,7	0,7	0,4	0,2	5,4	10,4	15,7	76,8	7,4
H4	9	10,5	1,0	0,1	0,1	3,5	77,9	5,6	0,7	0,3	0,2	5,9	12,6	14,4	79,2	6,3
H4	10	11,3	0,9	0,1	0,0	4,1	76,5	5,8	0,7	0,4	0,2	5,3	11,9	15,9	77,6	6,5
H4	11	9,9	0,8	0,2	0,1	3,8	77,9	5,8	0,7	0,4	0,2	6,0	12,2	14,3	79,0	6,5
H4	12	8,9	0,6	0,2	0,2	3,4	75,2	10,1	0,7	0,4	0,3	6,8	7,1	12,9	76,3	10,8
H4	13	10,6	0,7	0,1	0,1	3,3	76,7	7,1	0,7	0,4	0,3	5,9	10,0	14,4	77,8	7,8
H4	14	12,2	1,0	0,0	0,1	3,4	76,8	5,3	0,7	0,3	0,2	5,3	13,0	15,9	78,1	6,0
H4	15	11,3	0,8	0,1	0,1	2,7	77,8	5,9	0,7	0,3	0,3	5,9	12,0	14,4	79,0	6,6
H4	16	9,9	0,8	0,2	0,1	3,8	77,4	6,5	0,7	0,4	0,2	6,0	10,9	14,3	78,5	7,2
H4	17	12,7	0,9	0,1	0,1	3,6	76,4	4,9	0,6	0,4	0,2	4,9	14,1	16,8	77,6	5,5
H4	18	9,6	0,8	0,2	0,2	3,2	75,9	8,8	0,7	0,4	0,1	6,5	8,1	13,4	77,0	9,5
H4	19	8,9	0,5	0,2	0,2	3,9	77,9	7,0	0,7	0,4	0,3	6,5	10,2	13,4	78,9	7,7
H4	20	8,7	0,8	0,2	0,2	3,2	78,1	7,2	0,7	0,4	0,3	7,0	10,1	12,5	79,4	7,9
H4	21	10,9	0,8	0,1	0,1	3,8	77,1	5,9	0,7	0,4	0,2	5,6	11,8	15,2	78,2	6,6
H4	22	6,9	0,4	0,2	0,2	3,7	78,4	8,9	0,6	0,4	0,3	7,9	8,3	11,2	79,3	9,5
H4	23	7,9	0,5	0,2	0,3	3,5	77,9	8,3	0,7	0,4	0,3	7,3	8,8	12,0	79,0	9,0
H4	24	7,9	0,4	0,2	0,3	3,7	77,9	8,2	0,7	0,4	0,3	7,2	8,9	12,2	78,9	8,9
H4	25	8,1	0,5	0,2	0,2	3,8	78,4	7,4	0,7	0,4	0,3	7,0	9,8	12,5	79,4	8,1
H4	26	8,2	0,4	0,2	0,2	3,4	78,9	7,3	0,7	0,4	0,3	7,2	10,0	12,2	79,8	8,0
H4	27	8,8	0,7	0,2	0,3	3,3	78,2	6,9	0,7	0,4	0,3	6,9	10,5	12,7	79,5	7,6
H4	28	7,9	0,8	0,2	0,3	3,5	78,4	7,4	0,7	0,4	0,3	7,3	9,9	12,0	79,8	8,1
H4	29	8,3	0,7	0,2	0,2	3,4	78,6	7,1	0,6	0,4	0,3	7,1	10,4	12,3	79,8	7,7
H4	30	7,9	0,4	0,2	0,3	3,7	78,7	7,5	0,6	0,4	0,3	7,2	9,8	12,2	79,7	8,1
H4	31	9,1	0,5	0,2	0,2	3,6	77,9	7,1	0,7	0,4	0,3	6,5	10,1	13,3	78,9	7,8
H4	32	9,1	0,5	0,1	0,1	3,3	80,9	4,7	0,6	0,4	0,3	6,8	15,4	12,9	81,8	5,3

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

H4	33	6,9	0,6	0,2	0,3	3,6	77,9	8,9	0,7	0,4	0,3	8,0	8,2	11,1	79,1	9,6
H4	34	6,9	0,5	0,2	0,3	3,7	78,3	8,6	0,6	0,4	0,3	7,9	8,6	11,2	79,4	9,2
H4	35	9,6	0,5	0,1	0,2	3,5	76,2	8,4	0,7	0,4	0,3	6,3	8,5	13,6	77,2	9,1
H4	36	10,9	0,8	0,1	0,2	3,2	75,9	7,5	0,7	0,4	0,3	5,8	9,4	14,6	77,2	8,2
H4	37	7,8	0,7	0,2	0,3	3,9	76,4	9,2	0,7	0,4	0,3	7,1	7,8	12,3	77,7	9,9
H4	38	7,8	0,5	0,2	0,3	3,8	77,8	8,2	0,7	0,4	0,3	7,2	8,9	12,2	78,9	8,9
H4	39	7,6	0,5	0,2	0,3	3,6	78,5	7,8	0,7	0,4	0,3	7,5	9,4	11,8	79,6	8,5
H4	40	8,8	0,5	0,2	0,3	3,5	76,9	8,3	0,7	0,4	0,3	6,7	8,7	12,9	78,0	9,0
H4	41	8,6	0,7	0,2	0,3	3,3	76,9	8,5	0,6	0,4	0,3	7,0	8,6	12,5	78,2	9,1
H4	42	8,9	0,5	0,2	0,3	3,5	76,9	8,3	0,7	0,4	0,3	6,7	8,7	13,0	78,0	9,0
H4	43	8,7	0,5	0,2	0,2	3,6	77,3	8,0	0,6	0,4	0,3	6,7	9,1	12,9	78,3	8,6
H4	44	8,7	0,5	0,2	0,3	3,6	76,9	8,4	0,7	0,4	0,3	6,8	8,6	12,9	78,0	9,1
H4	45	9,8	0,9	0,2	0,1	3,8	77,8	5,9	0,7	0,4	0,2	6,0	12,0	14,2	79,0	6,6
H4	46	12,9	1,0	0,2	0,4	2,8	70,9	10,3	0,7	0,4	0,3	5,1	6,6	16,3	72,6	11,0
H4	47	10,9	0,9	0,2	0,3	3,9	76,9	5,5	0,7	0,4	0,2	5,5	12,6	15,4	78,3	6,2

Tabla 2.32. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de germoplasma (G4 y GT4), de la campaña 2007 – 2008.

Serie	RI	Palmitico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolenico	Aráquico	Gadoléico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
G4	1	16,0	2,1	0,1	0,2	3,1	67,8	9,3	0,7	0,4	0,2	4,1	7,0	19,6	70,3	10,0
G4	2	15,6	2,3	0,1	0,1	2,2	72,2	6,0	1,0	0,3	0,2	4,5	10,7	18,2	74,8	7,0
G4	3	15,1	1,8	0,1	0,1	1,9	66,0	13,7	0,7	0,3	0,2	4,7	4,7	17,4	68,1	14,4
G4	4	15,5	1,0	0,1	0,1	4,6	65,7	11,3	0,6	0,6	0,2	3,8	5,6	20,8	67,0	11,9
G4	5	12,3	0,8	0,1	0,2	2,9	69,1	12,7	1,1	0,4	0,3	5,4	5,1	15,7	70,4	13,8
G4	6	17,9	3,3	0,1	0,2	1,5	59,3	16,4	0,7	0,3	0,2	4,1	3,7	19,8	63,0	17,1
G4	7	11,6	0,8	0,1	0,1	2,8	76,5	6,6	0,7	0,5	0,3	5,7	10,6	15,0	77,7	7,3
G4	8	13,5	0,9	0,1	0,2	4,5	69,9	9,1	0,7	0,6	0,3	4,3	7,3	18,7	71,3	9,8
GT4-S	9	7,2	0,6	0,1	0,3	2,9	79,0	8,0	0,8	0,4	0,3	8,4	9,1	10,6	80,2	8,8
GT4-R	10	12,0	2,5	0,1	0,3	1,7	69,2	12,7	0,6	0,4	0,3	6,0	5,4	14,2	72,3	13,3
GT4-R	11	10,6	0,8	0,1	0,1	3,7	79,2	4,1	0,6	0,4	0,2	5,7	17,1	14,8	80,3	4,7
GT4-S	12	14,2	1,9	0,2	0,3	2,2	68,6	11,2	0,6	0,4	0,3	4,9	6,0	17,0	71,1	11,8
GT4-S	13	11,6	1,1	0,1	0,1	3,0	78,0	4,8	0,6	0,4	0,2	5,6	14,7	15,1	79,4	5,4
GT4-S	14	12,0	1,4	0,2	0,3	2,2	70,9	11,5	0,6	0,4	0,3	5,7	6,0	14,8	72,9	12,1
GT4-R	15	13,3	1,7	0,2	0,3	2,1	69,1	11,9	0,6	0,4	0,3	5,2	5,7	16,0	71,4	12,5
GT4-S	16	14,4	1,9	0,2	0,3	2,2	68,4	11,2	0,6	0,4	0,3	4,8	6,0	17,2	70,9	11,8
GT4-S	17	10,9	1,5	0,1	0,1	2,3	72,6	10,9	0,6	0,4	0,3	6,3	6,5	13,7	74,5	11,5
GT4-R	18	11,7	1,6	0,1	0,2	2,1	71,4	11,5	0,5	0,4	0,3	6,0	6,1	14,3	73,5	12,0
GT4-R	19	11,8	1,4	0,1	0,2	2,3	71,8	10,8	0,6	0,5	0,3	5,8	6,5	14,7	73,7	11,4

S= Secano; R= Regadío

Tabla 2.33. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras correspondientes a Denominación de Origen (DO4), de la campaña 2007 – 2008.

Serie**	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Aráquico	Gadoléico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
DO4	1	13,8	1,5	0,1	0,3	2,7	70,7	9,5	0,6	0,4	0,3	4,9	7,2	17,0	72,8	10,1
DO4	2	11,2	0,9	0,2	0,2	3,6	74,1	8,3	0,8	0,5	0,3	5,5	8,3	15,5	75,5	9,1
DO4	3	12,0	1,1	0,2	0,3	3,3	73,3	8,3	0,7	0,5	0,3	5,3	8,3	16,0	75,0	9,0
DO4	4	15,5	1,9	0,1	0,2	1,8	65,9	13,0	0,6	0,4	0,3	4,6	5,0	17,8	68,3	13,6
DO4	14	9,6	0,7	0,1	0,1	2,5	79,5	5,9	0,9	0,3	0,3	7,0	11,9	12,5	80,6	6,8
DO4	15	10,0	0,8	0,1	0,1	3,7	80,0	4,2	0,6	0,4	0,2	6,1	16,9	14,2	81,1	4,8
DO4	16	9,8	0,6	0,2	0,2	3,1	78,5	6,1	0,7	0,4	0,3	6,4	11,7	13,5	79,6	6,8
DO4	17	13,0	1,2	0,1	0,1	2,1	72,5	9,5	0,8	0,4	0,3	5,4	7,2	15,6	74,1	10,3
DO4	18	11,4	0,8	0,1	0,2	2,6	76,4	6,9	0,8	0,4	0,3	5,9	10,1	14,5	77,7	7,7
DO4	19	9,8	0,5	0,2	0,3	2,7	72,7	12,4	0,8	0,3	0,3	6,7	5,6	13,0	73,8	13,2
DO4	20	11,5	0,9	0,1	0,1	2,6	72,1	11,1	0,8	0,4	0,3	5,8	6,2	14,6	73,4	11,9
DO4	21	10,7	0,9	0,1	0,1	3,2	77,5	6,2	0,6	0,4	0,2	5,9	11,6	14,4	78,7	6,8
DO4	22	12,6	1,1	0,1	0,1	2,3	72,0	10,2	0,8	0,4	0,3	5,5	6,7	15,4	73,5	11,0
DO4	23	9,6	0,7	0,1	0,2	3,3	74,3	10,2	0,7	0,4	0,3	6,5	6,9	13,4	75,5	10,9
DO4	24	9,2	0,6	0,1	0,1	3,1	80,8	4,9	0,6	0,4	0,2	6,8	14,9	12,8	81,7	5,5
DO4	25	12,0	1,2	0,1	0,1	3,3	75,8	6,0	0,7	0,4	0,3	5,3	11,6	15,8	77,4	6,7
DO4	26	11,4	1,0	0,1	0,1	3,9	75,4	6,7	0,7	0,4	0,2	5,3	10,4	15,8	76,7	7,4

Tabla 2.34. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie H5, de la campaña 2008 – 2009.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Aráquico	Gadoléico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H5	1	9,9	0,7	0,1	0,2	2,6	79,0	6,1	0,7	0,4	0,3	6,7	11,8	13,0	80,2	6,8
H5	2	10,9	0,9	0,2	0,1	3,5	77,3	5,6	0,7	0,4	0,3	5,7	12,5	15,0	78,6	6,3
H5	3	11,1	0,7	0,1	0,1	3,2	76,3	7,1	0,7	0,4	0,3	5,8	9,9	14,8	77,4	7,8
H5	4	9,8	0,8	0,2	0,2	3,6	78,3	5,7	0,7	0,4	0,2	6,1	12,4	14,0	79,5	6,4
H5	5	10,8	0,8	0,1	0,1	2,7	77,9	6,4	0,7	0,3	0,2	6,2	11,1	13,9	79,0	7,1
H5	6	11,6	0,9	0,2	0,2	2,7	77,1	5,9	0,7	0,4	0,3	5,7	11,9	14,9	78,5	6,6
H5	7	10,7	0,9	0,1	0,2	3,6	78,9	4,4	0,6	0,4	0,2	5,8	16,0	14,8	80,2	5,0
H5	8	10,8	0,9	0,1	0,1	3,8	76,9	5,9	0,7	0,4	0,3	5,6	11,8	15,1	78,2	6,6
H5	9	10,9	1,0	0,1	0,1	3,3	77,5	5,6	0,7	0,4	0,3	5,8	12,5	14,7	78,9	6,3
H5	10	9,9	0,8	0,0	0,1	3,1	80,3	4,5	0,7	0,4	0,2	6,5	15,7	13,4	81,4	5,2
H5	11	10,4	1,0	0,1	0,1	3,3	79,2	4,6	0,7	0,4	0,2	6,0	15,2	14,2	80,5	5,3
H5	12	7,9	0,5	0,2	0,2	3,1	78,9	7,8	0,7	0,4	0,3	7,6	9,4	11,6	79,9	8,5

*Identificación de las muestras y resultados obtenidos por
cromatografía de gases como técnica de referencia*

H5	13	10,2	0,8	0,1	0,1	2,6	79,1	5,7	0,7	0,4	0,3	6,5	12,5	13,3	80,3	6,4
H5	14	10,3	1,0	0,0	0,1	2,9	80,9	3,5	0,7	0,4	0,2	6,4	19,6	13,6	82,2	4,2
H5	15	10,1	0,8	0,1	0,2	2,4	79,5	5,5	0,7	0,4	0,3	6,7	13,0	13,0	80,8	6,2
H5	16	9,7	0,9	0,2	0,1	3,9	78,3	5,6	0,7	0,4	0,2	6,0	12,6	14,2	79,5	6,3
H5	17	10,7	0,9	0,1	0,1	3,7	78,9	4,3	0,7	0,4	0,2	5,7	16,0	14,9	80,1	5,0
H5	18	11,1	0,9	0,1	0,2	2,8	73,9	9,3	0,7	0,5	0,4	5,9	7,5	14,5	75,4	10,0
H5	19	8,9	0,5	0,2	0,3	3,5	78,7	6,5	0,7	0,4	0,3	6,7	11,1	13,0	79,8	7,2
H5	20	9,0	0,6	0,2	0,3	3,6	78,5	6,3	0,8	0,4	0,3	6,6	11,2	13,2	79,7	7,1
H5	21	10,4	1,0	0,1	0,1	2,9	79,8	4,4	0,7	0,4	0,2	6,2	15,9	13,8	81,1	5,1
H5	22	9,9	0,7	0,1	0,1	3,3	79,7	4,8	0,7	0,4	0,3	6,3	14,7	13,7	80,8	5,5
H5	23	9,9	0,6	0,2	0,3	3,1	78,1	6,3	0,8	0,4	0,3	6,4	11,2	13,6	79,3	7,1
H5	24	9,8	0,7	0,1	0,2	3,1	79,2	5,5	0,7	0,4	0,3	6,5	13,0	13,4	80,4	6,2
H5	25	9,2	0,6	0,2	0,2	3,2	78,6	6,6	0,7	0,4	0,3	6,7	10,9	13,0	79,7	7,3
H5	26	8,9	0,6	0,2	0,3	3,7	78,5	6,4	0,7	0,4	0,3	6,6	11,2	13,2	79,7	7,1
H5	27	11,9	0,8	0,3	0,2	2,9	75,6	6,6	0,8	0,4	0,3	5,4	10,4	15,5	76,9	7,4
H5	28	9,8	0,8	0,2	0,3	3,5	77,9	5,9	0,8	0,4	0,3	6,2	11,8	13,9	79,3	6,7
H5	29	8,9	0,7	0,2	0,2	3,3	78,8	6,4	0,7	0,4	0,3	6,8	11,3	12,8	80,0	7,1
H5	30	8,6	0,5	0,2	0,2	3,1	79,9	6,1	0,7	0,4	0,3	7,1	11,9	12,3	80,9	6,8
H5	31	10,8	0,8	0,1	0,1	3,2	77,7	5,9	0,7	0,4	0,3	5,9	12,0	14,5	78,9	6,6
H5	32	9,3	0,5	0,1	0,2	3,1	80,5	4,9	0,7	0,4	0,3	6,8	14,6	12,9	81,5	5,6
H5	33	8,5	0,6	0,2	0,2	3,4	79,3	6,4	0,7	0,4	0,3	7,0	11,3	12,5	80,4	7,1
H5	34	8,9	0,6	0,2	0,2	3,4	79,9	5,3	0,6	0,4	0,3	6,7	13,7	12,9	81,0	5,9
H5	35	9,3	0,6	0,2	0,3	3,3	77,9	6,9	0,7	0,4	0,3	6,6	10,4	13,2	79,1	7,6
H5	36	9,6	0,6	0,2	0,2	3,4	77,8	6,8	0,7	0,4	0,3	6,4	10,5	13,6	78,9	7,5
H5	37	8,8	0,6	0,2	0,2	3,6	78,4	6,7	0,7	0,4	0,3	6,7	10,7	13,0	79,5	7,4
H5	38	8,4	0,5	0,2	0,2	3,5	79,7	5,9	0,7	0,4	0,3	7,0	12,2	12,5	80,7	6,6
H5	39	7,9	0,5	0,2	0,2	3,5	79,8	6,4	0,7	0,4	0,3	7,3	11,4	12,0	80,8	7,1
H5	40	7,9	0,5	0,2	0,3	3,6	78,5	7,6	0,7	0,4	0,3	7,3	9,6	12,1	79,6	8,3
H5	41	7,6	0,5	0,2	0,3	3,5	78,7	7,8	0,7	0,4	0,3	7,5	9,4	11,7	79,8	8,5
H5	42	9,9	0,7	0,1	0,2	3,4	78,8	5,5	0,7	0,4	0,3	6,2	12,9	13,8	80,0	6,2
H5	43	8,5	0,5	0,2	0,3	3,8	78,6	6,6	0,7	0,4	0,3	6,7	10,9	12,9	79,7	7,3
H5	44	8,8	0,5	0,2	0,3	3,3	78,6	6,9	0,7	0,4	0,3	6,9	10,5	12,7	79,7	7,6
H5	45	8,6	0,5	0,2	0,3	3,7	78,8	6,5	0,7	0,4	0,3	6,8	11,1	12,9	79,9	7,2
H5	46	8,8	0,6	0,2	0,2	3,8	77,6	7,4	0,4	0,7	0,3	6,4	10,1	13,5	78,7	7,8
H5	47	10,3	1,0	0,1	0,1	3,4	77,5	6,2	0,7	0,4	0,3	6,0	11,4	14,2	78,9	6,9

Tabla 2.35. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie DO5, de la campaña 2008 – 2009.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Aráquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
DO5	1	13,5	1,3	0,2	0,3	2,8	71,4	9,1	0,7	0,4	0,3	4,9	7,5	16,9	73,3	9,8
DO5	2	11,0	0,9	0,3	0,3	3,5	75,9	6,6	0,7	0,5	0,3	5,5	10,6	15,3	77,4	7,3
DO5	3	12,9	1,3	0,3	0,4	3,0	72,1	8,3	0,8	0,5	0,4	5,0	8,2	16,7	74,2	9,1
DO5	4	15,7	1,7	0,3	0,4	1,9	67,2	11,3	0,7	0,4	0,4	4,5	5,8	18,3	69,7	12,0
DO5	14	9,6	0,9	0,1	0,2	2,7	79,3	5,4	0,9	0,5	0,4	6,8	12,8	12,9	80,8	6,3
DO5	15	9,1	0,9	0,1	0,2	2,9	81,6	3,7	0,7	0,5	0,3	6,9	18,9	12,6	83,0	4,4
DO5	16	9,5	0,8	0,3	0,4	3,4	77,9	5,9	0,9	0,5	0,4	6,3	11,7	13,7	79,5	6,8
DO5	17	12,8	1,6	0,3	0,3	2,1	72,3	9,1	0,9	0,3	0,3	5,5	7,5	15,5	74,5	10,0
DO5	18	10,9	0,9	0,3	0,4	2,9	75,7	7,1	0,9	0,5	0,4	5,8	9,7	14,6	77,4	8,0
DO5	19	9,9	0,6	0,2	0,3	2,6	74,7	10,3	0,8	0,3	0,3	6,7	6,8	13,0	75,9	11,1
DO5	20	10,2	0,9	0,2	0,3	2,6	74,2	9,9	0,9	0,5	0,3	6,4	7,0	13,5	75,7	10,8
DO5	21	9,9	0,8	0,2	0,2	2,9	80,7	4,1	0,6	0,4	0,2	6,5	17,4	13,4	81,9	4,7
DO5	23	7,6	0,7	0,3	0,3	3,3	77,9	8,5	0,8	0,5	0,1	7,5	8,5	11,7	79,0	9,3
DO5	24	9,4	0,7	0,2	0,2	3,3	80,5	4,5	0,6	0,4	0,2	6,5	16,0	13,3	81,6	5,1
DO5	27	9,9	0,9	0,1	0,2	2,9	78,6	5,9	0,8	0,4	0,3	6,5	11,9	13,3	80,0	6,7
DO5	28	9,2	0,8	0,2	0,1	2,7	81,9	3,8	0,7	0,4	0,2	7,0	18,4	12,5	83,0	4,5
DO5	29	9,5	0,8	0,1	0,2	2,9	78,9	5,9	0,8	0,5	0,4	6,7	12,0	13,0	80,3	6,7
DO5	30	9,6	0,8	0,1	0,2	2,9	78,5	6,4	0,8	0,4	0,3	6,7	11,1	13,0	79,8	7,2
DO5	31	9,9	0,8	0,1	0,2	2,9	77,8	6,8	0,7	0,4	0,3	6,5	10,5	13,3	79,1	7,5
DO5	32	9,9	0,9	0,1	0,2	2,9	78,4	6,2	0,7	0,4	0,3	6,5	11,6	13,3	79,8	6,9

Tabla 2.36. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie G5, de la campaña 2008 – 2009.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Aráquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
G5	1	12,9	1,5	0,2	0,3	3,9	71,8	7,6	0,8	0,5	0,3	4,7	8,8	17,5	73,9	8,4
G5	2	12,7	1,5	0,2	0,1	2,9	77,4	3,8	0,8	0,3	0,3	5,2	17,2	16,1	79,3	4,6
G5	3	14,8	2,0	0,1	0,1	2,1	66,3	13,2	0,7	0,3	0,3	4,8	4,9	17,3	68,7	13,9
G5	4	14,3	1,5	0,2	0,2	3,5	68,8	9,9	0,7	0,4	0,3	4,4	6,7	18,4	70,8	10,6
G5	5	14,9	1,3	0,2	0,3	2,6	64,9	13,5	1,5	0,4	0,3	4,5	4,5	18,1	66,8	15,0
G5	6	16,7	2,6	0,1	0,2	1,7	62,4	14,9	0,7	0,3	0,2	4,3	4,2	18,8	65,4	15,6
G5	7	17,5	2,1	0,1	0,2	1,9	60,3	15,8	1,4	0,3	0,3	4,0	3,7	19,8	62,9	17,2
G5	8	12,6	0,9	0,1	0,2	4,6	70,6	9,3	0,6	0,6	0,3	4,6	7,3	17,9	72,0	9,9
G5	9	12,2	0,8	0,1	0,7	2,5	74,7	7,4	0,8	0,4	0,3	5,6	9,3	15,2	76,5	8,2

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

Tabla 2.37. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie H6, de la campaña 2009 – 2010.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Aráquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H6	1	12,7	0,9	0,2	0,3	2,9	73,6	7,8	0,8	0,5	0,3	5,1	8,7	16,3	75,1	8,6
H6	3	12,2	1,1	0,3	0,2	3,5	70,7	10,2	0,9	0,6	0,3	5,0	6,5	16,6	72,3	11,1
H6	10	11,5	1,1	0,1	0,3	3,8	75,5	5,9	0,9	0,6	0,3	5,3	11,4	16,0	77,2	6,8
H6	14	12,2	1,1	0,1	0,2	3,4	77,6	4,1	0,7	0,4	0,2	5,2	16,5	16,1	79,1	4,8
H6	15	11,9	0,9	0,1	0,2	3,0	75,6	7,0	0,7	0,4	0,2	5,5	10,0	15,4	76,9	7,7
H6	19	11,2	0,9	0,1	0,2	3,6	78,6	4,1	0,7	0,4	0,2	5,5	16,6	15,3	79,9	4,8
H6	21	12,8	1,1	0,1	0,1	3,2	76,2	5,2	0,7	0,4	0,2	5,1	13,2	16,5	77,6	5,9
H6	22	9,9	0,7	0,1	0,2	3,3	78,2	6,2	0,7	0,4	0,3	6,3	11,5	13,7	79,4	6,9
H6	23	9,9	0,6	0,2	0,3	3,3	76,9	7,3	0,8	0,4	0,3	6,2	9,6	13,8	78,1	8,1
H6	24	10,6	0,7	0,1	0,2	3,5	77,3	6,2	0,7	0,4	0,3	5,8	11,4	14,6	78,5	6,9
H6	25	9,9	0,6	0,2	0,2	3,6	77,6	6,5	0,7	0,4	0,3	6,1	10,9	14,1	78,7	7,2
H6	26	8,9	0,6	0,2	0,3	3,6	77,8	7,2	0,7	0,5	0,2	6,6	10,0	13,2	78,9	7,9

Tabla 2.38. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie DO6, de la campaña 2009 – 2010.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Aráquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
DO6	1	11,5	0,8	0,1	0,2	2,8	77,6	5,6	0,7	0,4	0,3	5,8	12,5	14,8	78,9	6,3
DO6	2	11,3	0,7	0,2	0,2	3,2	75,2	7,8	0,7	0,4	0,3	5,6	9,0	15,1	76,4	8,5
DO6	3	12,6	1,1	0,1	0,2	2,9	72,4	9,3	0,7	0,4	0,3	5,3	7,4	16,0	74,0	10,0
DO6	4	15,6	1,7	0,1	0,2	1,9	65,7	13,5	0,6	0,4	0,3	4,6	4,8	18,0	67,9	14,1
DO6	5	11,5	0,8	0,1	0,2	3,1	75,7	7,2	0,7	0,4	0,3	5,6	9,7	15,1	77,0	7,9
DO6	10	11,3	1,0	0,0	0,1	3,4	78,5	4,5	0,6	0,4	0,2	5,6	15,6	15,1	79,8	5,1
DO6	11	11,1	0,9	0,0	0,1	3,6	78,5	4,6	0,6	0,4	0,2	5,6	15,3	15,1	79,7	5,2
DO6	12	12,3	1,0	0,1	0,1	2,9	77,1	5,3	0,6	0,4	0,2	5,4	13,3	15,7	78,4	5,9
DO6	13	9,9	0,7	0,0	0,1	3,1	81,1	4,1	0,5	0,3	0,2	6,5	17,8	13,3	82,1	4,6
DO6	14	9,0	0,7	0,0	0,1	2,3	76,7	9,5	1,0	0,3	0,4	7,6	7,4	11,6	77,9	10,5
DO6	15	10,9	0,8	0,0	0,1	3,9	78,3	4,8	0,6	0,4	0,2	5,6	14,7	15,2	79,4	5,4
DO6	16	10,9	0,7	0,1	0,2	2,9	77,1	6,6	0,8	0,4	0,3	6,0	10,6	14,3	78,3	7,4
DO6	17	12,6	1,2	0,1	0,2	2,4	72,9	9,1	0,8	0,4	0,3	5,5	7,5	15,5	74,6	9,9
DO6	18	13,9	1,5	0,0	0,1	2,1	69,1	11,8	0,9	0,3	0,3	5,1	5,6	16,3	71,0	12,7
DO6	20	14,5	1,5	0,0	0,1	1,9	68,2	12,3	0,9	0,3	0,3	5,0	5,3	16,7	70,1	13,2
DO6	21	11,2	1,0	0,1	0,1	2,3	73,5	10,4	0,8	0,3	0,3	6,2	6,7	13,9	74,9	11,2
DO6	22	10,3	0,8	0,1	0,1	3,0	78,6	5,9	0,6	0,4	0,2	6,2	12,3	13,8	79,7	6,5

DO6	23	10,6	0,7	0,1	0,1	3,0	76,1	8,1	0,7	0,3	0,3	6,1	8,8	14,0	77,2	8,8
DO6	24	10,5	0,8	0,1	0,1	3,4	77,7	6,2	0,6	0,4	0,2	5,9	11,6	14,4	78,8	6,8
DO6	27	11,6	0,9	0,1	0,2	3,0	74,9	7,8	0,8	0,4	0,3	5,6	8,9	15,1	76,3	8,6
DO6	28	10,9	0,8	0,1	0,2	3,0	73,9	9,6	0,8	0,4	0,3	5,9	7,2	14,4	75,2	10,4
DO6	29	11,1	0,8	0,1	0,2	3,3	74,9	8,2	0,7	0,4	0,3	5,7	8,6	14,9	76,2	8,9
DO6	31	10,7	0,7	0,1	0,2	3,2	75,1	8,5	0,8	0,4	0,3	5,9	8,2	14,4	76,3	9,3
DO6	33	11,2	0,8	0,0	0,1	3,0	79,1	4,6	0,6	0,4	0,2	5,8	15,4	14,6	80,2	5,2
DO6	34	11,6	0,9	0,0	0,1	2,9	79,3	4,1	0,6	0,3	0,2	5,8	17,1	14,8	80,5	4,7
DO6	35	11,6	1,0	0,0	0,1	2,8	79,1	4,2	0,7	0,3	0,2	5,8	16,4	14,7	80,4	4,9
DO6	36	11,2	0,8	0,0	0,1	3,1	79,6	3,9	0,7	0,4	0,2	5,8	17,5	14,7	80,7	4,6
DO6	37	11,1	0,9	0,0	0,1	3,2	78,8	4,7	0,6	0,4	0,2	5,8	15,1	14,7	80,0	5,3
DO6	38	10,9	0,8	0,0	0,1	2,9	80,2	4,0	0,6	0,3	0,2	6,1	17,7	14,1	81,3	4,6

Tabla 2.39. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie H7, de la campaña 2010 – 2011.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Araquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H7	1	10,9	0,8	0,2	0,3	2,9	76,9	6,5	0,7	0,4	0,3	5,9	10,9	14,4	78,3	7,2
H7	3	10,7	0,8	0,1	0,1	3,6	74,9	8,4	0,7	0,4	0,3	5,8	8,4	14,8	76,1	9,1
H7	10	11,3	1,4	0,1	0,1	3,8	77,7	4,3	0,7	0,4	0,2	5,4	15,9	15,6	79,4	5,0
H7	14	10,9	1,1	0,1	0,1	3,8	78,7	3,9	0,7	0,4	0,2	5,6	17,4	15,2	80,1	4,6
H7	15	10,9	0,7	0,1	0,2	2,9	77,9	5,8	0,7	0,4	0,3	6,0	12,2	14,3	79,1	6,5
H7	19	9,9	0,7	0,1	0,2	3,6	77,5	6,5	0,7	0,4	0,3	6,1	10,9	14,0	78,7	7,2
H7	21	11,9	1,1	0,1	0,1	3,6	76,9	4,8	0,7	0,4	0,3	5,2	14,3	16,0	78,4	5,5
H7	22	8,3	0,6	0,1	0,2	3,6	78,5	7,3	0,7	0,4	0,3	7,1	10,0	12,4	79,6	8,0
H7	23	10,3	0,6	0,1	0,2	3,5	76,5	7,3	0,7	0,4	0,3	6,0	9,7	14,3	77,6	8,0
H7	24	9,3	0,7	0,1	0,2	3,6	77,3	7,3	0,7	0,4	0,3	6,5	9,8	13,4	78,5	8,0
H7	25	8,8	0,6	0,1	0,2	3,6	77,7	7,6	0,7	0,4	0,3	6,8	9,5	12,9	78,8	8,3
H7	26	9,9	0,7	0,1	0,2	3,6	77,4	6,7	0,7	0,4	0,3	6,1	10,6	14,0	78,6	7,4

Tabla 2.40. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras de la serie DO7 de la campaña 2010 – 2011.

Serie	RI	Palmítico	Palmitoleico	Margárico	Margaroleico	Estearico	Oleico+ Vaccénico	Linoleico	Linolénico	Araquico	Gadoleico	(MUFA+PUFA)/ SAFA	MUFA/ PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
DO7	1	13,6	1,5	0,1	0,2	2,3	70,9	10,1	0,6	0,3	0,3	5,1	6,8	16,3	73,0	10,7
DO7	2	10,9	0,8	0,2	0,2	3,5	75,9	6,8	0,7	0,4	0,3	5,6	10,3	15,0	77,2	7,5
DO7	3	11,8	1,0	0,2	0,2	2,9	74,5	7,9	0,7	0,4	0,3	5,5	8,8	15,3	76,0	8,6
DO7	4	14,2	1,8	0,2	0,2	1,9	68,9	11,5	0,6	0,4	0,3	5,0	5,9	16,7	71,2	12,1

Identificación de las muestras y resultados obtenidos por cromatografía de gases como técnica de referencia

DO7	14	7,9	0,8	0,1	0,2	1,9	81,5	5,9	1,0	0,3	0,4	8,8	12,0	10,2	82,9	6,9
DO7	15	8,8	0,7	0,1	0,2	2,6	83,5	2,9	0,7	0,3	0,2	7,5	23,5	11,8	84,6	3,6
DO7	16	10,8	0,6	0,2	0,3	2,9	77,8	5,8	0,8	0,4	0,3	6,0	12,0	14,3	79,0	6,6
DO7	17	12,5	1,1	0,1	0,2	2,7	74,4	7,6	0,7	0,4	0,3	5,4	9,2	15,7	76,0	8,3
DO7	18	10,8	0,6	0,2	0,2	3,4	77,9	5,5	0,7	0,4	0,3	5,8	12,7	14,8	79,0	6,2
DO7	20	13,6	1,3	0,1	0,2	2,3	70,5	10,6	0,8	0,3	0,3	5,1	6,3	16,3	72,3	11,4
DO7	21	9,9	0,6	0,1	0,2	2,9	81,4	3,8	0,6	0,3	0,2	6,6	18,7	13,2	82,4	4,4
DO7	22	12,5	1,2	0,1	0,2	1,9	72,8	9,7	0,8	0,3	0,3	5,7	7,1	14,8	74,5	10,5
DO7	23	10,7	0,7	0,2	0,2	2,9	76,9	6,9	0,7	0,4	0,3	6,0	10,3	14,2	78,1	7,6
DO7	24	9,9	0,7	0,1	0,1	3,6	80,8	3,7	0,6	0,3	0,2	6,2	19,0	13,9	81,8	4,3
DO7	25	9,5	0,7	0,1	0,2	3,4	76,5	8,2	0,7	0,4	0,3	6,5	8,7	13,4	77,7	8,9
DO7	26	9,7	0,7	0,1	0,2	3,5	76,7	7,7	0,7	0,4	0,3	6,3	9,3	13,7	77,9	8,4
DO7	27	8,1	0,4	0,2	0,2	3,6	79,7	6,4	0,6	0,4	0,3	7,1	11,5	12,3	80,6	7,0
DO7	29	12,2	1,1	0,1	0,2	2,8	74,9	7,3	0,7	0,4	0,3	5,5	9,6	15,5	76,5	8,0
DO7	31	10,9	0,9	0,1	0,2	3,4	76,8	6,3	0,7	0,4	0,3	5,8	11,2	14,8	78,2	7,0

Tabla 2.41. Contenido en ácidos grasos, determinados por GC (cromatografía gases), de las muestras correspondientes a mezclas del aceite 1DO7, correspondiente a la DOP Estepa, con distintos aceites vegetales.

RI*	Palmitico	Palmitoleico	Margarico	Margaroleico	Estearico	Oléico+ Vaccenico	Linoleico	Linolenico	Araquico	Gadoléico	(MUFA+PUFA)/SAFA	MUFA/PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
EG2	13,8	1,3	0,1	0,2	2,4	70,1	10,6	0,6	0,4	0,3	5,0	6,4	16,7	72,0	11,2
EG10	13,3	1,2	0,1	0,2	2,4	68,7	12,6	0,6	0,4	0,3	5,2	5,3	16,2	70,5	13,2
EG15	12,8	1,1	0,1	0,2	2,5	67,9	13,9	0,6	0,4	0,3	5,3	4,8	15,8	69,6	14,5
EG25	11,8	1,1	0,1	0,2	2,7	66,6	16,3	0,5	0,3	0,3	5,7	4,1	14,9	68,3	16,8
EG50	9,8	0,7	0,1	0,1	2,8	62,9	22,5	0,4	0,3	0,2	6,7	2,8	13,0	64,0	22,9
EG75	7,9	0,5	0	0,1	3,6	57,9	29,1	0,2	0,4	0,2	7,4	2,0	11,9	58,8	29,3
EA2	13,8	1,3	0,1	0,2	2,2	70,6	10,2	0,7	0,4	0,3	5,0	6,6	16,5	72,5	10,9
EA10	12,9	1,2	0,1	0,2	2,4	71,5	10,2	0,6	0,4	0,3	5,3	6,8	15,8	73,3	10,8
EA15	12,8	1,1	0,1	0,2	2,4	71,9	10,1	0,6	0,4	0,3	5,4	6,9	15,7	73,6	10,7
EA25	11,6	1,1	0,1	0,2	2,5	73,2	10	0,5	0,3	0,3	5,9	7,1	14,5	74,9	10,5
EA50	9,6	0,8	0,1	0,1	2,5	75,7	10,1	0,4	0,3	0,2	7,0	7,3	12,5	77,0	10,5
EA75	7,4	0,5	0,1	0,1	2,8	78,1	10,1	0,2	0,3	0,2	8,4	7,7	10,6	79,1	10,3
EM2	13,9	1,3	0,1	0,2	2,2	69,9	10,9	0,6	0,4	0,3	5,0	6,2	16,6	71,8	11,5
EM10	13,8	1,2	0,1	0,2	2,2	66,7	14,2	0,7	0,4	0,3	5,0	4,6	16,5	68,5	14,9
EM15	13,5	1,1	0,1	0,2	2,2	64,9	16,4	0,7	0,4	0,3	5,2	3,9	16,2	66,6	17,1
EM25	13,3	1	0,1	0,2	2,2	61,2	20,4	0,7	0,4	0,3	5,2	3,0	16,0	62,8	21,1
EM50	13,1	0,8	0,1	0,1	2,2	50,9	31,4	0,7	0,3	0,2	5,4	1,6	15,7	52,1	32,2
EM75	11,8	0,4	0,1	0,1	2	41,5	42,4	0,8	0,4	0,3	6,0	1,0	14,3	42,4	43,3
EL2	13,8	1,3	0,1	0,2	2,3	69,6	10,2	1,7	0,3	0,3	5,0	6,0	16,5	71,5	11,9
EL10	13,1	1,2	0,1	0,2	2,3	65,5	10,8	6,2	0,1	0,3	5,4	4,0	15,6	67,3	17,0

EL15	12,6	1,1	0,1	0,2	2,5	63,1	11,2	8,7	0	0,3	5,6	3,3	15,2	64,8	19,9
EL25	12,2	1	0,1	0,2	2,6	60,2	11,4	11,8	0	0,3	5,7	2,7	14,9	61,8	23,2
EL50	9,6	0,7	0,1	0,1	2,9	45,6	13,6	27	0	0,2	6,9	1,1	12,6	46,7	40,7
EL75	7,3	0,4	0,1	0,1	3,5	32,6	15,4	40,2	0	0,2	8,2	0,6	10,9	33,4	55,7
LINO	4,9	0,1	0,1	0	3,9	20,6	17,2	52,9	0	0,1	10,2	0,3	9,0	20,8	70,2
AVELLANA	4,9	0,2	0	0,1	2,9	80,8	10,4	0,1	0,2	0,2	11,5	7,7	8,0	81,5	10,5
MAIZ	10,9	0,1	0,1	0	2,3	31,9	52,9	0,9	0,4	0,3	6,3	0,6	13,7	32,4	53,9
GIRASOL	5,8	0,1	0	0	3,7	54,1	35,6	0	0,3	0,2	9,2	1,5	9,8	54,5	35,7
ACEITE OLIVA PURO (1DO7)	13,6	1,5	0,1	0,2	2,3	70,9	10,1	0,6	0,3	0,3	5,1	6,8	16,3	73,0	10,7

*2, 10, 15, 25, 50 y 75 corresponden al porcentaje, en %, de aceite vegetal presente en la muestra 1DO7. G, A, M y L denotan, respectivamente, girasol, avellana, maíz o lino.

3. BIBLIOGRAFÍA

1. Moalem, M. Tesis Doctoral: Aplicación de las técnicas de SIRMS y RMN (de ¹H y ¹³C) a la trazabilidad del aceite de oliva. Universidad de Córdoba, 2007.
2. Gutiérrez, A. F.; Carretero, A. S. *El aceite de oliva virgen : tesoro de Andalucía : 13 perspectivas concatenadas*; Fundación Unicaja: 2009.
3. Rallo, L.; Barranco, D.; Caballero J.M.; del Río, C.; Martín, A.; Tous, J.; Trujillo, I. *Variedades de olivo en España*; Mundi-Prensa: Madrid, 2005; 360-368.
4. Martínez, J. M.; Muñoz, E.; Alba, J.; Lanzón, A. Informe sobre la utilización del analizador de rendimientos Abencor. *Grasas Aceites* **1975**, 26 (6), 379-385.
5. Reglamento (UE) No. 61/2011 de la Comisión de 24 de enero de 2011.
6. COI/T.20/Doc n° 24. 2001.
7. COI/T.20/Doc n° 17. 2001.
8. Cert, A.; Moreda, W.; Pérez-Camino, M. C. Methods of preparation of fatty acid methyl esters (FAME). Statistical assessment of the precision characteristics from a collaborative trial. *Grasas y Aceites* **2000**, 51 (6), 447-456.

**CAPÍTULO 3. ESPECTROMETRÍA DE
MASAS DE ISÓTOPOS ESTABLES
(IRMS) APLICADA AL ESTUDIO DE
ACEITES DE OLIVA**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	175
2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN ISOTÓPICA.....	178
3. MATERIALES Y MÉTODOS	181
3.1 MUESTRAS.....	181
3.2 TÉCNICAS IRMS	182
4. RESULTADOS	189
4.1 INFLUENCIA DE LA VARIEDAD	190
4.2 INFLUENCIA DE LA CAMPAÑA.....	192
4.3 INFLUENCIA DEL RIEGO.....	194
4.4 INFLUENCIA DE LA LATITUD Y DE LA ZONA GEOGRÁFICA	195
5. BIBLIOGRAFÍA	200
ANEXO 3.1. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS POR IRMS	204

CAPÍTULO 3: ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ISÓTOPOS ESTABLES (IRMS)

1. INTRODUCCIÓN

La técnica IRMS (del inglés, “Isotope Ratio Mass Spectrometry”) es una variante de la Espectrometría de Masas cuyo objeto es medir de forma exacta y precisa las variaciones en la abundancia isotópica natural de los isótopos estables ligeros de C, O, H, N, S en muy diversos tipos de muestras. Dichas variaciones son atribuibles al llamado “fraccionamiento isotópico”, ya que los isótopos presentan el mismo número atómico pero diferente peso atómico, por lo que tienen las mismas propiedades químicas pero difieren en sus propiedades físicas y físico-químicas. Así encontramos los isótopos pesados (por ejemplo ^{13}C , ^{18}O) y los isótopos ligeros (^{12}C , ^{16}O). Cuando se aumenta o se disminuye el contenido en el isótopo pesado en las moléculas se habla de *enriquecimiento* o *empobrecimiento* isotópico, respectivamente, en procesos naturales de evaporación, precipitación, filtración, etc..., así como en las reacciones catalizadas por diversas enzimas en las diferentes rutas fotosintéticas. Tomando como ejemplo el proceso de evaporación-condensación, similar al que se produce en la formación de nubes a partir del agua del mar, tiene lugar una evaporación más lenta de los isótopos pesados, por lo que la fase gaseosa formada tendrá un contenido en isótopos pesados más pobre (empobrecimiento), los cuales se seguirán perdiendo en el proceso de precipitación, ya que se irán condensando, de manera predominante, las moléculas más pesadas.

Como unidades de medida, encontramos **la abundancia isotópica** (% de átomos), de la cual obtenemos una información muy útil. En la *Figura 3.1.* se muestran

los valores de los elementos más comunes. Si tomamos el ejemplo del análisis del oxígeno en aceite, puede observarse que, por término medio, por cada 100 átomos de oxígeno, 99.80 serán de oxígeno-16 y únicamente 0.20 se encontrarán como oxígeno-18. No obstante, dependiendo de la procedencia de dicho aceite, puede ocurrir que una muestra presente una composición del 0.20004% en oxígeno-18 y otra, de diferente lugar, tenga, por ejemplo, un valor del 0.20010%. Es precisamente de esa pequeña variación de donde, en principio, se podría obtener información sobre, por ejemplo, aspectos geográficos.

Elemento	Isótopo	Abundancia Natural [%]
Hidrógeno	² H (D)	0,01557
Carbono	¹³ C	1,11140
Nitrógeno	¹⁵ N	0,36630
Oxígeno	¹⁸ O	0,20004
Azufre	³⁴ S	4,21500

↑
Aquí es donde se encuentra la información

Figura 3.1. Valores de abundancia isotópica de los elementos más comunes

Otra unidad de medida es la **Delta (δ) o enriquecimiento**. Para hacer comparables las frecuencias obtenidas en las distintas muestras, los resultados se refieren a un patrón, un material tomado como referencia del valor del isótopo pesado con respecto al ligero. La notación delta se expresa en tantos por mil (‰) para facilitar la expresión de los resultados, como ya se ha comentado en el *Apartado 5.1 del Capítulo 1*.

Dentro de las numerosas aplicaciones que presenta la técnica, además de las aplicaciones en agricultura y alimentación, descritas en el *Apartado 5.1 del Capítulo 1*, destacamos algunas de ellas. En **Medio Ambiente** esta técnica puede contribuir en la localización del origen de contaminantes [1], como por ejemplo, la procedencia de un vertido de petróleo [2]; también puede evaluar la transformación de contaminantes orgánicos[3], analizar el contenido de plaguicidas organofosforados[4], la degradación de contaminantes en acuíferos [5] e incluso proporcionar información acerca del cambio climático [6]. Asimismo, puede emplearse para seguir la recuperación de la flora y fauna tras episodios de contaminación [7]. En **Biología y Microbiología**, estudiando biomarcadores en microbios, permite distinguir entre diferentes especies de una comunidad [8]. En la **Industria farmacéutica** se han realizado caracterizaciones isotópicas (huella digital) de los Componentes Activos de los Fármacos [9] (los llamados APIs, “Active Pharmaceutical Ingredients”), por medida de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (técnica “EA/IRMS”) así como $\delta^2\text{H}$ y $\delta^{18}\text{O}$ (“TC-EA/IRMS”). También se ha estudiado la autenticidad de medicamentos [10,11] y la degradación de productos farmacéuticos [11,12]. En **aplicaciones forenses** ha sido utilizada para el análisis de explosivos, líquidos inflamables y drogas ilícitas [13], para obtener información del precursor utilizado en la síntesis pastillas de éxtasis y de los métodos usados en laboratorios clandestinos, mediante análisis de $\delta^{15}\text{N}$ [14], para identificar el origen de muestras de cianuro presentes en venenos comunes en asesinados [15], para conocer la procedencia geográfica de heroína, estudiando su composición en $\delta^{13}\text{C}$ [16], para obtener información valiosa, a partir de los compuestos específicos de muestras de diesel, a la hora de descubrir planes de evasión de impuestos de combustible o para estudios forenses ambientales [17] y en la determinación de zonas de procedencia del alabastro, lo cual permite verificar hipótesis sobre las rutas comerciales históricas y la

identificación de falsificaciones y su origen [18]. En **medicina** se ha aplicado en el estudio del metabolismo del colesterol, empleando sustancias marcadas con ^{13}C y ^{15}N [19,20]. También se ha utilizado para detectar *Helicobacter pylori*, mediante el “ ^{13}C -Urea Breath Test” o T.A.U. (Test del Aliento con Urea ^{13}C) [21]. Para detectar testosterona, como agente dopante en deportistas, varios autores han utilizado la técnica, basándose en el contenido de $\delta^{13}\text{C}$, ya que la testosterona administrada de forma exógena presenta un valor más bajo [22-25]. En la detección de dopaje en pruebas deportivas [26,27].

2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN ISOTÓPICA

Los factores que influyen en la composición isotópica, tomando como ejemplo la composición isotópica del agua, concretamente en oxígeno (aunque igualmente aplicable al hidrógeno), se muestran a continuación:

La **temperatura** influye en la transpiración, la cual será mayor en regiones más cálidas, por lo que las moléculas más ligeras se evaporarán más fácilmente y, a igualdad de otros factores, las muestras de estos lugares presentarán un *enriquecimiento* del isótopo más pesado, ^{18}O (Figura 3.2.)

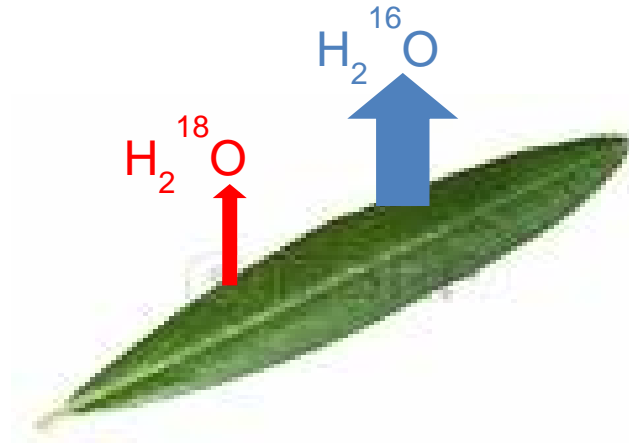


Figura 3.2. Influencia de la temperatura en la composición isotópica.

La **latitud** influye en la evaporación, siendo ésta mayor en bajas latitudes, produciéndose la condensación durante el transporte a latitudes mayores, donde las temperaturas son menores, dando lugar al “efecto de la latitud”. Por lo tanto, la fase gaseosa sufrirá un empobrecimiento en ¹⁸O a medida que se aumenta este factor. Se estima que en Europa se produce una variación de ~0,6 ‰ en δ¹⁸O, por grado de latitud. (Figura 3.3.).

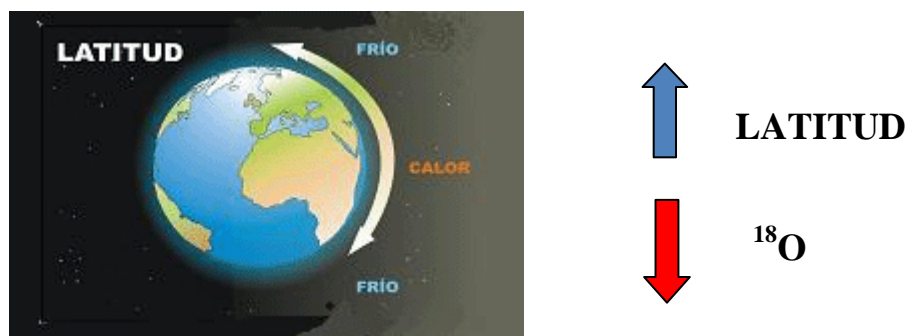


Figura 3.3. Efecto de la latitud sobre la composición isotópica.

A medida que se aumenta la **distancia al mar**, el agua de las nubes presentará un empobrecimiento isotópico, es decir, un valor más negativo de δ¹⁸O. Esto es debido,

como se ha dicho antes, a que durante el desplazamiento las gotas de agua “más pesadas” encontrarán más dificultad para avanzar (*Figura 3.4.*).

Con la **altitud** también se produce un empobrecimiento en las nubes en ^{18}O , debido a lo anteriormente descrito (*Figura 3.4.*).

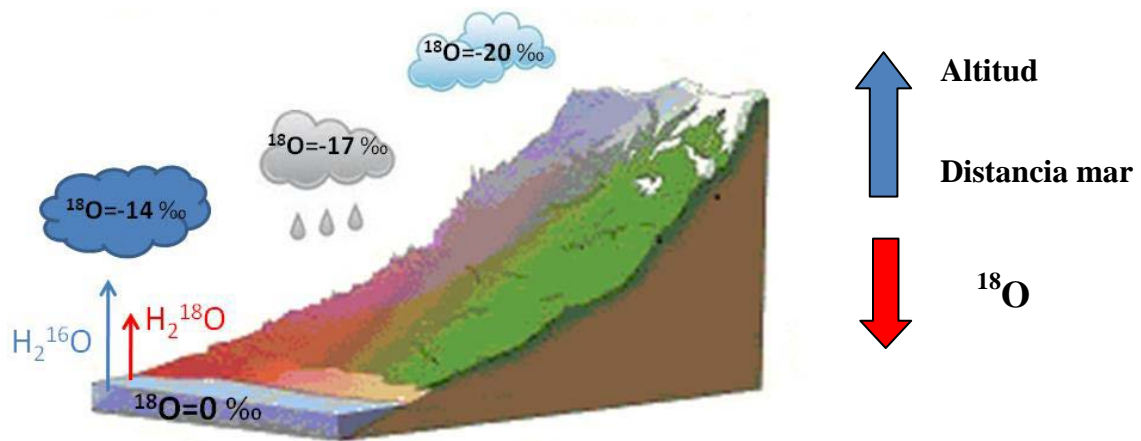


Figura 3.4. Efecto de la distancia al mar y de la altitud en la composición isotópica.

En muestras de aceite de oliva, la composición isotópica en oxígeno, estará influida por los factores descritos anteriormente y vendrá determinada por el valor del oxígeno presente en el agua de lluvia o de riego, el CO_2 fijado mediante el ciclo de Calvin y el proceso de evapotranspiración. En cuanto al hidrógeno, su valor dependerá del agua de lluvia o riego y el fenómeno de evapotranspiración. Finalmente, la composición de carbono, estará determinada, principalmente, por el CO_2 fijado en el ciclo de Calvin. Por lo tanto, a igualdad de otros factores, cuanto mayor sea la altitud, la latitud y la distancia al mar a la que se encuentra el olivo, el contenido en ^{18}O ser menor, siendo mayor cuanto más cálida sea la zona de donde procede (*Figura 3.5.*).

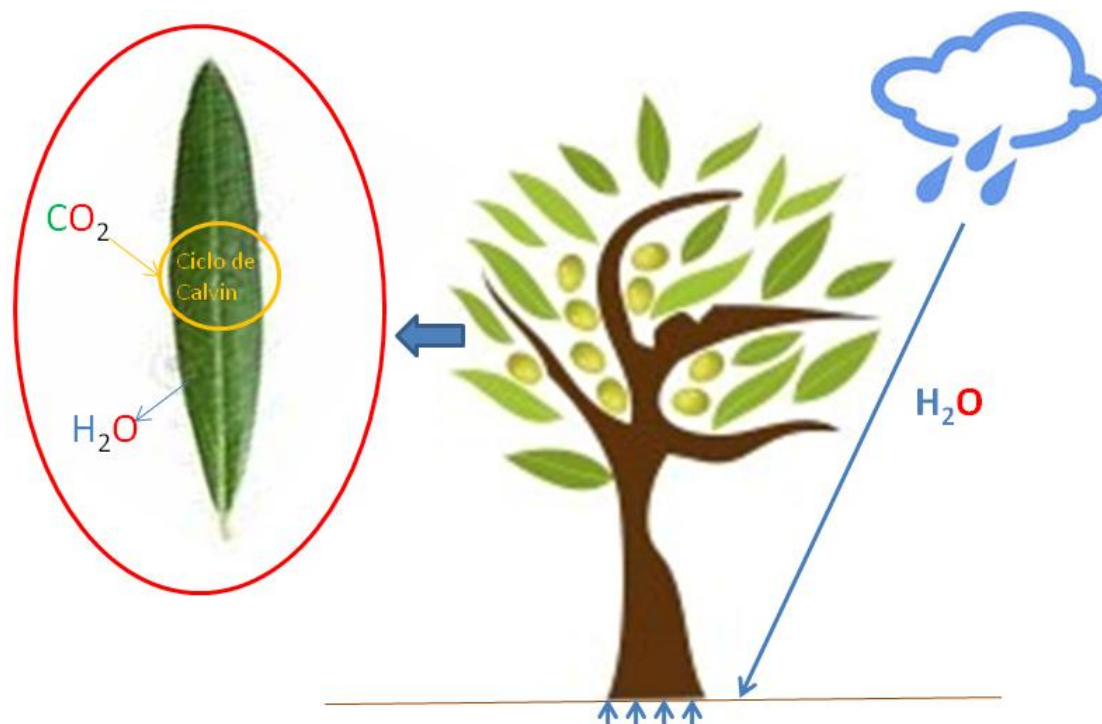


Figura 3.5. Procedencia del oxígeno, hidrógeno y carbono presente en las muestras de aceite de oliva.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS

Las muestras de aceite en las que se ha estudiado el contenido isotópico pertenecen a cinco campañas diferentes, desde 2004-2005 a 2008-2009 (No se analizaron las de las campañas 2009-2010 y 2010-20011 debido a diversas averías del equipo). Dentro de las campañas estudiadas encontramos distintas variedades de aceitunas, como Zaito, Frantoio, Gordal, Manzanilla, Sorani, Koroneiki, Picual, Hojiblanca y Arbequina, entre otras, siendo éstas tres últimas las que tienen mayor representación en nuestro estudio, ya que Picual y Hojiblanca son las más abundantes en nuestra región y Arbequina está aumentando su número de plantaciones en nuestra zona.

3.2 TÉCNICAS IRMS

Las técnicas “IRMS” se pueden clasificar, como se citó en el *Apartado 5.1 del Capítulo 1*, atendiendo a distintos criterios. En este caso se describen las referentes al tipo de medida que se vaya a realizar y al modo de obtener la muestra gaseosa para su análisis. Con respecto a la primera clasificación, encontramos:

a) Medida de la composición global (másica) de una muestra (“bulk stable isotope analysis”, “BSIA”). Todas las medidas isotópicas realizadas en esta Tesis Doctoral, corresponden a esta clasificación.

b) Medida de la relación isotópica para un compuesto específico, (“compound-specific stable isotope analysis”, “CSIA”). En este caso se emplea un cromatógrafo, generalmente de gases, que separa los compuestos de la mezcla a analizar antes de su paso por el analizador elemental o pirolizador. Un ejemplo clásico es la determinación de los valores $\delta^{13}\text{C}$ del ácido palmítico y oleico para detectar fraudes en aceite de oliva [28].

c) Determinación de la relación isotópica en una parte concreta de la molécula, (“position-specific isotope analysis”, “PSIA”) [29]. En ocasiones, el análisis en la parte concreta de la molécula es realizado por RMN (“SNIF-NMR”, del inglés “site-specific natural isotopic fractionation by ^2H nuclear magnetic resonance”), mientras que la técnica IRMS se aplica sobre la totalidad de la muestra, proporcionando información complementaria.

Atendiendo a la manera de preparar la muestra para su análisis en IRMS se distingue entre:

a) **“EA-IRMS”** (Figura 3.6): La muestra, antes de llegar al Masas de Isótopos, necesita ser transformada a forma gaseosa, para ello pasa a través de un analizador elemental (“*Elemental Analyzer*”), que transformará el carbono en CO_2 , nitrógeno en N_2 y azufre en SO_2 , pudiendo así medir la relación isotópica de estos tres elementos. Los tres gases pasan por una columna cromatográfica donde son separados y llegan al “*IRMS*”. En nuestro caso (que coincide con el ilustrado en la figura), sólo CO_2 y N_2 son separados. En esta técnica se emplea un analizador convencional en el que se ha inutilizado el detector comúnmente empleado (de conductividad térmica o “*TCD*”), ya que el detector es el propio Masas de Isótopos.

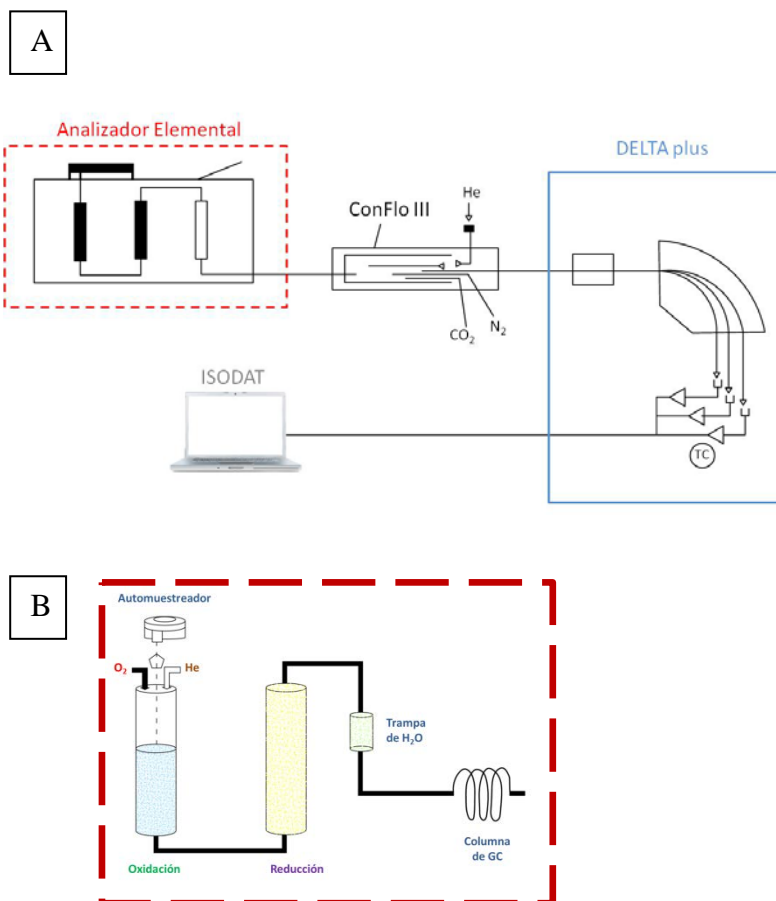


Figura 3.6. a) Esquema general del equipo EA-IRMS. b) Detalle del analizador elemental (EA) donde la muestra es transformada en CO_2+N_2 para su análisis isotópico mediante IRMS.

b) “*Py-IRMS*”, también conocida como técnica “*TC/EA-IRMS*” (Figura 3.7.): mediante un proceso de pirólisis se determina oxígeno e hidrógeno por formación de CO y H₂, respectivamente. Obviamente, mediante la técnica “*EA-IRMS*” no puede determinarse oxígeno, al emplear éste para la oxidación del compuesto orgánico.

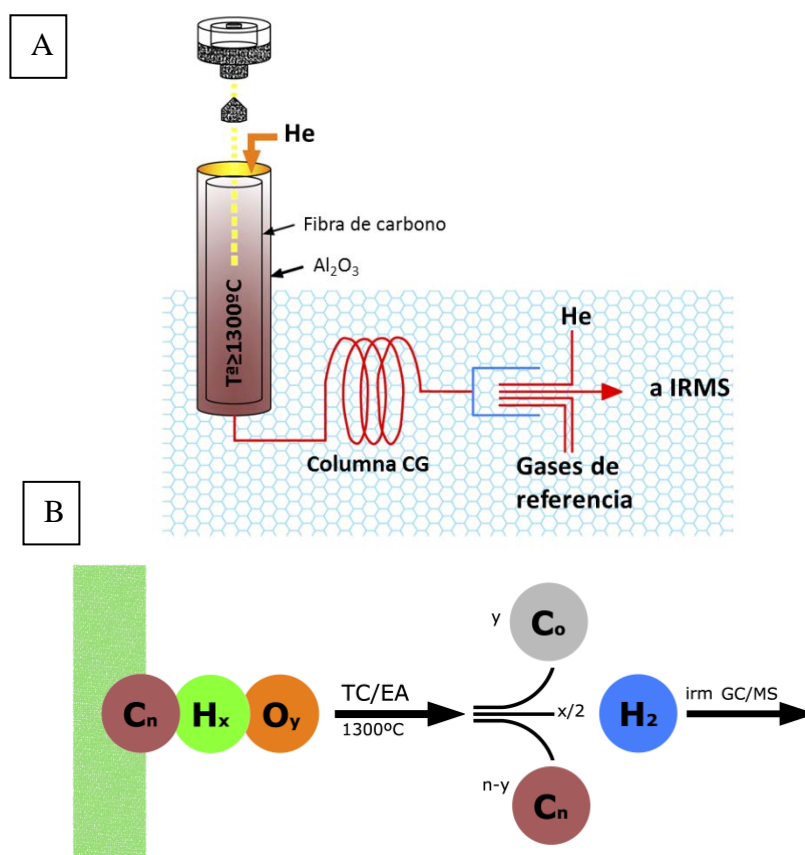


Figura 3.7. a) Esquema general del TC/EA-IRMS; b) Producción de CO y H₂ mediante dicha técnica.

c) Sistema de equilibrado, tipo “*Gas Bench-IRMS*” (Figura 3.8.): Se utiliza para la determinación de oxígeno e hidrógeno en muestras líquidas (por ejemplo en vinos). Éstas son introducidas en unos viales en cuyo espacio de cabeza se insufla CO₂ (determinación de oxígeno) o hidrógeno gas (determinación de hidrógeno). En el primer caso se produce un intercambio mediante equilibrado entre el oxígeno del CO₂ introducido y el de la propia muestra. En el segundo (determinación de hidrógeno) se

añade una barra de platino que provocará la reducción de la muestra. El hidrógeno así liberado se intercambiará con el introducido a partir de la bala. En ambas situaciones el análisis tras un período de intercambio isotópico (equilibrado) se lleva a cabo mediante toma de muestra del espacio de cabeza.

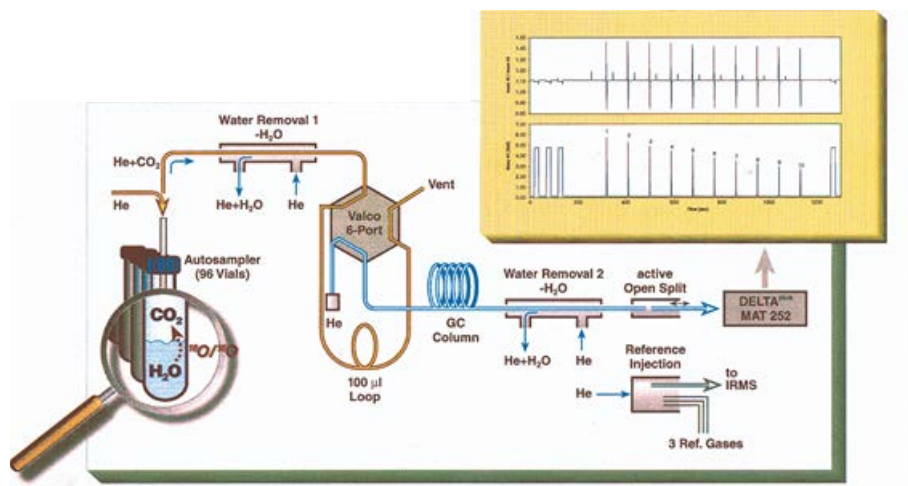


Figura 3.8. Esquema del sistema de equilibrado Gas Bench-IRMS (Adaptada del catálogo de Thermo Quest, 03/99 Part No. 1990660).

A continuación se muestra una imagen en la que se puede observar el laboratorio de Isótopos Estables situado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba, donde se encuentra el Espectrómetro de masas (IRMS), el pirolizador (Py-IRMS), donde se lleva a cabo la medida de O y el analizador elemental (EA-IRMS), donde se realiza el análisis de C. Tanto el analizador elemental como el equipo de pirólisis están conectados al SIRMS mediante una interfase ConFlo III de Thermo Finnigan (*Figura 3.9*). Las medidas isotópicas de hidrógeno se llevaron a cabo en el Joint Research Centre de Ispra (Italia) durante la estancia post-doctoral del Dr José Manuel Moreno Rojas, empleando un equipo Py-IRMS similar al anteriormente descrito.

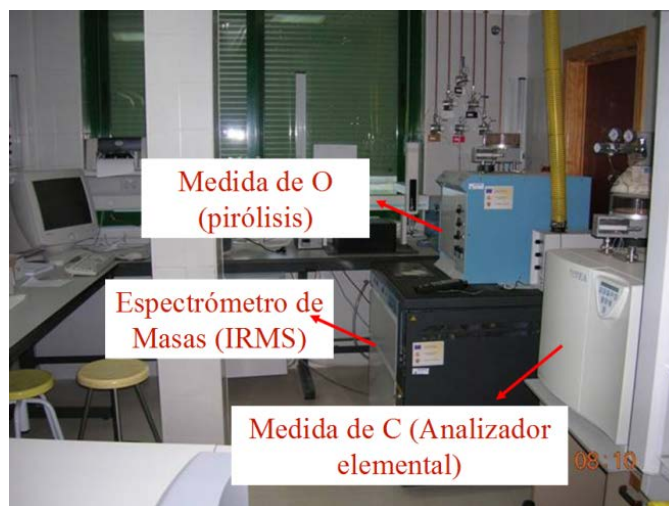


Figura 3.9. Laboratorio de Espectrometría de Masas de Isótopos Estables del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba.

El equipo utilizado en nuestros análisis es un equipo Delta Plus XL, de Thermo Finnigan, y, como cualquier Espectrómetro de Masas, consta de una fuente de ionización, un imán y un analizador-multicolector (*Figura 3.10.*), pero presenta pequeñas diferencias [30], ya que mantiene fijo el campo magnético, colocando un colector al final de cada haz iónico de interés y emplear rendijas estrechas en la fuente y anchas en el colector que permitan la obtención de picos planos en los que se pueda medir bien la altura, con objeto de obtener una alta precisión.

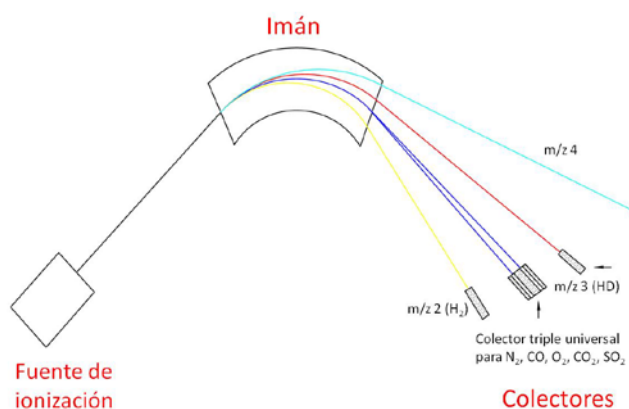


Figura 3.10. Esquema general del equipo “IRMS” modelo Thermo Finnigan Delta Plus XL, disponible en el Dpto. Química Orgánica de la UCO.

Para el **análisis de carbono** (relaciones $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) [31] se utilizan cápsulas de estaño (Ref. E12001 de Eurovector), en las cuales, previamente se introduce una cantidad de 180-200 μg de aceite, se cierran cuidadosamente y se colocan en el muestreador automático del analizador elemental (EA-IRMS), en nuestro caso, un Carlo Erba Flash EA 1112 Series de ThermoQuest (Milán, Italia). Aquí es donde las muestras van a ser transformadas en gases. La combustión total de las muestras fue lograda haciendo pasar la mezcla de gases por un catalizador de óxido de cromo a 1020°C . Como gas portador y de referencia se ha utilizado He, con flujos de 80 y 60 mL/min, respectivamente. El oxígeno para la combustión se introdujo a un flujo de 175 mL/min durante 5 s. A continuación, esos gases pasan a través de un lecho de cobre elemental a 640°C para reducir el óxido nitroso a N_2 . Posteriormente, los gases atraviesan una trampa de agua consistente en $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, llegando a la columna cromatográfica (*Porapak QS*) a 45°C donde CO_2 y N_2 son separados como paso previo a su llegada a la fuente de ionización por impacto electrónico del espectrómetro de masas, por medio de una interfase tipo “open split”. El gas de referencia utilizado fue CO_2 , procedente de la SEO (Sevilla). La abundancia de los principales isotopómeros de masas 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ y $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) y 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$) resultantes de las diferentes combinaciones de isótopos ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C y ^{12}C es determinada a partir de las corrientes iónicas medidas por 3 colectores situados en el espectrómetro de masas. La contribución de los isotopómeros $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ y $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ puede considerarse despreciable. La contribución de la señal $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ a la m/z 45 es corregida considerando la intensidad de corriente a m/z 46, y teniendo en cuenta la abundancia en ^{18}O y ^{17}O (corrección de Craig) [32]. La medida del contenido en $\delta^{13}\text{C}$ se realiza por comparación con un gas de referencia (CO_2), a su vez calibrado frente al patrón internacional VPDB. También se utilizan como patrones, sacarosa ($\delta^{13}\text{C} = -25.2 \text{ ‰}$) y un aceite de oliva con valor $\delta^{13}\text{C} = -29.4 \text{ ‰}$

proporcionados por la Estación Enológica de Jerez (Jerez, España) y el Joint Research Centre de Ispra (Italia), respectivamente.

En el **análisis de oxígeno** [31,33], las muestras son preparadas para ser introducidas en el pirolizador (TC/EA de ThermoQuest, Bremen, Alemania). Para ello se utilizan cápsulas de sólidos Ref. Ultraclean D-1027 de Elemental Microanalysis Ltd. (Okehampton, UK) o Ref. E12001 de Eurovector (Milán, Italia). La optimización de las cápsulas idóneas para cada tipo de análisis, fue descrita en un estudio anterior [34]. La cantidad de aceite empleada en el análisis de oxígeno es de 200-300 µg. Posteriormente las cápsulas son cerradas, para evitar la contaminación por aire y son colocadas en el automuestreador. Las muestras son analizadas por quintuplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados, utilizando CO como gas de referencia, procedente de la SEO (Sevilla). En el caso de las medidas de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, la cápsula que contiene la muestra es dejada caer sobre un cestillo de grafito que se encuentra situado en la zona más caliente de un reactor relleno de carbón y calentado a 1400°C. De este modo, la muestra es pirolizada y los gases resultantes (CO , H_2 y N_2) son separados cromatográficamente a 90°C con una columna con tamices moleculares de 5A e introducidos en el espectrómetro de masas vía la interfase tipo “open split” arriba indicada. Como gas portador y de purga se utiliza He, con una presión de 22 y 26 psi, respectivamente. El espectrómetro de masas permite la determinación simultánea de cada isotópomo del CO [$^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ (m/z 28) $^{13}\text{C}^{16}\text{O}$ y $^{12}\text{C}^{17}\text{O}$ (m/z 29), $^{12}\text{C}^{18}\text{O}$ y trazas de $^{13}\text{C}^{17}\text{O}$ (m/z 30)]. La medida del contenido en $\delta^{18}\text{O}$ se realiza por comparación con un gas de referencia (CO), a su vez calibrado frente al patrón internacional VSMOW. Otros patrones secundarios utilizados fueron sacarosa con un valor $\delta^{18}\text{O} = +23.0 \text{ ‰}$ frente al VSMOW y un aceite de oliva con un valor $\delta^{18}\text{O} = +25.5 \text{ ‰}$.

Para determinar **hidrógeno** [31] se utilizaron cápsulas de plata Ref.84.9903.36 de Lüdiag (Flawil, Suiza), a las que se les añadieron 300 µg de aceite. El análisis, llevado a cabo en el JRC de Ispra (Italia), se realizó en un analizador de conversión total (TC/EA) acoplado al espectrómetro de masas delta Plus XL, de Thermo Fisher (Rodano, Italia). Para medir los valores de $\delta^2\text{H}$ se utilizó un voltaje de 7000 mV con temperaturas de 85°C para la columna de GC y de 1450°C para el reactor de columna de carbono. El gas de referencia empleado fue hidrógeno presurizado Alphagaz TM H₂ 2 de Air Liquide (Milán, Italia). El valor del estándar utilizado fue de $\delta^2\text{H}= 148,32\%$. Cada muestra se analizó por triplicado.

4. RESULTADOS

En el *Anexo 3.1*, se encuentran los valores obtenidos para $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$. A través de estos resultados, se pretende observar la influencia de la variedad, campaña, efecto del riego, latitud y zona geográfica.

El rango de valores entre los que oscilan los resultados para los aceites de oliva son, para $\delta^{13}\text{C}$ entre -31,5 y -26,4‰, para $\delta^{18}\text{O}$ entre 20,9 y 27,9‰ y para $\delta^2\text{H}$ entre -153 y -130‰. La determinación de estos valores presenta una precisión, expresada como desviación estándar, de 0.1, 0.3 y 3‰, respectivamente. Se trata de unos valores mejorados con respecto a los valores aconsejados en la técnica [35].

4.1 INFLUENCIA DE LA VARIEDAD

Si observamos los valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ correspondientes a las tres variedades más representativas en nuestro estudio (Arbequina, Hojiblanca y Picual), pertenecientes a todas las campañas estudiadas, podemos decir que oscilan entre los siguientes valores:

Tabla 3.1. Rango de valores y valor medio para $\delta^{13}\text{C}$ de las principales variedades.

Variedad	Rango de valores de $\delta^{13}\text{C}$	Valores medios
Arbequina	-31,2 a -28,2	-29,4
Picual	-30,7 a -26,4	-28,7
Hojiblanca	-29,3 a -27,2	-28,3

Tabla 3.2. Rango de valores y valor medio para $\delta^{18}\text{O}$ de las principales variedades.

Variedad	Rango de valores de $\delta^{18}\text{O}$	Valores medios
Arbequina	21,4 a 23,7	22,3
Picual	22,5 a 26,0	24,2
Hojiblanca	22,3 a 25,0	23,6

Tabla 3.3. Rango de valores y valor medio para $\delta^2\text{H}$ de las principales variedades.

Variedad	Rango de valores de $\delta^2\text{H}$	Valores medios
Arbequina	-152 a -144	-147,0
Picual	-152 a -132	-140,7
Hojiblanca	-153 a -134	-142,2

Si fijamos el entorno geográfico de cultivo y el año de cosecha (2004-2005), en muestras de Córdoba, para $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ se presentan las siguientes tendencias:

- a. $\delta^{13}\text{C}$ Arbequina < $\delta^{13}\text{C}$ Picual < $\delta^{13}\text{C}$ Hojiblanca

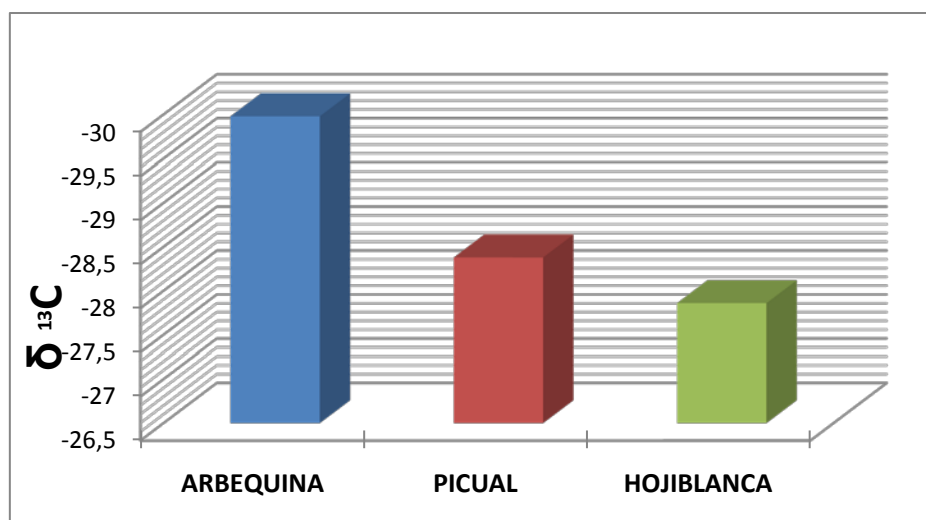


Figura 3.11. Tendencia de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ para un mismo año de cosecha (2004-2005) y entorno geográfico

Esta tendencia también se mantiene para las muestra GT3 y GT4 pertenecientes al banco de germoplasma de Tarragona.

b. $\delta^{18}\text{O}$ Arbequina < $\delta^{18}\text{O}$ Picual < $\delta^{18}\text{O}$ Hojiblanca

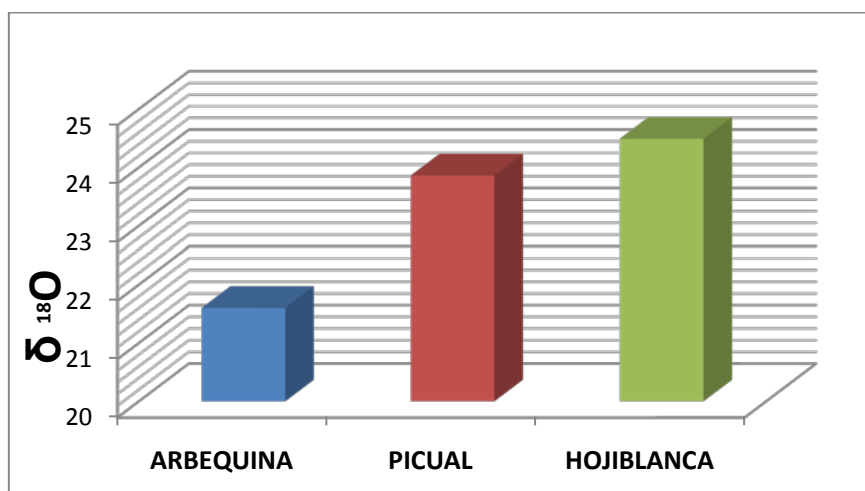


Figura 3.12. Tendencia de los valores de $\delta^{18}\text{O}$ para un mismo año de cosecha (2004-2005) y entorno geográfico

No se observa una tendencia clara para los valores de $\delta^2\text{H}$.

Si se estudia la relación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ para muestras de aceites vegetales V1 y se comparan con el valor medio de los aceites de oliva vírgenes (*Figura 3.13.*) se observa que, en general, con los valores de $\delta^{13}\text{C}$ no se encuentra una diferencia

significativa, pero los valores de $\delta^{18}\text{O}$ son capaces de diferenciar entre ellos. También se observa una gran diferencia entre el aceite de maíz y el resto de los aceites, principalmente en sus valores de $\delta^{13}\text{C}$, esto es debido a que el maíz pertenece al grupo de plantas C4, mientras que el resto siguen el ciclo fotosintético C3 [36].

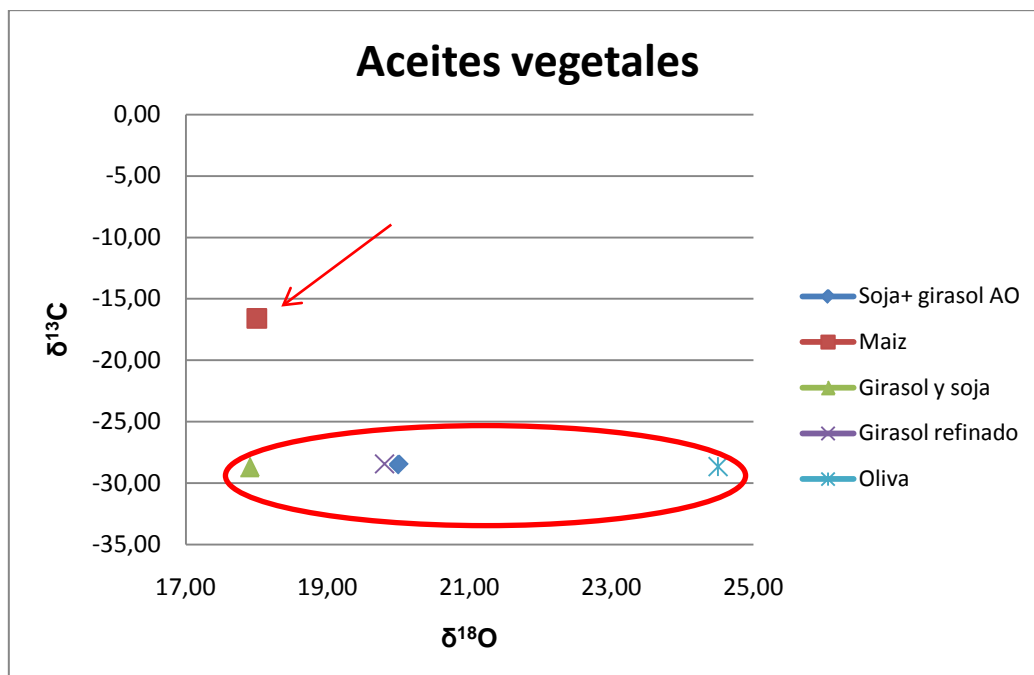


Figura 3.13. Comparación entre valores $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ de muestras de aceites vegetales con el valor medio de muestras de aceites de oliva.

Por lo tanto, la variedad de aceituna (para aceites de oliva) o de especie vegetal, parece influir en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$

4.2 INFLUENCIA DE LA CAMPAÑA

Si se comparan los resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las mismas muestras correspondientes a dos campañas consecutivas (H2 y H3), procedentes de la Cooperativa Hojiblanca (procedentes de la provincia de Córdoba y Málaga, principalmente), se observa una disminución (valores más negativos) para la campaña H3 con respecto a la H2 (Figura 3.14).

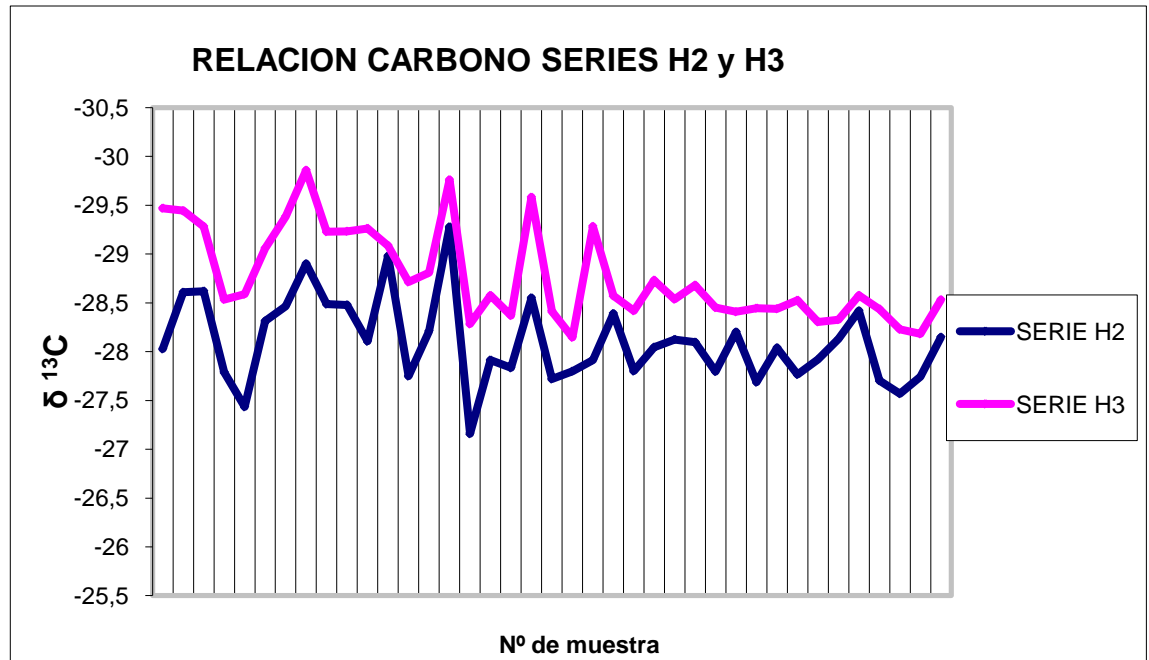


Figura 3.14. Influencia del año de cosecha en los resultados de $\delta^{13}C$ de dos campañas consecutivas, H2 y H3.

Si hacemos la misma comparación con las campañas H2, H3 y H4, observamos que la H4 parece situarse entre las otras dos (*Figura 3.15.*).

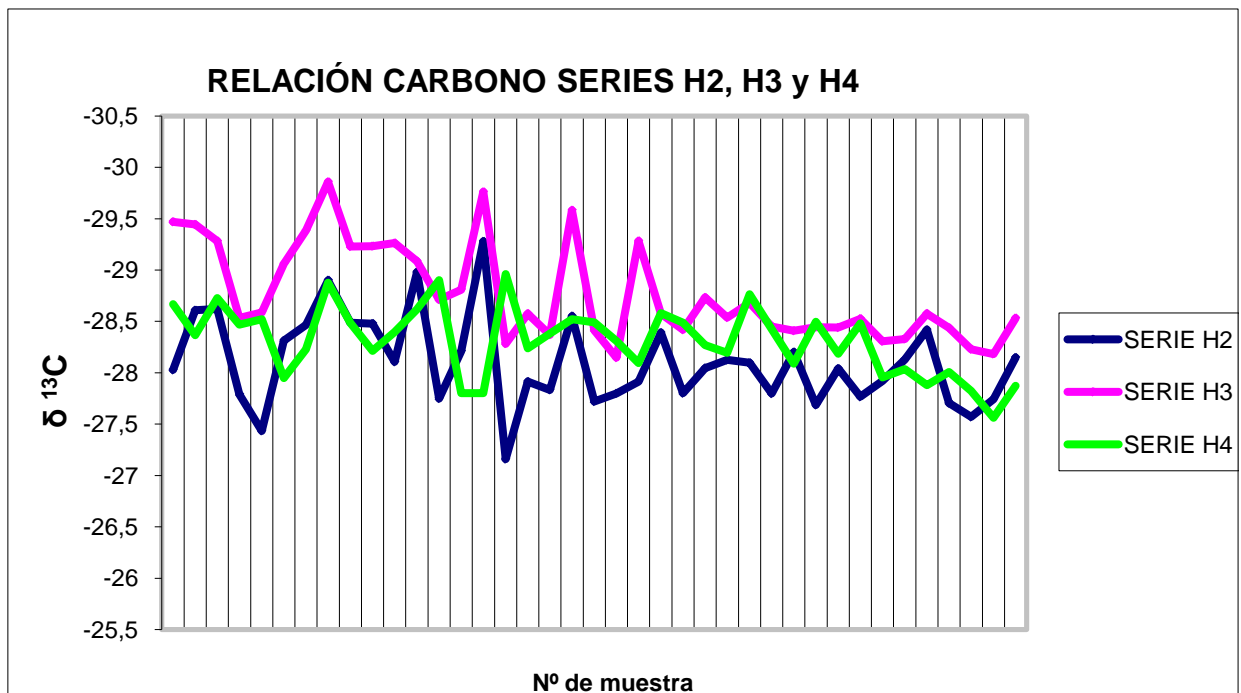


Figura 3.15. Influencia del año de cosecha en los resultados de $\delta^{13}C$ de tres campañas consecutivas; H2, H3 y H4.

Estas variaciones han de estar relacionadas con las condiciones climáticas, es decir, precipitaciones y temperatura.

La precipitación media en el año agrícola para la zona estudiada fue de 466.9, 536 y 527 m [37] para las campañas H2, H3 y H4, respectivamente. Así, el año de mayor precipitación (H3) presenta valores más bajos de $\delta^{13}\text{C}$ que el de menor precipitación (H2), situándose en una zona intermedia la campaña H4. Las temperaturas no presentan grandes variaciones entre los tres años.

4.3 INFLUENCIA DEL RIEGO

Los árboles que disponen de riego no sufren periodos de estrés hídrico como lo hacen aquéllos que no lo tienen. Mediante el contenido de $\delta^{13}\text{C}$ se puede conocer el estado hídrico de la planta [38,39]. Esta relación se debe a cambios en el intercambio de CO_2 entre la planta y la atmósfera [40], ya que en periodos de sequía, la planta cerrará sus estomas y su tejido se verá enriquecido con $\delta^{13}\text{C}$.

Si comparamos resultados obtenidos para las variedades Hojiblanca y Picual bajo condiciones de secano y de regadío (Tabla 3.4.) podemos observar que parece cumplirse lo descrito anteriormente.

Tabla 3.4. Comparación de valores $\delta^{13}\text{C}$ de las variedades Hojiblanca y Picual bajo condiciones de regadío y secano.

Serie	Variedad	RI	Sistema cultivo	$\delta^{13}\text{C}$
G2	Picual	49	Riego goteo	-30.2
G4	Picual	49	Riego goteo	-29.9
G5	Picual	2	Riego goteo	-29.8
A2	Picual	48	Secano	-28.9
A3	Picual	48	Secano	-28.9
H2	Picual	media*	Secano	-28.3
H3	Picual	media*	Secano	-29.2
H4	Picual	media*	Secano	-28.4
H5	Picual	media*	Secano	-29.1

DO4	Picual	5	Secano	-28.2
DO4	Picual	15	Secano	-28.9
DO4	Picual	21	Secano	-28.1
DO4	Picual	11	Secano	-28.0
DO5	Picual	11	Secano	-28.5
G2	Hojiblanca	56	Regadío	-28.8
G4	Hojiblanca	5	Regadío	-28.9
G5	Hojiblanca	5	Regadío	-29.0
DO4	Hojiblanca	2	Secano	-28.0
DO5	Hojiblanca	2	Secano	-28.0
H2	Hojiblanca	media*	Secano	-27.9
H3	Hojiblanca	media*	Secano	-28.4
H4	Hojiblanca	media*	Secano	-28.3
H5	Hojiblanca	media*	Secano	-28.6

*Valores medios

4.4 INFLUENCIA DE LA LATITUD Y DE LA ZONA GEOGRÁFICA

En las Figuras 3.16. a 3.19 se representan los valores medios en SAFA o MUFA determinados por GC en función de los valores medios de $\delta^{13}\text{C}$ para distintas DOPs, para las campañas 2007-2008 y 2008-2009. Las gráficas ponen de manifiesto la complementariedad entre las técnicas IRMS y GC. Así, a excepción de las muestras de la DOP Estepa, que presentan un contenido en SAFA superior (y menor en MUFA) a las de las otras DOP estudiadas, el resto presenta valores medios en contenido en ácidos grasos muy similares, mientras que en algunos casos pueden ser distinguidas por $\delta^{13}\text{C}$ IRMS. Así, por ejemplo, en las dos campañas estudiadas (2007-2008 y 2008-2009), las muestras procedentes de las regiones más al norte (Montoro y Cazorla), se encuentran entre las de valores más bajos de $\delta^{13}\text{C}$. En la campaña la campaña 2008-2009, los datos IRMS de las DOPs Lucena, Antequera y Poniente de Granada son muy similares, lo cual puede deberse igualmente a su proximidad geográfica (Véase Figura 3.19), estando las dos primeras compuestas, principalmente, por la variedad Hojiblanca.

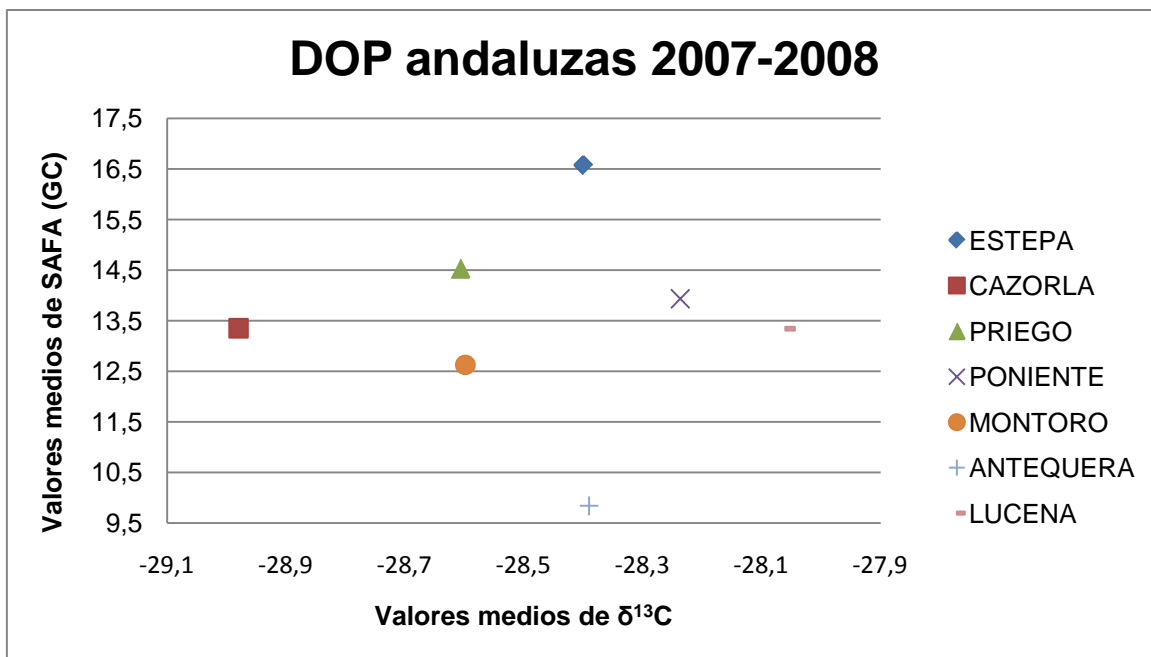


Figura 3.16. Representación de SAFA vs $\delta^{13}\text{C}$ para diversas DOPs andaluzas en la campaña 2007-2008.

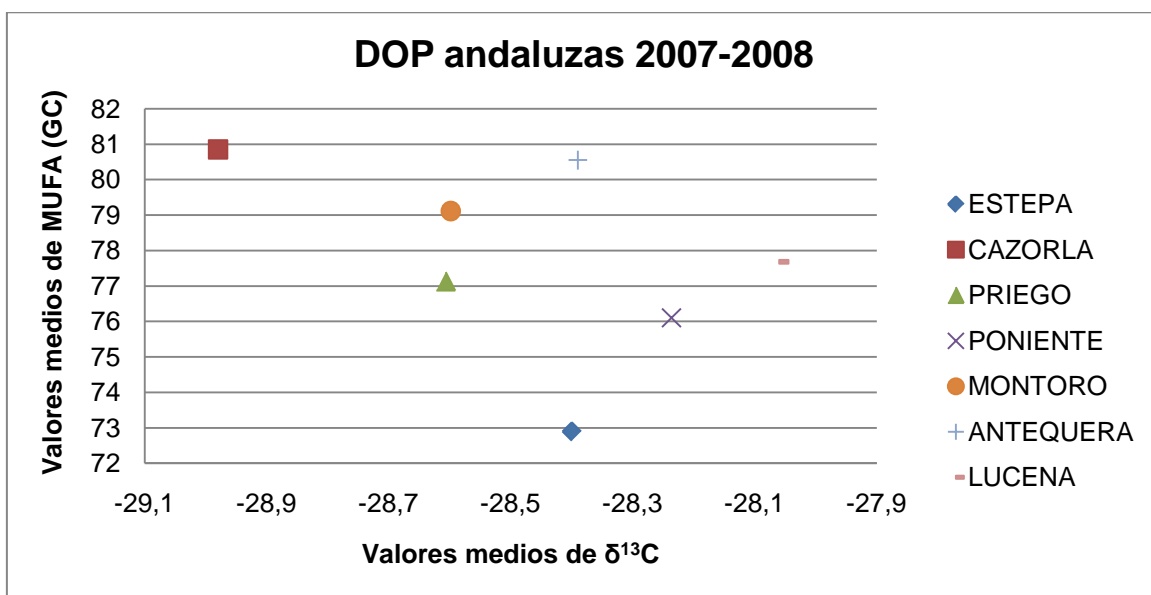


Figura 3.17. Representación de MUFA vs $\delta^{13}\text{C}$ para diversas DOPs andaluzas en la campaña 2007-2008.

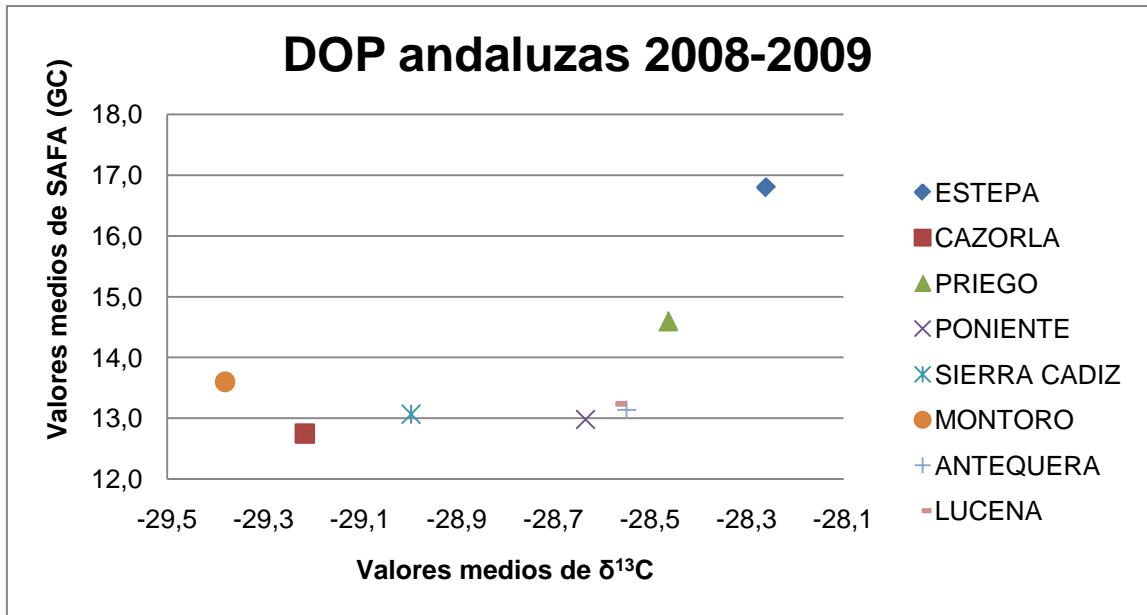


Figura 3.18. Representación de SAFA vs $\delta^{13}\text{C}$ para diversas DOPs andaluzas en la campaña 2008-2009.

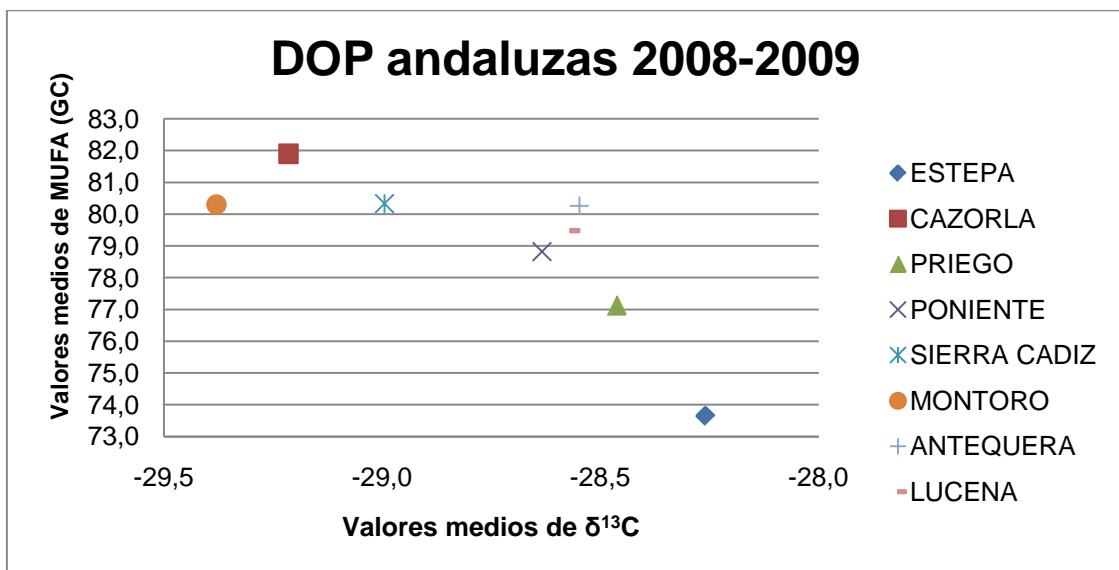


Figura 3.19. Representación de MUFA vs $\delta^{13}\text{C}$ para diversas DOPs andaluzas en la campaña 2008-2009.

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, apareció publicado un artículo sobre contenido isotópico en oxígeno, carbono e hidrógeno para aceites italianos correspondientes a la campaña 2005-2006 [41], lo cual nos permitió comparar los resultados con los de aceites andaluces de dicha campaña [31].

Los autores distinguieron entre 4 regiones italianas que designaron como Norte, Centro, Sur 1 y Sur 2 (ver *Figura 3.20* y *Tabla 3.5*). A la vista de la *Figura 3.20.*, atendiendo a la situación geográfica, cabría pensar que los aceites más parecidos en composición isotópica a los aceites andaluces, habrían de ser los de la zona Sur 2. Esto es, en efecto, lo que se aprecia en la *Tabla 3.6* y en la *Figura 3.21*, si bien, los aceites pueden distinguirse mediante análisis isotópico, lo cual es indicativo de la aplicabilidad de la técnica IRMS para determinar la procedencia geográfica de alimentos.



Figura 3.20. Localización geográfica de los aceites italianos pertenecientes a la campaña 2005-2006 analizados por Camin y col [41].

Tabla 3.5. Datos de latitud, longitud y altitud de las zonas de procedencia de los aceites italianos y españoles comparados.

	LOCALIZACION	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD(m)	
ITALIA	NORTE	Trento	46°40" N	11°70" E	190
		Veneto	45°263" N	12°2020" E	1
		Lombardía	45°280" N	9°100" E	120
		Emilia Romagna	44°300" N	11°210" E	54
	CENTRO	Liguria	44°250" N	8°560" E	20
		Toscana	43°470" N	11°150" E	50
		Umbría	43°70" N	12°230" E	493
		Abruzos	42°210" N	13°240" E	714
		Lacio	41°540" N	12°300" E	37

	SUR 1	Campania	40°500" N	14°150" E	17
		Apulia	41°80" N	16°520" E	1
	SUR 2	Calabria	38°540" N	16°360" E	442
		Sicilia	38°70" N	13°220" E	-
ESPAÑA	Córdoba		37°530" N	4°460" O	120
	Málaga		36°4310" N	4°2512" O	6
	Jaén		37°460" N	3°4659" O	573
	Sevilla		37°220" N	5°590" O	7

Tabla 3.6. Comparación en el contenido de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{16}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ entre aceites italianos y españoles.

Procedencia	Región	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$
Italia	Norte	20,2	-30,9	-159
Italia	Centro	22,3	-30,1	-153
Italia	Sur1	22,2	-29,6	-149
Italia	Sur2	24,5	-29,2	-148
España	Andalucía (variedad Picual)	24,3	-28,7	-141
España	Andalucía (variedad Hojiblanca)	23,8	-28,0	-140

NOTA: Los valores españoles corresponden a la media de los resultados para Picual y Hojiblanca considerando las series G2, A2 y H2. En el caso italiano, los datos son valores medios encontrados en la bibliografía [41].

COMPARACIÓN MEDIA ACEITES

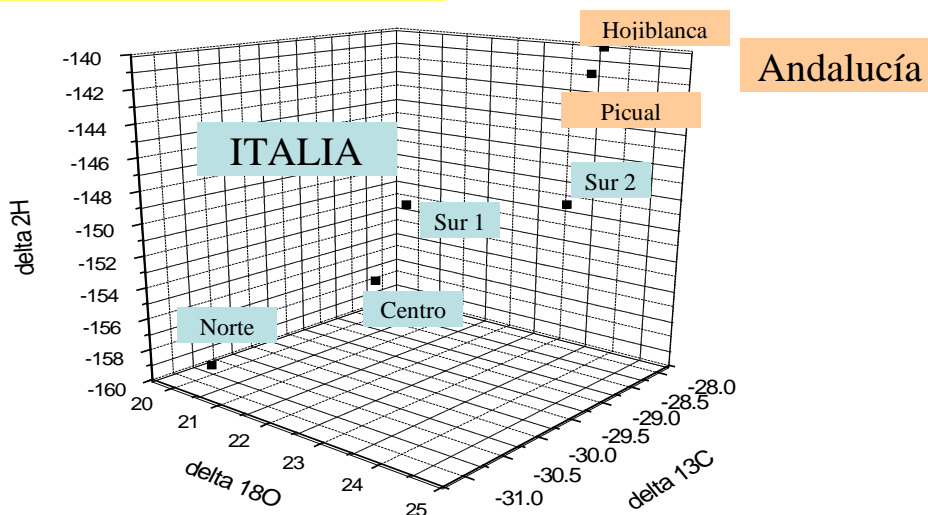


Figura 3.21. Representación en 3D de los valores medios para $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{16}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ de aceites italianos y españoles pertenecientes a la campaña 2005-2006.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Schmidt, T. C.; Zwank, L.; Elsner, M.; Berg, M.; Meckenstock, R. U.; Haderlein, S. B. Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: A critical review of the state of the art, prospects, and future challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378* (2), 283-300.
2. Philp, R. P.; Allen, J.; Kuder, T. The use of the isotopic composition of individual compounds for correlating spilled oils and refined products in the environment with suspected sources. *Environmental Forensics* **2002**, *3* (3-4), 341-348.
3. Peng, X.; Li, X. Assessment on transformation of organic pollutants in microcosms: A review. In *Microcosms: Ecology, Biological Implications and Environmental Impact*, Harris, C.C., Eds; Nova Science Publishers, Inc: New York, 2013; pp 85-105.
4. Wu, L.; Yao, J.; Trebse, P.; Zhang, N.; Richnow, H. H. Compound specific isotope analysis of organophosphorus pesticides. *Chemosphere* **2014**, *111*, 458-463.
5. Thullner, M.; Centler, F.; Richnow, H. H.; Fischer, A. Quantification of organic pollutant degradation in contaminated aquifers using compound specific stable isotope analysis - Review of recent developments. *Organic Geochemistry* **2012**, *42* (12), 1440-1460.
6. Ghosh, P.; Brand, W. A. Stable isotope ratio mass spectrometry in global climate change research. *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *228* (1), 1-33.
7. Rogers, K. M. Stable carbon and nitrogen isotope signatures indicate recovery of marine biota from sewage pollution at Moa Point, New Zealand. *Marine Pollution Bulletin* **2003**, *46* (7), 821-827.
8. Abraham, W. R. Applications and impacts of stable isotope probing for analysis of microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, *98* (11), 4817-4828.
9. Jasper, J. P.; Westenberger, B. J.; Spencer, J. A.; Buhse, L. F.; Nasr, M. Stable isotopic characterization of active pharmaceutical ingredients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, *35* (1), 21-30.
10. Magdas, D. A.; Cristea, G.; Bot, A.; Mirel, V. The use of carbon stable isotope ratios in drugs characterization. AIP Conference Proceedings. *9th International Conference on Processes in Isotopes and Molecules, PIM*. 2013; pp 282-284.
11. Kujawinski, D. M.; Zhang, L.; Schmidt, T. C.; Jochmann, M. A. When other separation techniques fail: Compound-specific carbon isotope ratio analysis of sulfonamide containing pharmaceuticals by high-temperature- liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2012**, *84* (18), 7656-7663.

12. Zonja, B.; Aceña, J.; Pérez, S.; Barceló, D. Methods for elucidation of transformation pathways: Identification of intermediate products, chiral, and isotope-ratio mass spectrometry analysis. *Comprehensive Analytical Chemistry* **2013**, *62*, 593-610.
13. Benson, S.; Lennard, C.; Maynard, P.; Roux, C. Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry - A review. *Forensic Science International* **2006**, *157* (1), 1-22.
14. Palhol, F.; Lamoureux, C.; Chabrilat, M.; Nault, N. ¹⁵N/¹⁴N isotopic ratio and statistical analysis: An efficient way of linking seized Ecstasy tablets. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *510* (1), 1-8.
15. Tea, I.; Antheaume, I.; Zhang, B. L. A test to identify cyanide origin by isotope ratio mass spectrometry for forensic investigation. *Forensic Science International* **2012**, *217* (1-3), 168-173.
16. Meier-Augenstein, W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1999**, *842* (1-2), 351-371.
17. Harvey, S. D.; Jarman, K. H.; Moran, J. J.; Sorensen, C. M.; Wright, B. W. Characterization of diesel fuel by chemical separation combined with capillary gas chromatography (GC) isotope ratio mass spectrometry (IRMS). *Talanta* **2012**, *99*, 262-269.
18. Kloppmann, W.; Leroux, L.; Bromblet, P.; Guerrot, C.; Proust, E.; Cooper, A. H.; Worley, N.; Smeds, S. A.; Bengtsson, H. Tracing medieval and renaissance alabaster works of art back to quarries: A multi-isotope (Sr, S, O) approach. *Archaeometry* **2014**, *56* (2), 203-219.
19. Guo, Z. K.; Luke, A. H.; Lee, W. P.; Schoeller, D. Compound-specific carbon isotope ratio determination of enriched cholesterol. *Analytical Chemistry* **1993**, *65* (15), 1954-1959.
20. Godin, J. P.; Richelle, M.; Metairon, S.; Fay, L. B. [²H/¹H] Isotope ratio analyses of [²H/⁵]cholesterol using high-temperature conversion elemental analyser isotope-ratio mass spectrometry: determination of cholesterol absorption in normocholesterolemic volunteers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18* (3), 325-330.
21. Koletzko, B.; Demmelmair, H.; Hartl, W.; Kindermann, A.; Koletzko, S.; Sauerwald, T.; Sztanyi, P. The use of stable isotope techniques for nutritional and metabolic research in paediatrics. *Early Human Development* **1998**, *53* (SUPPL.), S77-S97.
22. Aguilera, R.; Catlin, D. H.; Becchi, M.; Phillips, A.; Wang, C.; Swerdloff, R. S.; Pope, H. G.; Hatton, C. K. Screening urine for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstane diols. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1999**, *727* (1-2), 95-105.
23. Becchi, M.; Aguilera, R.; Farizon, Y.; Flament, M. M.; Casabianca, H.; James, P. Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1994**, *8* (4), 304-308.

24. Shackleton, C. H. L.; Roitman, E.; Phillips, A.; Chang, T. Androstenediol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: Potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry. *Steroids* **1997**, *62* (10), 665-673.
25. Cawley, A.; Collins, M.; Kazlauskas, R.; Handelsman, D. J.; Heywood, R.; Longworth, M.; Arenas-Queralt, A. Stable isotope ratio profiling of testosterone preparations. *Drug Testing and Analysis* **2010**, *2* (11-12), 557-567.
26. Thevis, M.; Piper, T.; Horning, S.; Juchelka, D.; Schänzer, W. Hydrogen isotope ratio mass spectrometry and high-resolution/high-Accuracy mass spectrometry in metabolite identification studies: Detecting target compounds for sports drug testing. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2013**, *27* (17), 1904-1912.
27. Van Renterghem, P.; Polet, M.; Brooker, L.; Van Gansbeke, W.; Van Eenoo, P. Development of a GC/C/IRMS method - Confirmation of a novel steroid profiling approach in doping control. *Steroids* **2012**, *77* (11), 1050-1060.
28. Spangenberg, J. E.; Macko, S. A.; Hunziker, J. Characterization of Olive Oil by Carbon Isotope Analysis of Individual Fatty Acids: Implications for Authentication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (10), 4179-4184.
29. Brenna, J. T. Natural intramolecular isotope measurements in physiology: Elements of the case for an effort toward high-precision position-specific isotope analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, *15* (15), 1252-1262.
30. Esteban, L. *La Espectrometría de Masas en imágenes*; ACK Editores: Madrid. 1993.
31. Aramendía, M. A.; Marinas, A.; Marinas, J. M.; Sánchez, E.; Urbano, F. J.; Guillou, C.; Moreno Rojas, J. M.; Moalem, M.; Rallo, L. A nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C) and isotope ratio mass spectrometry (d^{13}C , d^2H and d^{18}O) study of andalusian olive oils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24* (10), 1457-1466.
32. Craig, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1957**, *12* (1-2), 133-149.
33. Aramendía, M. A.; Marinas, A.; Marinas, J. M.; Moreno, J. M.; Moalem, M.; Rallo, L.; Urbano, F. J. Oxygen-18 measurement of Andalusian olive oils by continuous flow pyrolysis/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21* (4), 487-496.
34. Moalem, M. Tesis Doctoral: Aplicación de las técnicas de SIRMS y RMN (de ^1H y ^{13}C) a la trazabilidad del aceite de oliva. Universidad de Córdoba, 2007.
35. Serra, F.; Reniero, F.; Guillou, C. G.; Moreno, J. M.; Marinas, J. M.; Vanhaecke, F. ^{13}C and ^{18}O isotopic analysis to determine the origin of L-tartaric acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19* (10), 1227-1230.
36. Fronza, G.; Fuganti, C.; Grasselli, P.; Reniero, F.; Guillou, C.; Breas, O.; Sada, E.; Rossmann, A.; Hermann, A. Determination of the ^{13}C Content of Glycerol

Samples of Different Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (2), 477-480.

37. <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/ria>. Accesible a 30-07-2014.
38. Farquhar, G. D.; O'Leary, M. H.; Berry, J. A. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **1982**, *9* (2), 121-137.
39. Farquhar, G. D.; Richards, R. A. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* **1984**, *11* (6), 539-552.
40. Schlesinger, W. H.; Bernhardt, E. S. *Biogeochemistry: an analysis of global change*; Academic press: USA, 2013.
41. Camin, F.; Larcher, R.; Perini, M.; Bontempo, L.; Bertoldi, D.; Gagliano, G.; Nicolini, G.; Versini, G. Characterisation of authentic Italian extra-virgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition. *Food Chemistry* **2010**, *118* (4), 901-909.

ANEXO 3.1. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS POR IRMS

Tabla 3.7. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras procedentes del Banco de Germoplasma para la campaña 2004-2005.

Serie	RI	Variedad	I. M.	$\delta^{13}\text{C}$
G1	1	Zaity	1	-28,4
G1	3	Zaity	3	-29,0
G1	6	Arbequina	3	-29,8
G1	9	Arbequina	3	-30,9
G1	12	Frantoio	3	-29,4
G1	14	Frantoio	3	-30,1
G1	15	Frantoio	4	-29,5
G1	16	Gordal Vélez Rubio	1	-29,6
G1	17	Gordal Vélez Rubio	2	-29,7
G1	18	Gordal Vélez Rubio	3	-29,7
G1	21	Gordal Vélez Rubio	3	-29,7
G1	25	Arbequina	2	-30,2
G1	26	Arbequina	3	-29,9
G1	27	Arbequina	4	-29,9
G1	29	Arbequina	3	-30,5
G1	33	Frantoio	4	-29,8
G1	35	Frantoio	3	-29,9
G1	37	Gordal Vélez Rubio	2	-29,8
G1	38	Gordal Vélez Rubio	3	-30,2
G1	39	Gordal Vélez Rubio	4	-29,4
G1	40	Gordal Vélez Rubio	2	-30,1
G1	41	Gordal Vélez Rubio	3	-29,6
G1	42	Gordal Vélez Rubio	4	-29,8
G1	48	Arbequina	3	-30,8
G1	51	Frantoio	3	-30,8
G1	52	Frantoio	4	-29,6
G1	54	Frantoio	3	-29,7
G1	55	Frantoio	4	-29,1
G1	57	Gordal Vélez Rubio	3	-29,7
G1	60	Gordal Vélez Rubio	3	-29,2
G1	62	Picual	4	-30,7
E1	63	Hojiblanca	3,7	-28,3
E1	64	Manzanilla	3,7	-28,1
E1	65	Arbequina	1,8	-29,8
S1	68	Sorani <i>antes de la lluvia</i>	3	-28,7
S1	70	Sorani <i>después de la lluvia</i>	5	-28,3
G1	72	Sorani	3,3	-28,3

I.M: Indice de madurez

Tabla 3.8. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para algunos aceites vegetales comerciales de la campaña 2004-2005.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
V1	76	Aceite de soja y girasol alto Oleico(Soy Plus- La Española)	-28,5
V1	77	Aceite de Maíz (Asuna- Koipe)	-16,6
V1	78	Aceite de Girasol y soja (Sojasol- Koipesol-Koipe)	-28,7
V1	79	Aceite refinado de Girasol(Fuensol- Mueloliva)	-28,4

Tabla 3.9. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras pertenecientes al Grupo Hojiblanca de la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
H2	1	Picual	-28,0
H2	2	Picual	-28,6
H2	3	Picual	-28,6
H2	4	Picual	-28,5
H2	5	Picual	-27,8
H2	6	Picual	-27,4
H2	7	Picual	-28,3
H2	8	Picual	-28,5
H2	9	Picual	-28,9
H2	10	Picual	-28,5
H2	11	Picual	-28,5
H2	12	Picual	-27,8
H2	13	Picual	-28,1
H2	14	Picual	-29,0
H2	15	Picual	-27,8
H2	16	Picual	-28,2
H2	17	Picual	-29,3
H2	18	Hojiblanca	-27,2
H2	19	Hojiblanca	-27,9
H2	20	Hojiblanca	-27,8
H2	21	Picual	-28,6
H2	22	Hojiblanca	-27,7
H2	23	Hojiblanca	-27,8
H2	24	Hojiblanca	-27,9
H2	25	Hojiblanca	-28,4
H2	26	Hojiblanca	-27,8
H2	27	Hojiblanca	-28,0
H2	28	Hojiblanca	-28,1
H2	29	Hojiblanca	-28,1
H2	30	Hojiblanca	-27,8
H2	31	Hojiblanca	-28,2
H2	32	Hojiblanca	-27,7
H2	33	Hojiblanca	-28,0
H2	34	Hojiblanca	-27,8
H2	35	Hojiblanca	-27,9
H2	36	Hojiblanca	-28,1
H2	37	Hojiblanca	-28,4
H2	38	Hojiblanca	-27,7
H2	39	Hojiblanca	-27,6
H2	40	Hojiblanca	-27,7
H2	41	Hojiblanca	-28,1
H2	42	Picual	-28,6

Tabla 3.10. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de altura, de la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	Latitud	Longitud	Altitud (m)	$\delta^{13}\text{C}$
A2	48	Picual	37°35 N	4°06 O	165	-28,9
A2	43	Picual	37°52 N	4°46 O	334	-28,9
A2	46	Picual	37°47 N	3°36 O	436	-29,5
A2	45	Picual	37°37 N	4°19 O	550	-27,9
A2	44	Picual	37°56 N	4°30 O	645	-28,3
A2	47	Picual	37°43 N	3°58 O	935	-28,5

Tabla 3.11. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras del banco de germoplasma de Córdoba correspondientes a la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
G2	49	Picual	-29,0
G2	50	Zaity	-29,0
G2	51	Zaity	-29,9
G2	52	Arbequina	-29,6
G2	53	Arbequina	-29,4
G2	54	Frantoio	-28,5
G2	55	Picual de Estepa	-27,7
G2	56	Hojiblanca	-28,8
G2	57	Koroneiki	-29,8
G2	58	Empeltre	-28,5
G2	59	Trylia	-28,8
G2	60	Sorani	-28,1

Tabla 3.12. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceites comerciales, de la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Observaciones	$\delta^{13}\text{C}$
B2	61	Variedad Nevadillo Negro, aceite ecológico (Pozoblanco) secano	-26,6
C2	62	Variedad Arbequina, M, Hacendado	-28,2
C2	63	Variedad Hojiblanca, M, Hacendado	-28,0
B2	64	Marca Olivalle: Cultivo Ecológico, Pozoblanco,	-27,1
C2	65	Variedad Picual M, Hacendado	-27,9
C2	66	Marca 1881 Osuna Sevilla, Mezcla de variedades	-27,9

Tabla 3.13. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceites del Grupo Hojiblanca de la campaña 2006-2007.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
H3	1	Picual	-29,5
H3	2	Picual	-29,4
H3	3	Picual	-29,3
H3	4	Picual	-28,9
H3	5	Picual	-28,5
H3	6	Picual	-28,6
H3	7	Picual	-29,1
H3	8	Picual	-29,4
H3	9	Picual	-29,9
H3	10	Picual	-29,2
H3	11	Picual	-29,2
H3	12	Picual	-29,1
H3	13	Picual	-29,3
H3	14	Picual	-29,1
H3	15	Picual	-28,7
H3	16	Picual	-28,8
H3	17	Picual	-29,8
H3	18	Hojiblanca	-28,3
H3	19	Hojiblanca	-28,6
H3	20	Hojiblanca	-28,4
H3	21	Picual	-29,6
H3	22	Hojiblanca	-28,4
H3	23	Hojiblanca	-28,1

*Espectrometría de masas de isótopos estables (IRMS)
aplicada al estudio de aceites de oliva*

H3	24	Hojiblanca	-29,3
H3	25	Hojiblanca	-28,6
H3	26	Hojiblanca	-28,4
H3	27	Hojiblanca	-28,7
H3	28	Hojiblanca	-28,5
H3	29	Hojiblanca	-28,7
H3	30	Hojiblanca	-28,5
H3	31	Hojiblanca	-28,4
H3	32	Hojiblanca	-28,4
H3	33	Hojiblanca	-28,4
H3	34	Hojiblanca	-28,5
H3	35	Hojiblanca	-28,3
H3	36	Hojiblanca	-28,3
H3	37	Hojiblanca	-28,6
H3	38	Hojiblanca	-28,4
H3	30	Hojiblanca	-28,2
H3	40	Hojiblanca	-28,2
H3	41	Hojiblanca	-28,5
H3	42	Picual	-29,1
H3	43	Hojiblanca	-28,2
H3	44	Hojiblanca	-28,3
H3	45	Hojiblanca	-28,5
H3	46	Hojiblanca	-28,3

Tabla 3.14. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceite de la variedad Picual, de distinta altitud, de la campaña 2006-2007.

Serie	RI	Variedad	Latitud	Longitud	Altitud (m)	$\delta^{13}\text{C}$
A3	48	Picual	37°35 N	4°06 O	165	-28,9
A3	50	Picual	37°52 N	4°46 O	334	-27,9
A3	51	Picual	37°47 N	3°36 O	436	-28,2
A3	52	Picual	37°37 N	4°19 O	550	-28,1
A3	53	Picual	37°56 N	4°30 O	645	-26,4
A3	47	Picual	37°43 N	3°58 O	935	-28,1

Tabla 3.15. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceite de oliva del banco de Germoplasma de Tarragona y de Jaén en la campaña 2006-2007.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
GT3	56	Arbequina	-29,3
GT3-S	57	Hojiblanca	-27,7
GT3-R	58	Hojiblanca	-27,8
GT3-S	59	Picual	-28,2
GT3-R	60	Picual	-28,1
G3	61	Arbequina	-29,5
G3	62	Picual	-29,4

S= Secano; R= Regadío

Tabla 3.16. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceite de oliva de regadío y de secano para la Campaña 2006-2007.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
B3-S	54	Nevadillo Negro	-27,5
B3-R	55	Hojiblanca	-29,1

Tabla 3.17. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceites del Grupo Hojiblanca, de la campaña 2007-2008.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
H4	1	Picual	-28,7
H4	2	Picual	-28,4
H4	3	Picual	-28,7
H4	4	Hojiblanca	-28,8
H4	5	Picual	-28,5
H4	6	Picual	-28,5
H4	7	Picual	-27,9
H4	8	Picual	-28,2
H4	9	Picual	-28,9
H4	10	Picual	-28,5
H4	11	Picual	-28,2
H4	12	Hojiblanca	-28,0
H4	13	Picual	-28,4
H4	14	Picual	-28,6
H4	15	Picual	-28,9
H4	16	Picual	-27,8
H4	17	Picual	-27,8
H4	18	Hojiblanca	-29,0
H4	19	Hojiblanca	-28,2
H4	20	Hojiblanca	-28,4
H4	21	Picual	-28,5
H4	22	Hojiblanca	-28,5
H4	23	Hojiblanca	-28,3
H4	24	Hojiblanca	-28,1
H4	25	Hojiblanca	-28,6
H4	26	Hojiblanca	-28,5
H4	27	Hojiblanca	-28,3
H4	28	Hojiblanca	-28,2
H4	29	Hojiblanca	-28,8
H4	30	Hojiblanca	-28,4
H4	31	Hojiblanca	-28,1
H4	32	Hojiblanca	-28,5
H4	33	Hojiblanca	-28,2
H4	34	Hojiblanca	-28,5
H4	35	Hojiblanca	-28,0
H4	36	Hojiblanca	-28,0
H4	37	Hojiblanca	-27,9
H4	38	Hojiblanca	-28,0
H4	39	Hojiblanca	-27,8
H4	40	Hojiblanca	-27,6
H4	41	Hojiblanca	-27,9
H4	42	Hojiblanca	-28,4
H4	43	Hojiblanca	-28,2
H4	44	Hojiblanca	-27,8
H4	45	Hojiblanca	-28,0
H4	46	Hojiblanca	-28,2
H4	47	Hojiblanca	-28,9

Tabla 3.18. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceites de los bancos de Germoplasma de la campaña 2007-2008.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
G4	1	Manzanilla de Sevilla	-29,1
G4	2	Picual	-29,4

*Espectrometría de masas de isótopos estables (IRMS)
aplicada al estudio de aceites de oliva*

G4	3	Frantoio	-29,1
G4	4	Sourani	-28,6
G4	5	Hojiblanca	-28,9
G4	6	Arbequina	-30,1
G4	7	Koroneiki	-29,2
G4	8	Zaity	-29,5
GT4-S	9	Hojiblanca	-27,7
GT4-R	10	Arbequina	-29,9
GT4-R	11	Picual	-28,9
GT4-S	12	Hojiblanca	-27,9
GT4-S	13	Picual	-28,5
GT4-S	14	Arbequina	-28,8
GT4-R	15	Arbequina	-28,3
GT4-S	16	Hojiblanca	-27,8
GT4-S	17	Arbequina	-28,8
GT4-R	18	Arbequina	-28,4
GT4-R	19	Arbequina	-28,5

Tabla 3.19. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceites procedentes de DOP de la campaña 2007-2008.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
DO4	1	Arbequina, Hojiblanca, Manzanilla, Lechín y Picual	-28,4
DO4	2	Hojiblanca	-28,0
DO4	3	Hojiblanca y Arbequina	-28,4
DO4	4	Arbequina	-28,4
DO4	14	Royal	-29,1
DO4	15	Picual	-28,9
DO4	16	Hojiblanca 100%	-28,4
DO4	17	Picudo 100%	-28,9
DO4	18	Hojiblanca 50%, Picudo 50%	-28,5
DO4	19	Lucio	-27,9
DO4	20	Picudo 70%, Hojiblanca 30%	-28,4
DO4	21	Picual	-28,1
DO4	22	Picudo	-28,5
DO4	23	Hojiblanca	-28,1
DO4	24	Picual	-28,4
DO4	25	Picual, Picudo y Hojiblanca (Ecológico)	-28,9
DO4	26	Picudo 100%	-28,1

Tabla 3.20. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceites del Grupo Hojiblanca, de la campaña 2008-2009.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
H5	1	Picual	-29,6
H5	2	Picual	-28,2
H5	3	Picual	-29,4
H5	4	Hojiblanca	-28,9
H5	5	Picual	-29,9
H5	6	Picual	-29,0
H5	7	Picual	-28,8
H5	8	Picual	-28,5
H5	9	Picual	-28,8
H5	10	Picual	-29,1
H5	11	Picual	-28,8

H5	12	Hojiblanca	-28,8
H5	13	Picual	-29,2
H5	14	Picual	-29,1
H5	15	Picual	-29,2
H5	16	Picual	-28,6
H5	17	Picual	-29,3
H5	18	Hojiblanca	-28,3
H5	19	Hojiblanca	-28,7
H5	20	Hojiblanca	-28,5
H5	21	Picual	-29,3
H5	22	Hojiblanca	-28,6
H5	23	Hojiblanca	-28,3
H5	24	Hojiblanca	-28,4
H5	25	Hojiblanca	-28,6
H5	26	Hojiblanca	-28,4
H5	27	Hojiblanca	-28,1
H5	28	Hojiblanca	-28,47
H5	29	Hojiblanca	-28,9
H5	30	Hojiblanca	-28,7
H5	31	Hojiblanca	-28,3
H5	32	Hojiblanca	-28,6
H5	33	Hojiblanca	-28,6
H5	34	Hojiblanca	-28,4
H5	35	Hojiblanca	-28,3
H5	36	Hojiblanca	-28,4
H5	37	Hojiblanca	-28,6
H5	38	Hojiblanca	-28,3
H5	39	Hojiblanca	-28,3
H5	40	Hojiblanca	-28,5
H5	41	Hojiblanca	-29,0
H5	42	Hojiblanca	-28,8
H5	43	Hojiblanca	-28,3
H5	44	Hojiblanca	-28,5
H5	45	Hojiblanca	-28,5
H5	46	Hojiblanca	-28,9
H5	47	Picual	-29,4

Tabla 3.21. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceites procedentes del banco de germoplasma para la campaña 2008-2009.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
G5	1	Manzanilla de Sevilla	-29,1
G5	2	Picual	-28,8
G5	3	Frantoio	-28,2
G5	4	Trylia	-28,5
G5	5	Hojiblanca	-28,0
G5	6	Arbequina	-29,4
G5	7	Empeltre	-31,5
G5	8	Zaiti	-28,9
G5	9	Picual de Estepa	-28,0

Tabla 3.22. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de aceites de Denominaciones de Origen para la campaña 2008-2009.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$
DO5	1	Arbequina, Hojiblanca, Manzanilla, Lechín y Picual	-28,3
DO5	2	Hojiblanca	-28,0

*Espectrometría de masas de isótopos estables (IRMS)
aplicada al estudio de aceites de oliva*

DO5	3	Hojiblanca y Arbequina	-28,2
DO5	4	Arbequina	-28,5
DO5	14	Royal	-28,9
DO5	15	Picual	-29,5
DO5	16	Hojiblanca 100%	-28,2
DO5	17	Picudo 100%	-28,7
DO5	18	Hojiblanca 50%, Picudo 50%	-28,5
DO5	19	Lucio- Regadío	-28,0
DO5	20	Picudo 70%, Hojiblanca 30%	-29,0
DO5	21	Picual- Regadío	-28,9
DO5	23	Hojiblanca	-28,9
DO5	24	Picual	-28,3
DO5	27	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	-29,1
DO5	28	Lechín, Manzanilla, Verdial, Hojiblanca(+), Picual, Alameña y Arbequina.	-29,3
DO5	29	Lechín, Manzanilla, Verdial, Hojiblanca(+), Picual, Alameña y Arbequina.	-28,8
DO5	30	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	-28,9
DO5	31	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	-29,0
DO5	32	Lechín(+), Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina	-28,9

Tabla 3.23. Resultados de $\delta^{18}\text{O}$ para las muestras procedentes del Banco de Germoplasma para la campaña 2004-2005.

Serie	RI	Variedad	I. M.	$\delta^{18}\text{O}$
G1	1	Zaity	1	24,2
G1	3	Zaity	3	24,4
G1	6	Arbequina	3	22,2
G1	9	Arbequina	3	22,6
G1	14	Frantoio	3	21,5
G1	16	Gordal Vélez Rubio	1	25,2
G1	17	Gordal Vélez Rubio	2	24,6
G1	18	Gordal Vélez Rubio	3	24,6
G1	21	Gordal Vélez Rubio	3	24,8
G1	25	Arbequina	2	21,6
G1	26	Arbequina	3	21,4
G1	27	Arbequina	4	21,8
G1	29	Arbequina	3	22,5
G1	33	Frantoio	4	21,5
G1	35	Frantoio	3	20,9
G1	37	Gordal Vélez Rubio	2	25,3
G1	38	Gordal Vélez Rubio	3	24,9
G1	39	Gordal Vélez Rubio	4	25,2
G1	40	Gordal Vélez Rubio	2	24,5
G1	41	Gordal Vélez Rubio	3	24,7
G1	42	Gordal Vélez Rubio	4	25,5
G1	48	Arbequina	3	22,3
G1	51	Frantoio	3	21,3
G1	52	Frantoio	4	22,0
G1	57	Gordal Vélez Rubio	3	24,8
G1	60	Gordal Vélez Rubio	3	24,0
G1	62	Picual	4	22,7

E1	63	Hojiblanca	3,7	23,8
E1	64	Manzanilla	3,7	25,4
E1	65	Arbequina	1,8	22,9
S1	68	Sorani antes de la lluvia	3	23,6
S1	70	Sorani después de la lluvia	5	24,0
G1	72	Sorani	3,3	23,5

I.M: Índice de madurez

Tabla 3.24. Resultados de $\delta^{18}\text{O}$ y para algunos aceites vegetales comerciales, de la campaña 2004-2005.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{18}\text{O}$
V1	76	Aceite de soja y girasol alto Oleico(Soy Plus- La Española)	20,0
V1	77	Aceite de Maíz (Asuna- Koipe)	18,0
V1	78	Aceite de Girasol y soja (Sojasol- Koipesol-Koipe)	17,9
V1	79	Aceite refinado de Girasol(Fuensol- Mueloliva)	19,8

Tabla 3.25. Resultados de $\delta^{18}\text{O}$ para las muestras pertenecientes al Grupo Hojiblanca, de la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{18}\text{O}$
H2	1	Picual	25,0
H2	2	Picual	23,9
H2	3	Picual	24,5
H2	4	Picual	23,5
H2	5	Picual	25,1
H2	6	Picual	25,2
H2	7	Picual	24,9
H2	8	Picual	23,7
H2	9	Picual	24,3
H2	10	Picual	23,8
H2	11	Picual	24,3
H2	12	Picual	24,6
H2	13	Picual	24,6
H2	14	Picual	23,9
H2	15	Picual	24,4
H2	16	Picual	24,5
H2	17	Picual	24,2
H2	18	Hojiblanca	25,0
H2	19	Hojiblanca	24,7
H2	20	Hojiblanca	23,3
H2	21	Picual	24,3
H2	22	Hojiblanca	23,9
H2	23	Hojiblanca	23,3
H2	24	Hojiblanca	23,9
H2	25	Hojiblanca	23,6
H2	26	Hojiblanca	23,5
H2	27	Hojiblanca	23,7
H2	28	Hojiblanca	23,4
H2	29	Hojiblanca	24,4
H2	30	Hojiblanca	23,7
H2	31	Hojiblanca	24,6
H2	32	Hojiblanca	23,5
H2	33	Hojiblanca	24,1
H2	34	Hojiblanca	24,0
H2	35	Hojiblanca	23,3
H2	36	Hojiblanca	23,5
H2	37	Hojiblanca	24,5
H2	38	Hojiblanca	22,3

*Espectrometría de masas de isótopos estables (IRMS)
aplicada al estudio de aceites de oliva*

H2	39	Hojiblanca	22,7
H2	40	Hojiblanca	23,0
H2	41	Hojiblanca	22,6
H2	42	Picual	24,7

Tabla 3.26. Resultados de $\delta^{18}\text{O}$ para las muestras de altura, de la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	Latitud	Longitud	Altitud (m)	$\delta^{18}\text{O}$
A2	48	Picual	37°35 N	4°06 O	165	26,0
A2	43	Picual	37°52 N	4°46 O	334	25,1
A2	46	Picual	37°47 N	3°36 O	436	22,9
A2	45	Picual	37°37 N	4°19 O	550	22,5
A2	44	Picual	37°56 N	4°30 O	645	24,0
A2	47	Picual	37°43 N	3°58 O	935	24,2

Tabla 3.27. Resultados de $\delta^{18}\text{O}$ y para las muestras del banco de germoplasma de Córdoba, correspondientes a la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{18}\text{O}$
G2	49	Picual	22,8
G2	50	Zaity	27,9
G2	51	Zaity	27,6
G2	52	Arbequina	22,4
G2	53	Arbequina	22,1
G2	54	Frantoio	22,5
G2	55	Picual de Estepa	25,4
G2	56	Hojiblanca	23,7
G2	57	Koroneiki	23,9
G2	58	Empeltre	23,5
G2	59	Trylia	24,2
G2*	60	Sorani	24,9

*Procedente del Banco de Germoplasma de Cabra (Córdoba)

Tabla 3.28. Resultados de $\delta^{18}\text{O}$ para las muestras de aceites comerciales, de la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Observaciones	$\delta^{18}\text{O}$
B2	61	Variedad Nevadillo Negro, aceite ecológico (Pozoblanco) secano	25,8
C2	62	Variedad Arbequina .M. Hacendado	23,7
C2	63	Variedad Hojiblanca .M. Hacendado	22,5
B2	64	Marca Olivalle: Cultivo Ecológico. Pozoblanco,	22,7
C2	65	Variedad Picual M. Hacendado	24,7
C2	66	Marca 1881 Osuna Sevilla. Mezcla de variedades	24,5

Tabla 3.29. Resultados de $\delta^2\text{H}$ de muestras del banco de germoplasma de Córdoba correspondientes a la campaña 2004-2005.

Serie	RI	Variedad	Índice de Madurez	$\delta^2\text{H}$
G1	25	Arbequina.	2	-147

G1	26	Arbequina	3	-145
G1	27	Arbequina	4	-144
G1	37	Gordal Vélez Rubio	2	-135
G1	38	Gordal Vélez Rubio	3	-139
G1	39	Gordal Vélez Rubio	4	-137
G1	42	Gordal Vélez Rubio	4	-140
**	68	Sorani (Siria)	3	-136
**	72	Sorani	3.3	-130

**Muestras de la campaña 2003-2004 procedentes de España y Siria de la misma variedad.

*Finca experimental en la provincia de Córdoba.

Tabla 3.30. Resultados de $\delta^2\text{H}$ de muestras del banco de germoplasma de Córdoba correspondientes a la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	Índice de Madurez	$\delta^2\text{H}$
G2	49	Picual	3	-142
G2	51	Zaity	3	-134
G2	53	Arbequina	3	-152
G2	55	Picual de Estepa	3	-144
G2	56	Hojiblanca	3	-153
G2*	60	Sorani	3	-136

*Banco de germoplasma de Cabra (Córdoba).

Tabla 3.31. Resultados de $\delta^2\text{H}$ de muestras de la variedad Picual obtenidas a distinta altura, correspondientes a la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	Latitud	Longitud	Altitud (m)	$\delta^2\text{H}$
A2	48	Picual	37°35 N	4°06 O	165	-132
A2	43	Picual	37°52 N	4°46 O	334	-136
A2	46	Picual	37°47 N	3°36 O	436	-152
A2	45	Picual	37°37 N	4°19 O	550	-139
A2	44	Picual	37°56 N	4°30 O	645	-139
A2	47	Picual	37°43 N	3°58 O	935	-145

Tabla 3.32. Resultados de $\delta^2\text{H}$ de muestras de la Cooperativa Hojiblanca, de Córdoba, correspondientes a la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	$\delta^2\text{H}$
H2	3	Picual	-136
H2	5	Picual	-142
H2	9	Picual	-143
H2	14	Picual	-140
H2	15	Picual	-143
H2	16	Picual	-142
H2	42	Picual	-136

*Espectrometría de masas de isótopos estables (IRMS)
aplicada al estudio de aceites de oliva*

H2	18	Hojiblanca	-141
H2	22	Hojiblanca	-146
H2	25	Hojiblanca	-142
H2	35	Hojiblanca	-137
H2	36	Hojiblanca	-134

CAPÍTULO 4.
ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL
APLICADA AL ESTUDIO DE ACEITES
DE OLIVA

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	221
2.	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)	222
2.1.	INTRODUCCIÓN	222
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	222
2.2.1.	Muestras.....	222
2.2.2.	Equipos y Software empleados para la obtención de los espectros.	223
2.2.3.	Estudio quimiométrico.....	226
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	228
2.3.1.	Quimiometría de datos IR: Implantación progresiva de factores PLS en el modelo de regresión.	229
2.3.2.	Validación cruzada: generalización de los resultados obtenidos. ...	237
2.3.3.	Estudio quimiométrico de espectros NIR de aceites de oliva adulterados con aceites vegetales de calidad inferior.	244
3.	ESPECTROSCOPIA RAMAN	251
3.1.	INTRODUCCIÓN	251
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	251
3.2.1.	Muestras.....	251
3.2.2.	Equipo utilizado para la obtención de espectros.	252
3.2.3.	Estudio quimiométrico.....	253
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	257
3.3.1.	Variable de respuesta cuantitativa: regresión	257
3.3.2.	Variable de respuesta cualitativa: análisis discriminante.	259
4.	BIBLIOGRAFÍA	268

CAPÍTULO 4. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL.

1. INTRODUCCIÓN

La espectroscopia vibracional incluye las técnicas no destructivas de IR y Raman, las cuales estudian los niveles de energía de vibración de las moléculas. Presentan alta selectividad, un alto grado de precisión, rapidez en el análisis y permiten recuperar la muestra, lo que las hace muy adecuadas para garantizar la calidad de los alimentos.

Estas técnicas generan espectros cuyas bandas, aisladas o solapadas, son el resultado de la vibración de uno o más enlaces químicos, por lo que contienen información de varias moléculas. Para poder interpretar los espectros de los aceites se recurre a los espectros de sustancias puras. En este caso, sería el estudio de los triglicéridos el que permite asignar las bandas a los distintos espectros.

En este capítulo se aborda la aplicación de las técnicas de IR (cercano y medio) y Raman, en combinación con procedimientos quimiométricos, en la determinación de ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA para muestras de aceite de oliva virgen extra y, en el caso de la espectroscopia NIR, mezclas de aceite de oliva virgen extra con diferentes proporciones de otros aceites vegetales (avellana, lino, girasol o maíz).

Asimismo, en el caso de la espectroscopia Raman, se estudia la posibilidad de discriminar entre aceites de oliva virgen extra en función de la campaña de recogida de la aceituna, variedad o procedencia (incluyendo el estudio de las DOPs).

2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)

2.1. INTRODUCCIÓN

En el *Apartado 5.2.1. del Capítulo 1*, se describe el fundamento de la espectroscopia infrarroja junto a sus ventajas, desventajas y aplicaciones a aceites de oliva. También se muestra la asignación de las diferentes señales NIR y MIR en un aceite de oliva (*Tabla 1.1. y Tabla 1.2.*, respectivamente), así como los espectros NIR y MIR típicos de una muestra de aceite de oliva virgen extra (*Figura 1.7. y Figura 1.9.*, respectivamente).

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Muestras

El estudio de datos IR (MIR y NIR) aquí descrito y que corresponde a la publicación en la revista SORT, aún en prensa, corresponde a 128 muestras, si bien se han analizado todas las campañas, de aceites de oliva virgen extra procedentes de distintas DOP andaluzas (Estepa, Sierra de Cazorla, Priego de Córdoba, Poniente de Granada, Montoro-Adamuz, Antequera y Sierra de Cádiz) (*Figura 1.4.*), pertenecientes a cuatro campañas consecutivas (desde 2007-2008 a 2010-2011), presentando un índice de madurez de 3. Las variedades estudiadas son, principalmente, Arbequina, Hojiblanca, Picual, Lechín, Manzanilla, Picudo y Royal.

En el estudio de aceites adulterados, con otros aceites vegetales de calidad inferior, mediante espectros NIR, se cuenta con 43 muestras, 15 de ellas corresponden a la DOP Estepa (correspondientes a las series DO4, DO5, DO6 y DO7) y las demás han sido obtenidas mediante la adicción de aceites de avellana, maíz, girasol y lino a la muestra 1DO7, en proporciones del 2, 10, 15, 25 y 75% de aceite vegetal. También se

dispone de la información correspondiente a dichos aceites vegetales puros, es decir, sin mezclar.

Todas las muestras de aceite son conservadas en el frigorífico para que no se alteren sus propiedades [1]. Los espectros NIR y MIR son obtenidos en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

2.2.2. Equipos y Software empleados para la obtención de los espectros

El equipo NIR utilizado es un espectrómetro Spectrum One NTS FT-NIR (Perkin Elmer LLC, Shelton, USA) (Figura 4.1.). Para este tipo de análisis se emplea una célula de transfectancia, que consiste en una cápsula de Petri de vidrio y un reflector hexagonal de aluminio (Figura 4.2.), con un paso de luz de 0,5 mm, aproximadamente, donde se coloca 1g de la muestra de aceite correspondiente e inmediatamente se procesa en el equipo anteriormente citado.



Figura 4.1. Espectrómetro Spectrum One NTS FT-NIR situado en el SCAI de la Universidad de Córdoba.



Figura 4.2. Portamuestras con reflector de aluminio y su colocación en el equipo.

Los espectros fueron recogidos mediante el Software Spectrum 5.0.1. (Perkin Elmer LLC, Shelton, EEUU). Para cada muestra se hicieron dos medidas, por lo que fueron empleados dos reflectores, previamente seleccionados por dar resultados prácticamente iguales. Los datos de cada muestra corresponden a la media de estas dos medidas, descartando así la influencia de los reflectores en la variabilidad de los resultados obtenidos. Como técnica para la corrección de la señal se ha empleado el suavizado, el cual intenta reducir el ruido aleatorio existente en la señal instrumental mediante ajuste por desplazamiento de la media de un pequeño intervalo de valores. La metodología de suavizado más empleada es la de Savitzky-Golay, en la que se usa un modelo de ajuste de mínimos cuadrados con una función polinómica aplicada sobre una ventana móvil de datos. Una vez pre-tratados los datos, estos son reducidos de 12370 puntos a 1237 (oscilando entre 800 y 2500 nm), para hacer más fácil su manejo. A partir de aquí los datos están listos para ser tratados con herramientas quimiométricas.

El equipo utilizado para la obtención de los espectro MIR es un espectrómetro Tensor 27 FTIR (Bruker Optics, Milán, Italia) (*Figura 4.3.*) acoplado a un dispositivo ATR compuesto por varios cristales de reflexión (ZnSe). Los análisis se realizan con el aceite a temperatura ambiente. Antes de analizar cada muestra, se realiza un *background* con la célula ATR seca y limpia. Se realiza un solo barrido por muestra, depositándose una gota de aceite en la célula de medida.

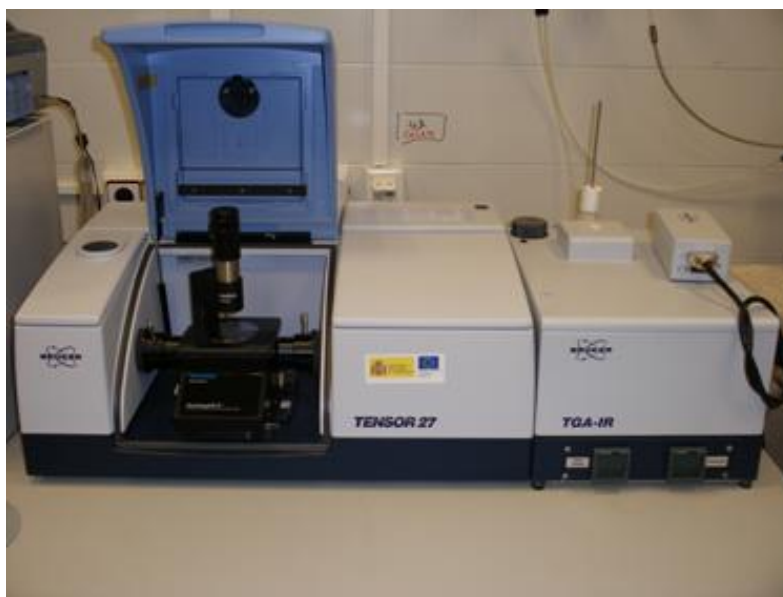


Figura 4.3. Espectrómetro Tensor 27 FTIR, para análisis MIR, situado en el SCAI de la Universidad de Córdoba.

El software utilizado para obtener los espectros MIR fue OPUS r. 5,0 (Bruker Optics), con una resolución de 2 cm^{-1} y 50 acumulaciones por muestra. Los espectros MIR son registrados entre 600 y 4000 cm^{-1} , presentando picos bien resueltos (3100 - 1721 cm^{-1}) y picos solapados (1500 - 700 cm^{-1}). El número de puntos medido para cada muestra es de 1843. Los pre-tratamientos a los que se someten estos espectros son suavizado y corrección de la línea base. Una vez pre-tratados, se les puede aplicar herramientas quimiométricas.

Se van a utilizar modelos estadísticos de regresión PLS, ya que se indica que son mejores que los PCA en el análisis multivariante de espectros NIR y MIR [2,3] para determinar el perfil en ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA de las muestras analizadas por IR (NIR, MIR y NIR-MIR concatenados), utilizando GC como técnica de referencia; esta metodología ha sido utilizada por otros autores [4-6]. Los factores PLS serán introducidos de forma progresiva en el modelo de regresión. Los modelos de regresión son evaluados en términos de bondad de ajuste y de capacidad predictiva. Los

software utilizados en las aplicaciones quimiométricas son Microsoft Excel, PASW Statistics (SPSS, IBM), Unscrambler (CAMO), MatLab y R-Project.

2.2.3. Estudio quimiométrico

Sean las observaciones, y_1, y_2, \dots, y_n de la variable dependiente, Y , y las correspondientes predicciones, $\hat{y}_1, \hat{y}_2, \dots, \hat{y}_n$, en un modelo de regresión. El error cuadrático medio de calibración (en inglés, mean squared error of calibration), está definido como $MSEC = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2/n$ y toma valores tanto más próximos a cero cuanto mejor es el ajuste (calibración). Sin embargo, MSEC es una medida no-dimensional, no acotada superiormente, dado que depende de las unidades de medida de la variable, por lo que es útil en la comparación de modelos cuyas variables están medidas en las mismas unidades más que en la medida en términos absolutos de la bondad de ajuste de un modelo.

Dadas las predicciones para las futuras t observaciones, $\hat{y}_{n+1}, \hat{y}_{n+2}, \dots, \hat{y}_{n+t}$, en un cierto modelo de regresión, el error cuadrático P medio de predicción (mean squared error of the prediction), $MSEP = \sum_{j=1}^t (y_{n+j} - \hat{y}_{n+j})^2/t$, evalúa la capacidad predictiva de dicho modelo de regresión (validación). Esta capacidad predictiva será tanto mejor cuanto más se aproxima MSEP a cero, teniendo en cuenta que esta medida tampoco está acotada superiormente dado que, al igual que MSEC, depende de las unidades de medida de la variable.

Tal y como indican Berrueta et al. [7] la situación ideal de cara a la evaluación de la capacidad predictiva de un modelo se produce cuando se cuenta con datos suficientes para crear un conjunto de validación (test data set) totalmente independiente del conjunto de calibración o entrenamiento (learning data set). Sin embargo, restricciones de tipo temporal o económico en los procesos de adquisición de datos

hacen que, habitualmente, conjuntos de validación obtenidos de forma independiente no estén disponibles.

Por este motivo, se utiliza como conjunto de validación una parte del conjunto de datos originales, reservado de cara a la obtención del modelo de regresión (de forma que pueda evitarse el sesgo asociado al hecho de que sean los mismos datos los que se utilizan en la obtención del modelo de regresión y los usados en la evaluación de las predicciones). Los procedimientos de validación cruzada (cross-validation) están diseñados para realizar este procedimiento repetidamente, empleando un algoritmo que, en cada iteración, modifica la partición del conjunto de datos originales en conjunto de calibración y conjunto de validación.

Además, partiendo de la filosofía introducida por Fisher en 1920 relativa al Análisis de la Varianza, Sánchez-Rodríguez et al. [8] proponen una descomposición de MSEP que permite estudiar más en profundidad las causas de los errores de predicción. Así, si \bar{y} y $\bar{\hat{y}}$ son las medias de las futuras t observaciones y de sus predicciones, s_Y y $s_{\hat{Y}}$ son las correspondientes desviaciones típicas y $s_{Y\hat{Y}}$ representa la covarianza, entonces MSEP puede ser expresado como

$$MSEP = \frac{1}{t} \sum_{j=1}^t (y_{n+j} - \hat{y}_{n+j})^2 = (\bar{y} - \bar{\hat{y}})^2 + (s_Y - s_{\hat{Y}}) + 2(s_Y s_{\hat{Y}} - s_{Y\hat{Y}}) =$$

$E_B + E_V + E_R$, o, equivalentemente, mediante la identidad

$$1 = \frac{E_B}{MSEP} + \frac{E_V}{MSEP} + \frac{E_R}{MSEP} = U_B + U_V + U_R$$

donde U_B es la parte de MSEP correspondiente al sesgo que originan los errores sistemáticos en la predicción; U_V indica la diferencia entre la variabilidad entre los valores reales y la variabilidad entre los valores predichos; finalmente, U_R muestra la variabilidad aleatoria en los errores de predicción.

Un modelo de regresión tiene un mejor poder predictivo a medida que MSEP se aproxima a cero (teniendo en cuenta que se trata de una medida no acotada superiormente). Sin embargo, usando la descomposición referida, si MSEP muestra un porcentaje grande atribuible a errores sistemáticos, este aspecto indica que existe una causa detectable que origina una fuente de variabilidad en la predicción, por lo que el poder predictivo del modelo mejoraría si dicha causa fuese eliminada. Esta mejora no es factible si los errores de predicción presentan naturaleza aleatoria, dado que los errores aleatorios son inherentes a cualquier proceso de modelización y, por consiguiente, difíciles de eliminar.

En definitiva, la situación ideal en la evaluación de la capacidad predictiva de un modelo se produce cuando MSEP tiene un valor próximo a cero y, además, $U_B = 0$, es decir, no existen errores sistemáticos en la predicción; $U_V = 0$, aspecto que indica que la variabilidad entre los valores reales es la misma que entre las predicciones; y $U_R = 1$, hecho que pone de manifiesto la naturaleza aleatoria de las predicciones.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente, en el *Apartado 2.3.1*, se va a realizar la estimación de los ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA de los aceites de oliva por regresión PLS de NIR, MIR y matrices de datos NIR-MIR concatenadas. Los resultados de la calibración y validación dependen del número de factores PLS en el modelo de regresión. Estos resultados se comparan para las tres matrices de datos y tipos de ácidos grasos. Se analiza la aleatoriedad de los errores de predicción por una descomposición de MSEP. Posteriormente, en el *Apartado 2.3.2*, los resultados anteriores se generalizan mediante el uso de procedimientos de validación cruzada, es decir, se cambia de forma iterativa la formación y los conjuntos de datos de prueba. Además, los diagramas tridimensionales

de dispersión permiten obtener conclusiones para las tres matrices de datos o tipos de ácidos grasos, simultáneamente. Por último, en el *Apartado 2.3.3*, se estudian aceites de oliva adulterados con otros aceites comestibles de calidad inferior mediante el tratamiento quimiométrico de espectros NIR.

2.3.1. Quimiometría de datos IR: Implantación progresiva de factores PLS en el modelo de regresión.

Las espectroscopias NIR y MIR proporcionan matrices de datos donde cada fila hace referencia a un aceite analizado (N=128, en total) y cada columna, a la longitud de onda o número de onda del espectro (pNIR=1237 y pMIR=1843). La información que proporcionan los datos NIR y MIR será resumida empleando regresión por mínimos cuadrados parciales o regresión PLS (en referencia a su denominación inglesa: partial least squares regression). Sánchez-Rodríguez et al. [8] ponen de manifiesto que esta técnica, empleada directamente sobre la matriz de datos NIR (considerada como matriz tipo caja negra, esto es, sin extraer dichas componentes por algunas zonas del espectro, por ejemplo, las determinadas mediante análisis clúster o las asociadas a los picos), proporciona una metodología muy potente para explicar el contenido del aceite en ácidos grasos. Esta técnica mejora considerablemente, en este contexto, los resultados obtenidos por regresión sobre las componentes principales o regresión PCA (Principal Component Analysis), si bien ambas metodologías proporcionan componentes o factores (combinación lineal de las variables originales) ortogonales entre sí, por lo que evitan la posible presencia de multicolinealidad (incompatible con la hipótesis de incorrelación en un modelo lineal general).

Respecto a las filas de las matrices de datos NIR y MIR, al igual que en la sección anterior, el 80% de ellas (las mismas consideradas en el tratamiento por RMN, descrito en el *Capítulo 5*) serán empleadas para calibración y el 20% restante, para

predicción. Inicialmente, se considera la matriz de datos NIR y se extraen componentes PLS. Dichas componentes serán introducción progresivamente en los modelo de regresión PLS que consideran el contenido en ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA como variables explicadas, respectivamente. Para cada número de componentes introducidas, se calculan los errores cuadráticos medios de calibración y predicción (MSEC y MSEP). Se repite el mismo proceso considerando, en segundo lugar, la matriz de datos MIR y, finalmente, la matriz concatenada NIR-MIR. Además, con la finalidad de determinar el carácter, sistemático o aleatorio, de los errores de predicción, se usa la descomposición de los errores cuadráticos medios de predicción obtenidos por los modelos de regresión sobre las componentes PLS de las matrices NIR, MIR y NIR-MIR (en los componentes U_B , U_V y U_R) para cada tipo de ácido graso.

Las *Figuras 4.4, 4.5. y 4.6.* representan los MSEC en la estimación de ácidos SAFA, MUFA y PUFA obtenidos a medida que se introducen, sucesivamente, componentes en el modelo de regresión, siendo obtenidas estas componentes a partir de las matrices NIR, MIR y concatenada NIR-MIR. Estas figuras muestran que, para los tres tipos de ácidos grasos, la matriz de datos NIR y la concatenada NIR-MIR proporcionan mejores resultados de calibración en modelos de regresión con un menor número de factores PLS. Pero la matriz MIR suministra mejores estimaciones con un número mayor de factores.

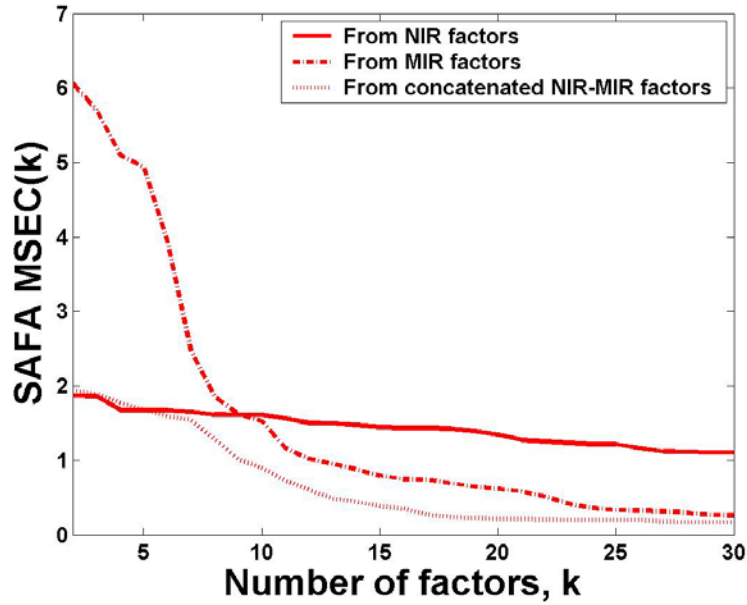


Figura 4.4. MSEC en la estimación de SAFA a partir de las componentes PLS de las matrices NIR, MIR y concatenada NIR-MIR.

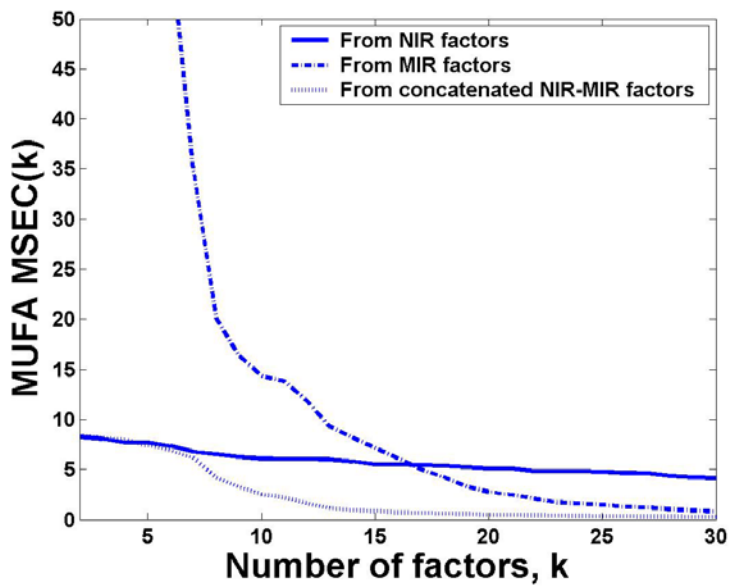


Figura 4.5. MSEC en la estimación de MUFA a partir de las componentes PLS de las matrices NIR, MIR y concatenada NIR-MIR.

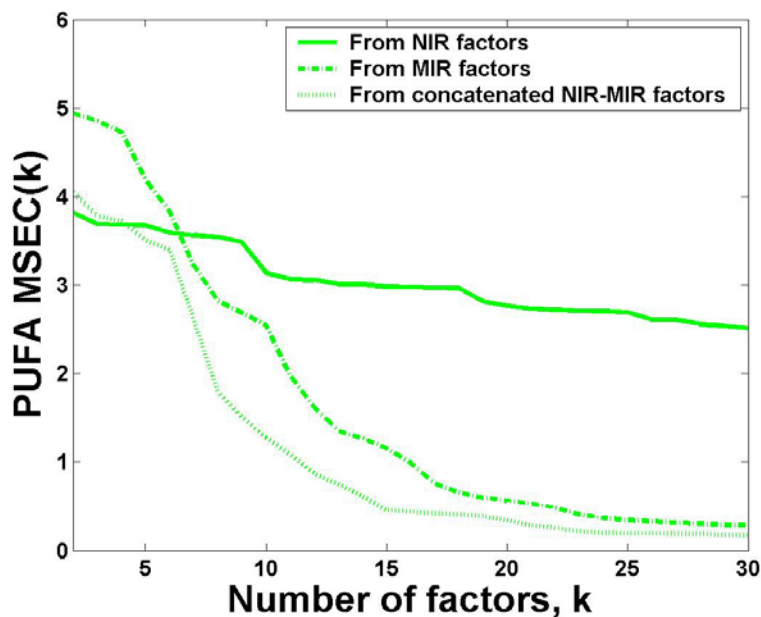


Figura 4.6. MSEC en la estimación de PUFA a partir de las componentes PLS de las matrices NIR, MIR y concatenada NIR-MIR.

Las Figuras 4.7, 4.8 y 4.9 representan, en el mismo contexto, los valores de MSEP en la predicción de ácidos SAFA, MUFA y PUFA. MSEP evalúa la capacidad de predicción de un modelo, teniendo en cuenta que las estimaciones se calculan usando observaciones que no están incluidas en el ajuste o calibración del modelo. Las conclusiones de la predicción son similares a las obtenidas en la calibración: los valores MSEP obtenidos a partir de datos MIR son menores que los obtenidos a partir de datos NIR cuando el número de factores PLS en el modelo es suficientemente alto, pero no para valores bajos.

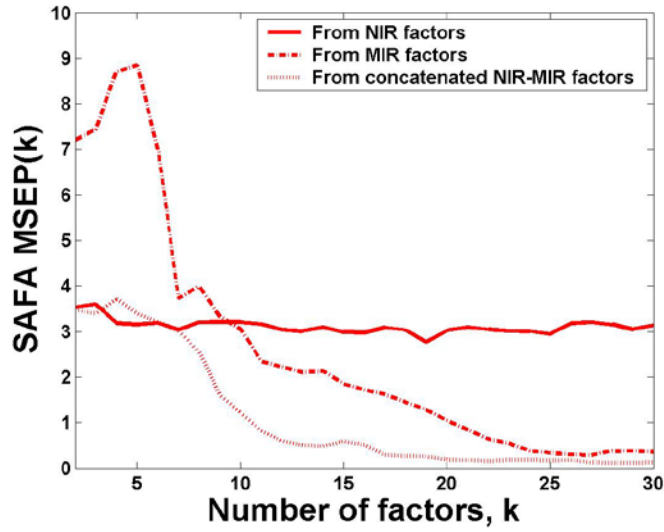


Figura 4.7. MSE P en la estimación de SAF A a partir de las componentes PLS de las matrices NIR, MIR y concatenada NIR-MIR.

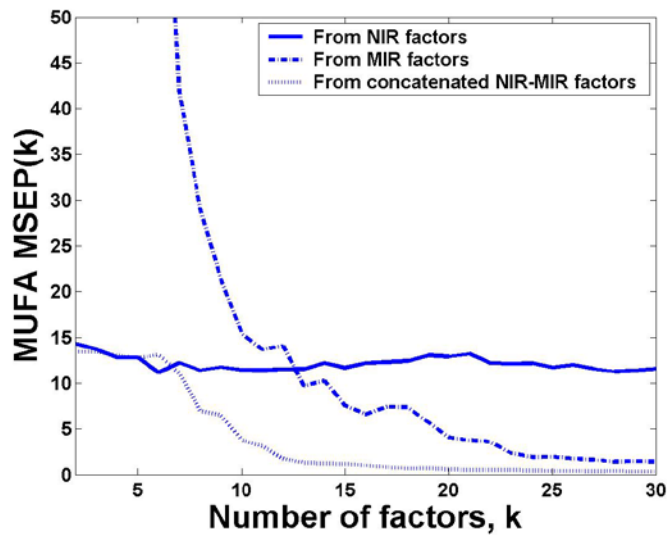


Figura 4.8. MSE P en la estimación de MUFA a partir de las componentes PLS de las matrices NIR, MIR y concatenada NIR-MIR.

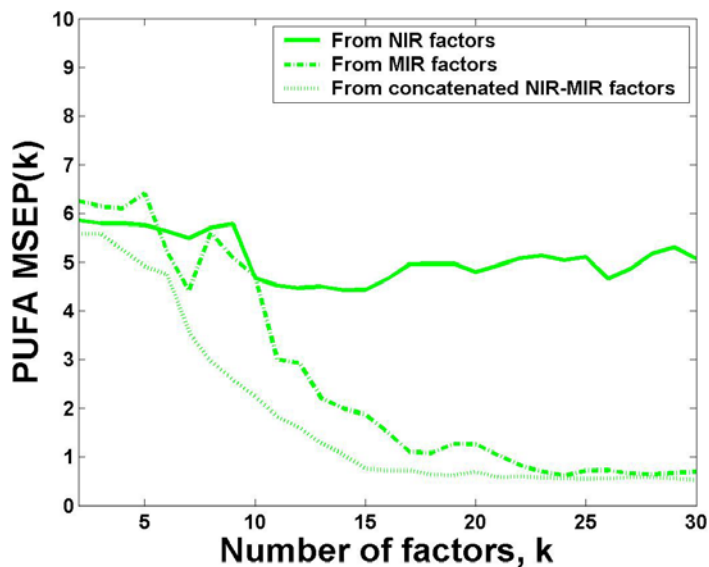


Figura 4.9. MSEP en la estimación de PUFA a partir de las componentes PLS de las matrices NIR, MIR y concatenada NIR-MIR.

Las Figuras 4.10, 4.11 y 4.12 muestran el término U_R en la descomposición de MSEP de los ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA, respectivamente. Este término representa la naturaleza aleatoria del error de predicción y, al igual que en gráficos anteriores, es expresado como una función del número de componentes PLS en el modelo. Las figuras ponen de manifiesto que el término U_R representa un gran porcentaje para cada caso, ya que es cercano a 1. Con respecto a la comparación de las técnicas, hay diferencias entre el uso de los datos de las matrices MIR, NIR o concatenadas NIR-MIR para la estimación de los ácidos grasos. Para un número alto de factores PLS en el modelo, el término U_R , en las tres matrices estudiadas, está muy próximo a 1. Pero para menor número de factores, el término U_R de la matriz MIR está más cercano a 1 en el caso de la estimación de los ácidos grasos SAFA y PUFA pero está más lejos de 1 en la estimación de ácidos grasos MUFA. En este último caso, la matriz de datos NIR proporciona mejores resultados.

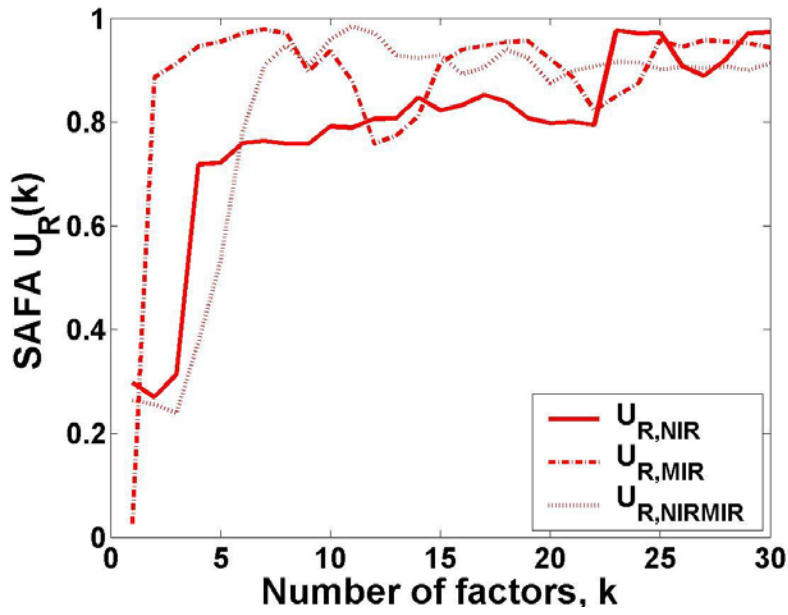


Figura 4.10. Término U_R de MSEP en la estimación de SAFA mediante componentes PLS de matrices NIR, MIR y concatenada NIR-MIR.

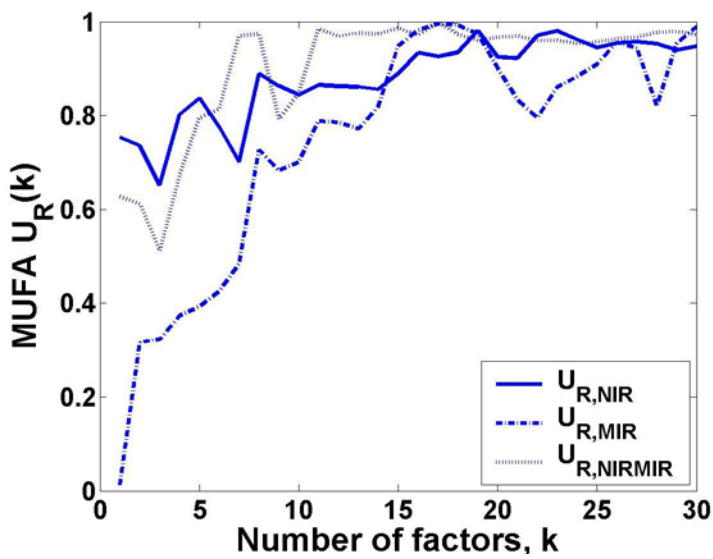


Figura 4.11. Término U_R de MSEP en la estimación de MUFA mediante componentes PLS de matrices NIR, MIR y concatenada NIR-MIR.

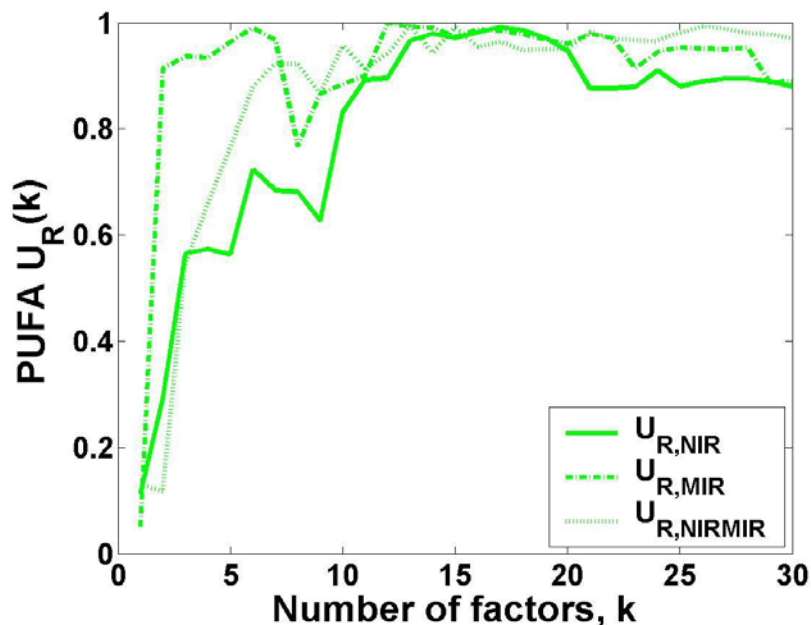


Figura 4.12. Término U_R de MSEP en la estimación de PUFA mediante componentes PLS de matrices NIR, MIR y concatenada NIR-MIR.

Los resultados sugieren que, en nuestras condiciones experimentales, una estimación más precisa de calibración y validación del contenido de SAFA, MUFA y PUFA en aceites de oliva virgen extra (tomando GC como técnica de referencia) se obtiene de la matriz NIR para un menor número de factores PLS. Para un mayor número de factores PLS, la matriz MIR proporciona los mejores resultados. Analizando la naturaleza de los errores de predicción, el porcentaje de ellos atribuible a causas aleatorias depende de la región de los espectros IR y del tipo de ácido graso estudiado. La matriz de datos MIR proporciona, en general, mejores resultados en la estimación de ácidos grasos SAFA y PUFA, con independencia del número de factores PLS en el modelo. Por el contrario, en la estimación de ácidos grasos MUFA, la matriz de datos NIR suministra mejores resultados, también de forma independiente del número de factores.

2.3.2. Validación cruzada: generalización de los resultados obtenidos.

En el apartado anterior, los datos originales han sido subdivididos en un único conjunto de calibración (conteniendo el 80% de los datos originales, concretamente, 102 de un total de 128 datos) y un único conjunto de validación (conteniendo el 20% restante de los datos, es decir, 26 datos). El conjunto de calibración se utiliza para entrenar el modelo de regresión. El conjunto de validación se utiliza para probar el modelo, utilizando los datos reservados en el ajuste del modelo. Con el objetivo de generalizar los resultados obtenidos previamente, se van a utilizar procedimientos de validación cruzada. Se llevan a cabo mediante un algoritmo repetitivo que, para cada iteración, modifique la partición en conjunto de calibración y de validación del conjunto de datos originales. Para cada iteración, se calculan MSEC y MSEP para evaluar, respectivamente, la bondad del ajuste y la capacidad predictiva del modelo correspondiente.

El modelo de validación cruzada ha sido implementado en 30 iteraciones, modificando, en cada una de ellas, los conjuntos considerados de calibración y validación. En este caso se comparan los resultados para un bajo número de factores PLS (5) y también para una gran número de ellos (30).

Las *Figuras 4.13 y 4.14* muestran los diagramas tridimensionales de dispersión para bondad de ajuste o la calibración en validación cruzada. Las nubes de puntos están asociadas a modelos con 5 y 30 factores PLS, respectivamente, representando $MSEC_{SAFA}$, $MSEC_{MUFA}$, y $MSEC_{PUFA}$ en los ejes x, y, z. A diferencia de las figuras representadas anteriormente, éstas permiten comparar, de forma global, los resultados obtenidos para los tres tipos de ácidos de forma simultánea. Para 5 factores PLS (*Figura*

4.13), la nube de puntos de MIR está más alejada del origen (0,0,0) que la correspondiente a NIR y NIR-MIR. Para 30 factores PLS (Figura 4.14), las conclusiones son las contrarias, en este caso, la estimación para datos NIR está asociada a valores altos de MSEC.

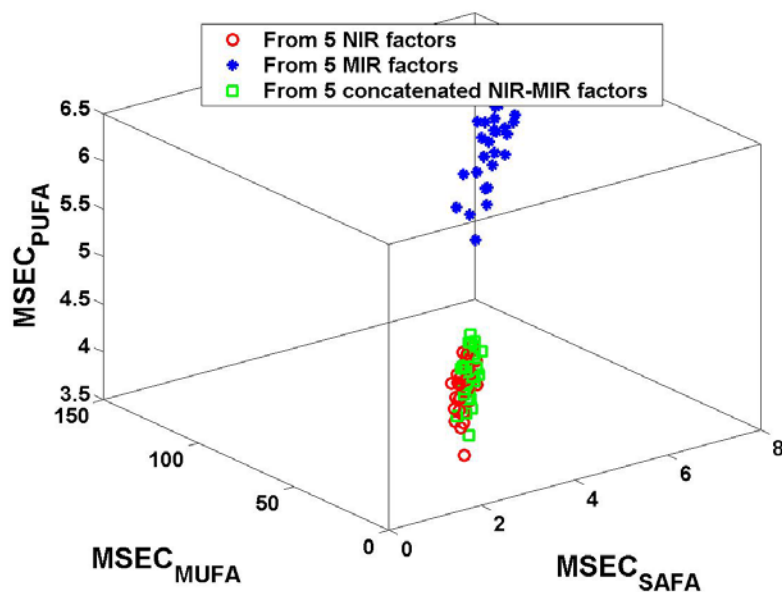


Figura 4.13. MSEC obtenido por el algoritmo de validación cruzada para datos NIR, MIR y NIR-MIR, (para SAFA, MUFA y PUFA) y 5 factores PLS.

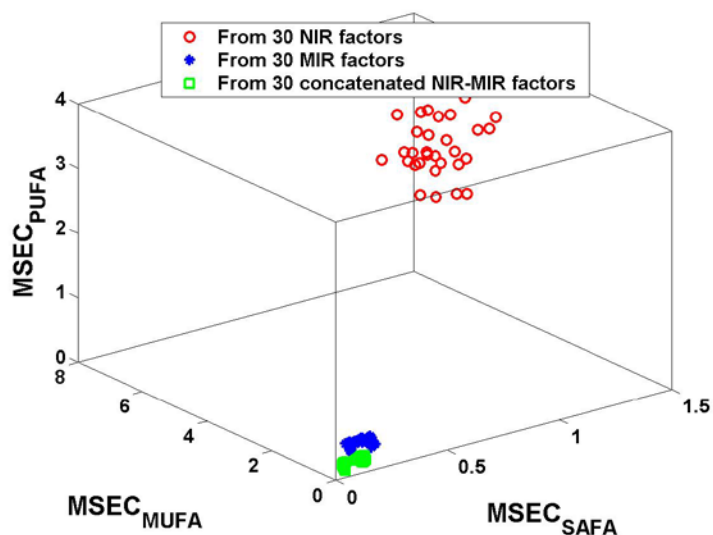


Figura 4.14. MSEC obtenido por el algoritmo de validación cruzada para datos NIR, MIR y NIR-MIR, (para SAFA, MUFA y PUFA) y 30 factores PLS.

Se obtienen las mismas conclusiones, para los tres tipos de ácidos grasos, si se comparan los modelos en términos de validación o predicción (usando MSEP, *Figuras 4.15 y 4.16*). Además, la variabilidad existente entre los valores MSEP es mayor para MIR que para las estimaciones NIR en los modelos con 5 factores PLS y menor para los modelos con 30 factores PLS.

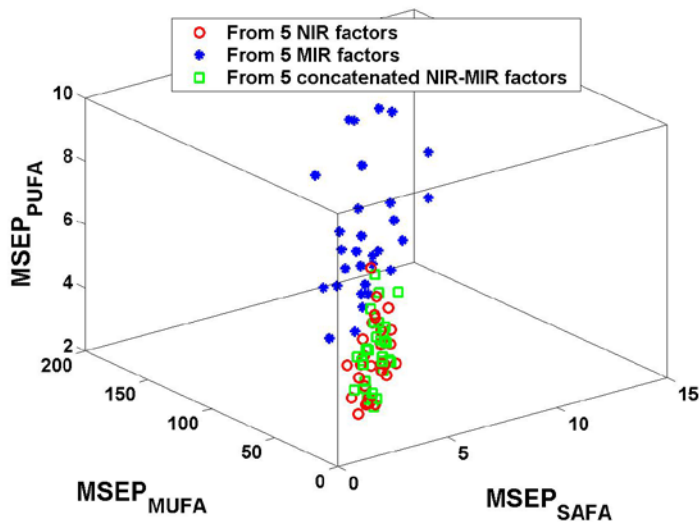


Figura 4.15. MSEP obtenido por el algoritmo de validación cruzada para datos NIR, MIR y NIR-MIR, (para SAFA, MUFA y PUFA) y 5 factores PLS.

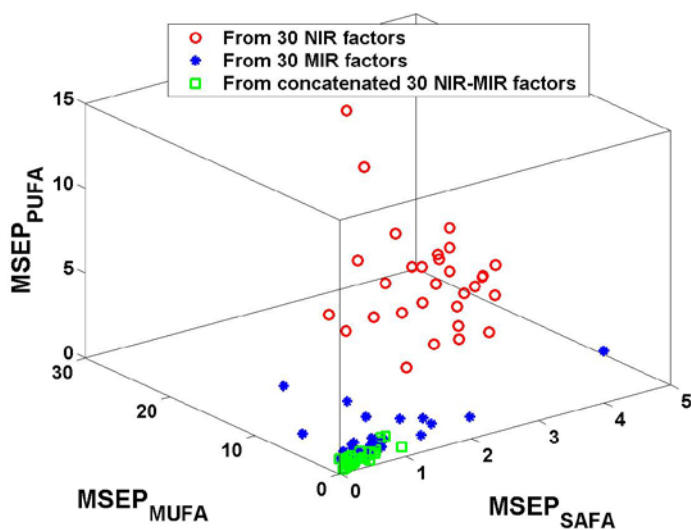


Figura 4.16. MSEP obtenido por el algoritmo de validación cruzada para datos NIR, MIR y NIR-MIR, (para SAFA, MUFA y PUFA) y 30 factores PLS.

Las Figuras 4.17, 4.18 y 4.19 representan, para cada tipo de ácido graso, la descomposición de MSEP en los términos de la U_B , U_V y U_R obtenidos, mediante el algoritmo de validación cruzada, para cada iteración. El objetivo es determinar la naturaleza, aleatoria o sistemática, de los errores de predicción. Las nubes de puntos representan los valores correspondientes a las matrices de datos NIR, MIR y concatenada NIR-MIR en los ejes x, y, z, respectivamente. Es evidente que, para cada caso, la componente aleatoria (U_R) es la más importante en la evaluación del carácter predictivo de un modelo.

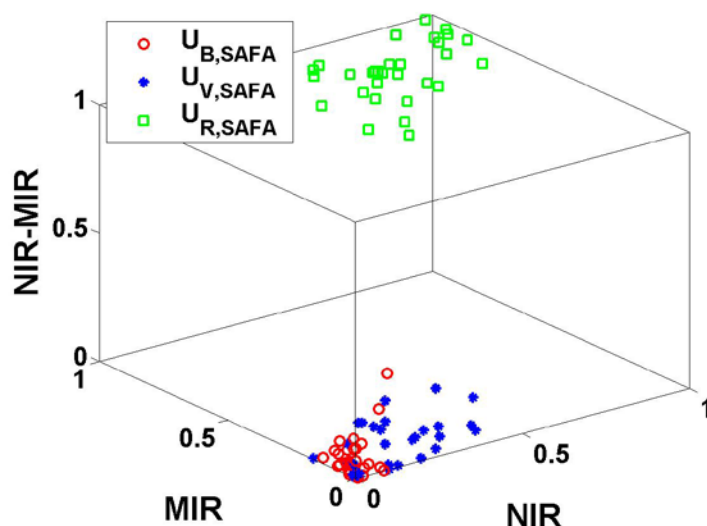


Figura 4.17. Descomposición de MSEP obtenido mediante el algoritmo de validación cruzada en la estimación de SAFA para componentes PLS de matrices de datos NIR, MIR y concatenadas NIR-MIR.

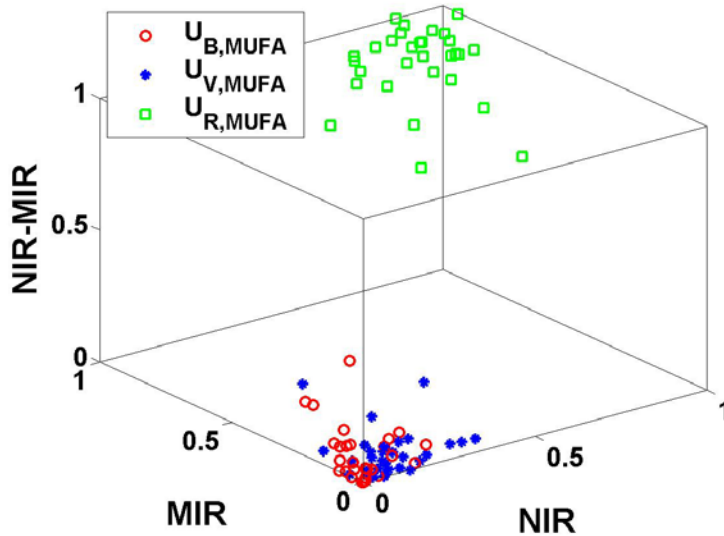


Figura 4.18. Descomposición de MSEP obtenido mediante el algoritmo de validación cruzada en la estimación de MUFA para componentes PLS de matrices de datos NIR, MIR y concatenadas NIR-MIR.

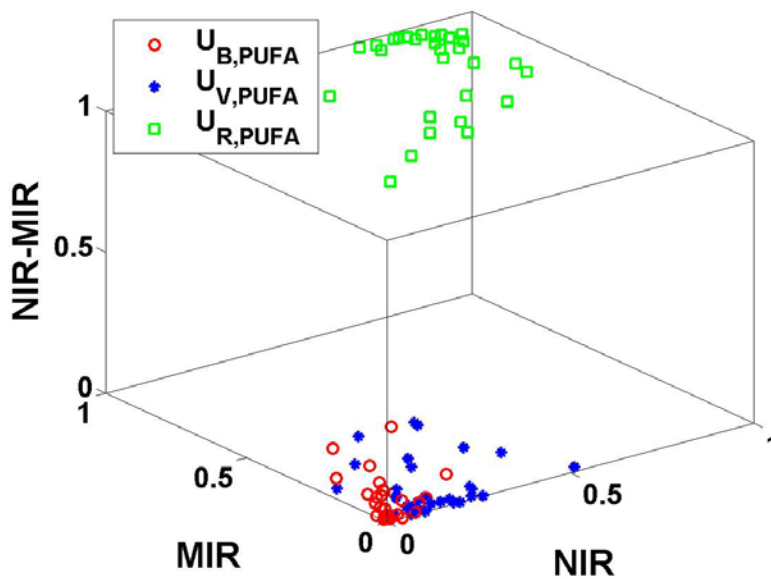


Figura 4.19. Descomposición de MSEP obtenido mediante el algoritmo de validación cruzada en la estimación de PUFA para componentes PLS de matrices de datos NIR, MIR y concatenadas NIR-MIR.

Finalmente, con el objetivo de confirmar las diferencias detectadas, previamente, en función del número de factores PLS en el modelo, las *Figuras 4.20 y 4.21* representan el término U_R asociado a los modelos con 5 y 30 factores, respectivamente. Los resultados muestran que el término U_R obtenido a partir de las matrices de datos

NIR, MIR y concatenada NIR-MIR es cercano a 1 en los modelos con un número relativamente elevado de factores (30). Pero en el modelo con bajo número de factores, los términos U_R para NIR y NIR-MIR son más bajos que los obtenidos para MIR.

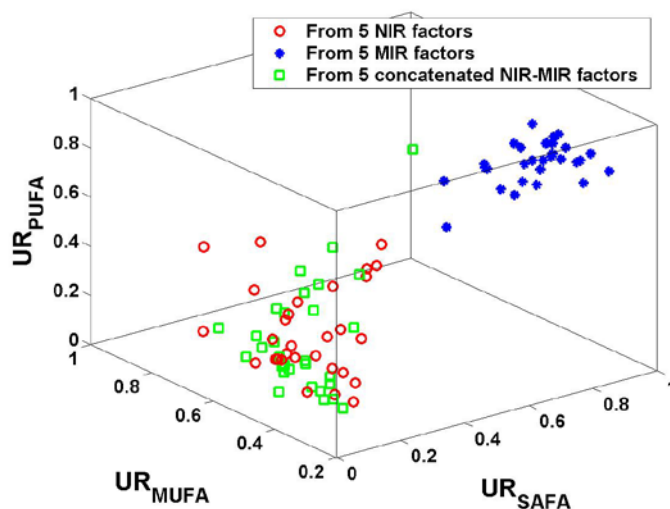


Figura 4.20. Término U_R de MSEP obtenido por el algoritmo de validación cruzada para datos NIR, MIR y concatenados NIR-MIR (para SAFA, MUFA y PUFA) para 5 factores.

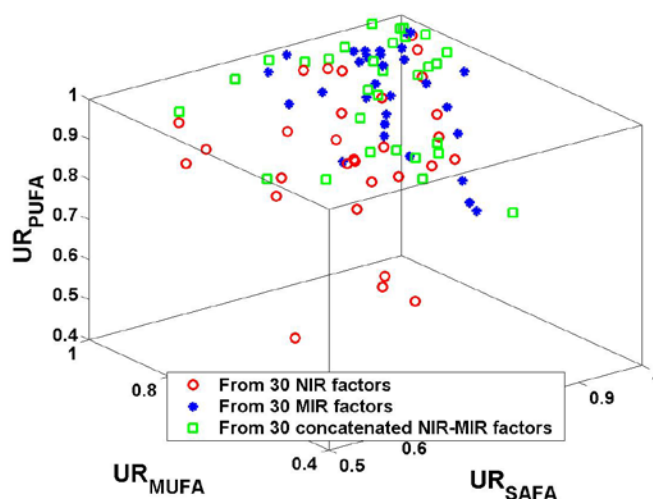


Figura 4.21. Término U_R de MSEP obtenido por el algoritmo de validación cruzada para datos NIR, MIR y concatenados NIR-MIR (para SAFA, MUFA y PUFA) para 30 factores.

Como conclusión, se ha de decir que la mejor estimación de la calibración o ajuste y validación o predicción se obtiene a partir de los datos NIR para un menor número de factores PLS y de los datos MIR para un número de factores mayor. Esto es importante a tener en cuenta, ya que los programas quimiométricos tienen un criterio de parada implementado para determinar el número de factores PLS. Estas conclusiones se generalizan a través de procedimientos de validación cruzada, los cuales comparan las estimaciones en términos de bondad de ajuste y predicción para distintos subgrupos calibración y validación.

En este estudio se han analizado, asimismo, los errores de predicción para determinar su naturaleza, sistemática o aleatoria. También, en este caso las conclusiones dependen del número de factores latentes PLS, del tipo de ácido graso y de la matriz de datos. Estas diferencias son detectadas por el término U_R , que representa el porcentaje de aleatoriedad en los errores de predicción. En general, independientemente del número de factores en el modelo de regresión, la zona MIR proporciona un valor más alto en la estimación de los ácidos grasos SAFA y PUFA. Pero, en la estimación de los ácidos MUFA, la matriz NIR da mejores estimaciones. En la representación tridimensional del término U_R para los tres tipos de ácidos grasos y zonas IR, este término está siempre cerca de 1 para un elevado número de factores PLS. Pero, para un número bajo de factores, el término U_R para NIR y NIR-MIR es claramente inferior al asociado a los datos del MIR.

2.3.3. Estudio quimiométrico de espectros NIR de aceites de oliva adulterados con aceites vegetales de calidad inferior.

En primer lugar, en la *Tabla 4.1* se muestran los contenidos medios en ácidos SAFA, MUFA y PUFA obtenidos por GC para el aceite de oliva virgen extra de la DOP Estepa y para los aceites de avellana, girasol, lino y maíz.

Tabla 4.1. Contenidos medios en ácidos SAFA, MUFA y PUFA.

Aceite \ Ácido graso	SAFA	MUFA	PUFA
IDO7	16,3	73,0	10,7
Avellana	8,0	81,5	10,5
Girasol	9,8	54,5	35,7
Lino	9,0	20,8	70,2
Maíz	13,7	32,4	53,9

En la *Figura 4.22* se representa la matriz de dispersión cruzando el contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA, dos a dos, para los aceites considerados y distinguiendo entre el tipo de aceite. Se intuye la existencia de una relación lineal decreciente clara entre el contenido MUFA y PUFA para todos los tipos de aceite. Con respecto a las relaciones SAFA-MUFA y SAFA-PUFA, la relación es simétrica (positiva y negativa, respectivamente) y depende del tipo de aceite considerado.



Figura 4.22. Matriz de dispersión del contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA.

A continuación, la *Figura 4.23* muestra el detalle de la *Figura 4.22* (Fila 2, columna 1) dibujándose los valores correspondientes a los ejes X (SAFA) e Y (MUFA) y etiquetándose los aceites asociados a la DOP Estepa como DO y las mezclas, por las correspondientes iniciales y el porcentaje de mezcla (por ejemplo, EA75: mezcla de aceite de Estepa (25%) y avellana (75%); EG50: mezcla de aceite de Estepa (50%) y girasol (50%); EM25: mezcla de Estepa (75%) y maíz (25%)...)

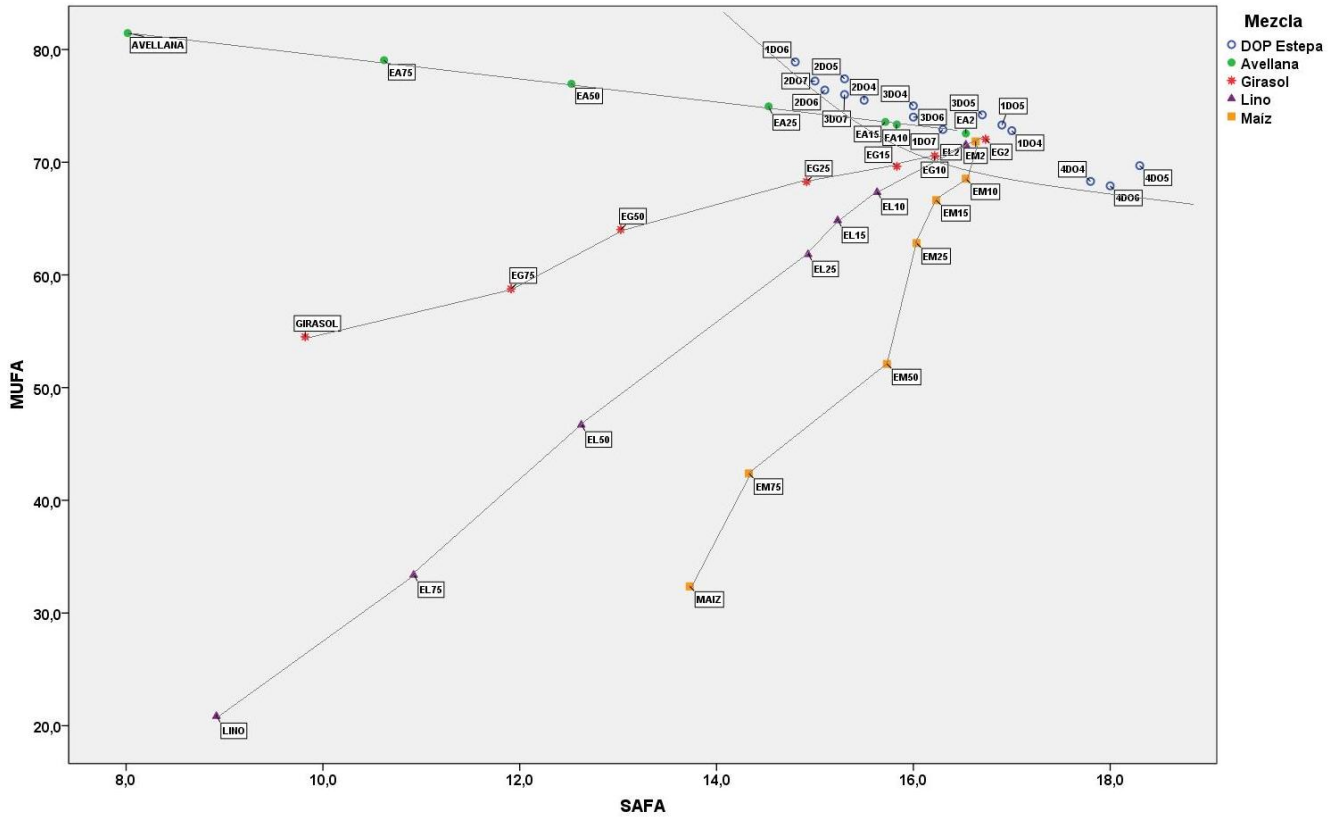


Figura 4.23. Diagrama de dispersión del contenido en ácidos SAFA y MUFA.

La Figura 4.24 representa el contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA para cada aceite, utilizando las referencias descritas anteriormente.

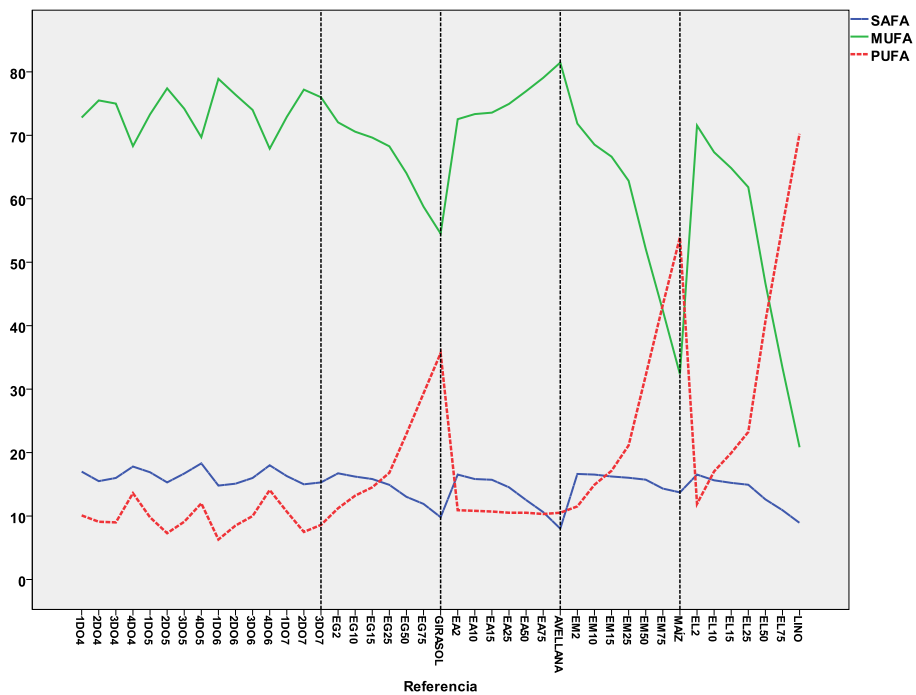


Figura 4.24. Representación del contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA.

Las siguientes conclusiones pueden obtenerse a partir de la *Tabla 4.1* y de las *Figuras 4.22, 4.23 y 4.24*:

- El aceite de lino es el más diferente al aceite DOP Estepa, siendo muy distantes sus contenidos en ácidos SAFA, MUFA y PUFA. En el aceite DOP Estepa, el contenido en ácidos MUFA es el mayoritario, superando el 70% de su composición; sin embargo, en el aceite de lino, el 70% del contenido se debe a ácidos PUFA.

El aceite de maíz también muestra unos contenidos en ácidos MUFA-PUFA claramente diferentes al aceite DOP Estepa, seguido del aceite de girasol. El aceite de avellana, el más similar al aceite DOP Estepa, muestra un contenido en ácidos MUFA ligeramente superior al contenido medio de dichos ácidos en DOP Estepa.

- Con respecto al análisis de las mezclas, se aprecia claramente en la *Figura 4.23* cómo los puntos correspondientes a las mezclas con aceite de avellana, girasol, lino y maíz se acercan progresivamente a la nube de puntos correspondiente a la DOP Estepa a medida que se reduce el porcentaje de adulteración (75, 50, 25, 15, 10 y 5%), tendiendo a igualarse los contenidos en ácidos SAFA y MUFA (y, por tanto, PUFA) paulatinamente.

Con lo anteriormente descrito se ha comprobado que el contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA del aceite puede ser un indicativo sobre su posible adulteración con otros aceites de calidad inferior. Para extraer la información de los espectros NIR se considera regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). En este caso, dado que el objetivo está en predecir el contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA se consideran las componentes o factores que muestran una correlación significativa con alguno de estos compuestos. Como puede observarse en la *Tabla 4.2*, las componentes PLS 1, 2, 4

y 5 muestran una correlación significativa¹ con el contenido en SAFA; las componentes 1, 2 y 3 (esta última para el nivel de significación $\alpha = 0,01$) están correlacionadas significativamente con el contenido en MUFA; finalmente, las componentes 1 y 2 están correlacionadas significativamente con el porcentaje en ácidos PUFA.

Tabla 4.2. Correlaciones entre el contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA y las cinco primeras componentes PLS.

		Correlaciones				
		PLS1	PLS2	PLS3	PLS4	PLS5
SAFA	Correlación de Pearson	,341**	-,561**	,038	-,423**	-,630**
	Sig. (bilateral)	,005	,000	,762	,000	,000
MUFA	Correlación de Pearson	,761**	-,936**	,245*	,210	,126
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,045	,089	,310
PUFA	Correlación de Pearson	-,764**	,962**	-,236	-,131	-,022
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,055	,291	,859

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

A continuación, la *Tabla 4.3* muestra los resultados del ajuste de modelos de regresión en los que se explica el contenido de los ácidos SAFA, MUFA y PUFA en función de las componentes o factores significativos² extraídos de entre los cinco primeros (PLS1,...,PLS5). Concretamente, la tabla muestra las estimaciones de los parámetros de las componentes PLS significativas, determinándose las que muestran una relación directa o inversa con el contenido en cada ácido graso, así como la probabilidad límite asociado. También se muestra el coeficiente de determinación, que

¹ El grado de correlación lineal entre dos variables es tanto mayor a medida que el coeficiente de correlación lineal de Pearson se aproxima a 1 en valor absoluto (será negativa o positiva en función del signo del coeficiente). Para determinar el grado de proximidad, se resuelve, en el contexto de la Inferencia Estadística, el siguiente contraste de hipótesis:

$$\begin{cases} H_0: r = 0 \\ H_1: r \neq 0 \end{cases}$$

En la *Tabla 4.2* se muestra la probabilidad límite asociada al contraste de cada coeficiente, indicándose los valores significativamente distintos de cero para los valores $\alpha = 0,05$ o $\alpha = 0,01$.

² El conocido como *principio estadístico de parsimonia* establece que, entre varios modelos de regresión similares en bondad de ajuste, siempre es preferible el más simple. Así, una vez estimados los parámetros de un modelo de regresión, se contrasta el hecho de que difieran significativamente de cero o no:

$$\begin{cases} H_0: \beta_k = 0 \\ H_1: \beta_k \neq 0 \end{cases}$$

para cada variable independiente k , con la finalidad de determinar si dicha variable es significativa en el modelo. En caso de que no lo sea, debería ser eliminada y el modelo, reajustado.

En la *Tabla 4.3* se muestra la probabilidad límite asociada al contraste de cada parámetro, considerándose únicamente las variables significativas para $\alpha = 0,05$.

indica el porcentaje de variabilidad de la variable dependiente que es explicado por cada modelo observándose que, en todos los casos, este porcentaje está muy próximo al 100% (todos los valores de R^2 están muy próximos a 1).

Tabla 4.3. Regresión del contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA sobre las cinco primeras componentes PLS.

	Estimación del parámetro de la componente PLS significativa y probabilidad límite	Coefficiente de determinación R^2
SAFA	Constante: 40,562 (0,00) PLS1: -90,391 (0,00) PLS2: -163,700(0,00) PLS4: -450,559 (0,00) PLS5: -1358,166(0,00)	0,958
MUFA	Constante: 48,691(0,00) PLS1: 65,496 (0,04) PLS2: -1111,101 (0,00) PLS3: 1168,425 (0,00) PLS4: 1537,846 (0,00) PLS5: 1697,905 (0,00)	0,996
PUFA	Constante: 17,845 (0,00) PLS2: 1258,764 (0,00) PLS3: -1167,071 (0,00) PLS4: -1021,598 (0,00) PLS5: -404,559 (0,00)	0,999

Los coeficientes de correlación de Pearson más elevados que pueden observarse en la *Tabla 4.2* se obtienen entre las parejas de valores: MUFA-PLS2 ($r = -0,936$) y PUFA-PLS2 ($r = 0,962$). Por este motivo, en la *Figura 4.25* se superponen, para cada aceite considerado, los valores tipificados o estandarizados³ del contenido de MUFA y las puntuaciones tipificadas obtenidas para el factor PLS2, cambiadas de signo (dado que la relación lineal es negativa). De igual forma, en la *Figura 4.26* se superpone el contenido tipificado en ácidos PUFA y las puntuaciones PLS2 tipificadas.

³ Es decir, restando la correspondiente media y dividiendo entre la desviación típica, con el objetivo de eliminar el efecto de las unidades de medida de la variable y facilitar las comparaciones.

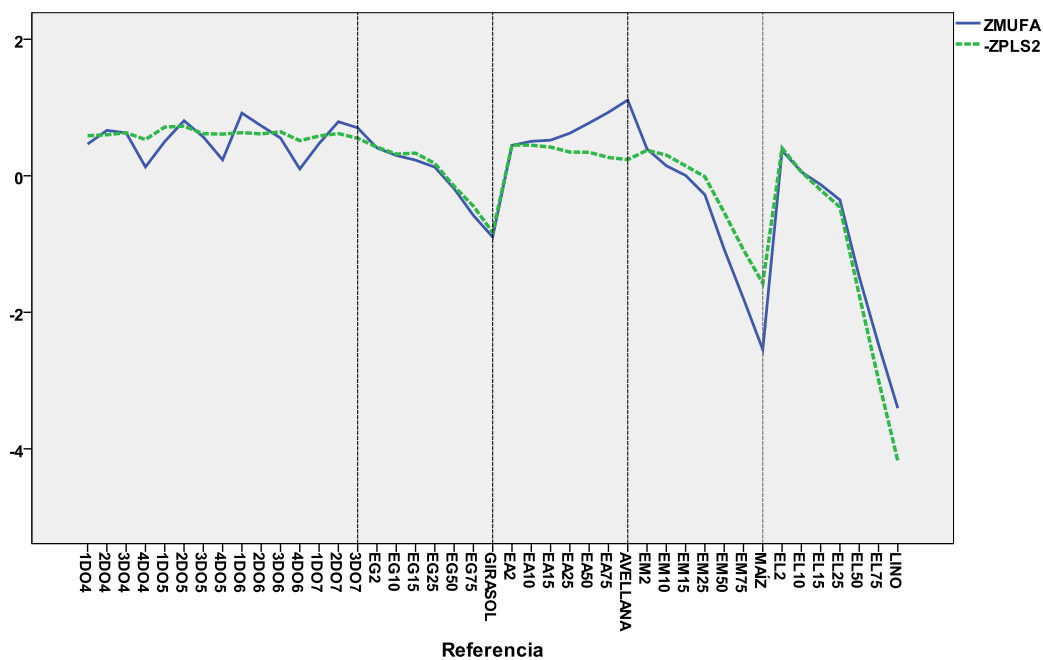


Figura 4.25. Contenido en ácidos MUFA y puntuaciones PLS2 (cambiadas de signo), ambos tipificados.

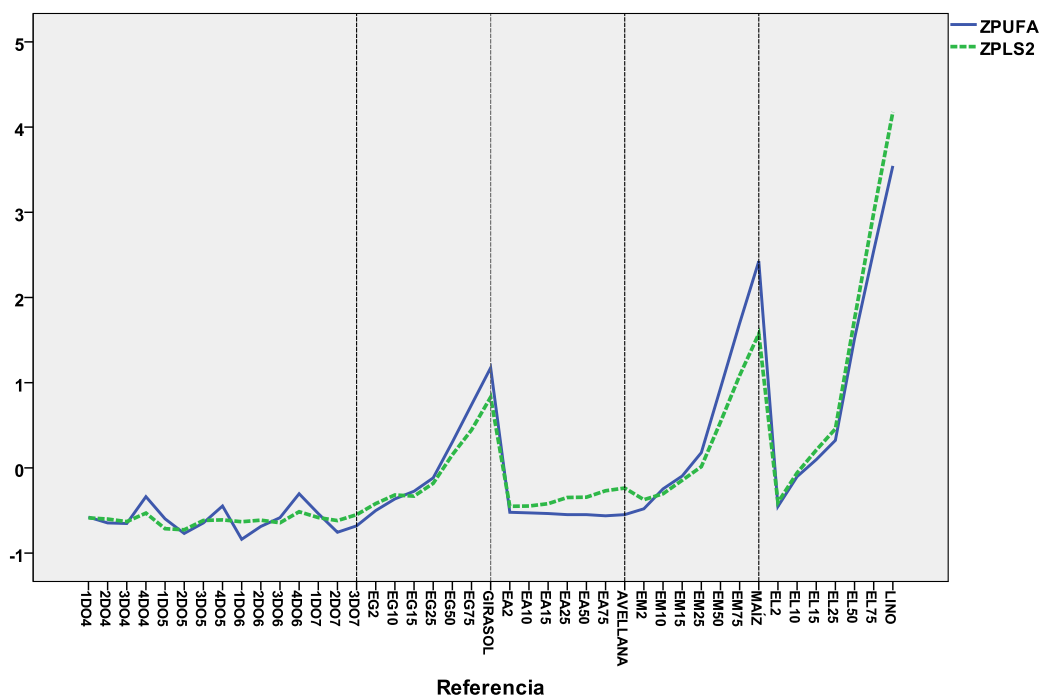


Figura 4.26. Contenido en ácidos PUFA y puntuaciones PLS2, ambos tipificados.

La proximidad de las dos líneas representadas en las Figuras 4.25 y 4.26 pone de manifiesto la idoneidad del factor PLS2 de cara a la estimación del perfil en ácidos grasos MUFA y PUFA (y, por tanto, SAFA) de los diversos aceites considerados a partir de espectros NIR. La determinación de este perfil resulta muy interesante, según

se ha puesto de manifiesto anteriormente, de cara a la autenticación de aceites de oliva virgen extra puesto que permite determinar su posible adulteración con otros aceites comestibles de calidad inferior.

3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

3.1. INTRODUCCIÓN

En el *Apartado 5.2.2. del Capítulo 1* se explica en fundamento, las ventajas y las aplicaciones de la espectroscopia Raman a aceites de oliva. Asimismo se muestra un espectro típico de aceite de oliva virgen (*Figura 1.11.*) y la asignación de las bandas típicas (*Tabla 1.3.*).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.1. Muestras

Se han estudiado por espectroscopia Raman todas las muestras correspondientes a seis campañas consecutivas (desde 2004-2005 a 2009-2010, la 2010-2011 no pudo ser estudiada por problemas en el equipo). Se incluyen muestras de distintas variedades, pertenecientes a varias DOP andaluzas y a la cooperativa Hojiblanca (*Tablas 2.2. a 2.19.*).

El procedimiento de medición es el siguiente. Se llena con la muestra de aceite un vial de vidrio con 2 mL de capacidad, de los habitualmente usados en el inyector automático de HPLC, y se introduce en un portamuestras que ha sido especialmente diseñado para que la muestra quede siempre en la misma posición. Se introduce la muestra en un equipo FT-IR_RAMAN (Perkin Elmer Spectrometer. Spectrum 2000)

disponible en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba (Figura 4.27), y se procede al análisis.

3.2.2. Equipo utilizado para la obtención de espectros.

El equipo utilizado para la obtención de los espectros Raman, ha sido un espectrómetro FT-IR Raman (Perkin Elmer Spectrometer. System 2000), equipado con un láser Nd:YAG ($9394,69\text{ cm}^{-1}$) como fuente de radiación, cuya potencia es de 300 mW, acumulando 16 scans a una resolución de 4 cm^{-1} , situado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba (Figura 4.27.)



Figura 4.27. Vista general del equipo FT-IR-Raman (Perkin Elmer Spectrometer, System 2000) situado en el Departamento de Química Orgánica.

Se diseñó un portamuestras para que la muestra quedase siempre en la misma posición y en él se introdujo un vial de 2mL (habitualmente usados en HPLC) con el aceite a analizar, obteniéndose el espectro correspondiente, registrado a desplazamientos Raman desde 100 hasta 3400 cm^{-1} .

3.2.3. Estudio quimiométrico

El objetivo planteado es determinar la información cualitativa y cuantitativa que proporcionan los espectros Raman sobre el aceite de oliva. Como primer paso en la metodología, la elevada dimensión espectral se sintetiza empleando regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Este procedimiento resume la información de los espectros en unas cuantas componentes o factores, combinación lineal de las variables originales (asociadas a los números de onda del espectro) y ortogonales entre sí, por lo que evitan la presencia de multicolinealidad. Más concretamente, se emplea regresión PLS multivariante, considerando como respuesta el vector que contiene el contenido en ácidos grasos saturados (SAFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) obtenido mediante cromatografía de gases, técnica de referencia, y como entrada la matriz X que contiene la información obtenida mediante la espectroscopia Raman.

Existen en la bibliografía diversos artículos en los que se analiza la autenticación de aceites de oliva mediante un tratamiento quimiométrico de datos espectrales, en general, y de espectroscopia Raman, en particular [9-12]. Estos trabajos estudian formas de determinar los índices de calidad de aceites de oliva y su posible adulteración, analizando propiedades cuantitativas (composición en ciertos compuestos) o cualitativas (como DOP o procedencia) de los mismos. La elevada información espectral se resume en unas cuantas componentes o factores, que pueden determinarse usando distintos criterios de optimización: maximizando la correlación entre las variables independientes, en el análisis de componentes principales (PCA), y maximizando la correlación entre las variables independientes y la dependiente, en la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Y el número de factores a retener se obtiene en base a algún criterio interno implementado y automatizado por el programa informático usado en el análisis quimiométrico.

En este caso la información espectral se sintetiza utilizando factores PLS en lugar de factores PCA. Además, se analiza el número óptimo de componentes PLS en las que se resume la información espectral, teniendo en cuenta que el objetivo no sólo es resumir la información en unas cuantas componentes que permitan visualizar el conjunto de datos en un espacio de dimensión inferior sino, fundamentalmente, en utilizar estas componentes para predecir información cuantitativa (como el contenido en ácidos grasos) o cualitativa (como la campaña de recogida, la variedad de aceituna, la procedencia del aceite o la denominación de origen protegida (DOP)). Así, los factores PLS serán introducidos progresivamente en los modelos de regresión y clasificación con la finalidad de analizar la evolución en los errores de calibración (es decir, errores en la estimación de observaciones usadas en el ajuste del modelo) o predicción (es decir, errores en la estimación de observaciones reservadas, no usadas, en el ajuste del modelo). Se ha de tener en cuenta que el carácter ortogonal según el cual se construyen las sucesivas componentes PLS hace que la introducción de factores al modelo no ocasione un problema de multicolinealidad, situación que ocasionaría el incumplimiento de las hipótesis de partida del modelo lineal general.

Para el estudio de la **variable de respuesta cuantitativa** se proponen modelos de regresión para predecir, de manera independiente, el contenido en ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA del aceite de oliva utilizando como variables dependientes las componentes PLS extraídas anteriormente, que serán introducidas progresivamente en los correspondientes modelos de regresión.

Los distintos modelos son evaluados en términos de calibración o ajuste y predicción o validación. Sean y_1, y_2, \dots, y_n las observaciones de la variable dependiente Y y sean $\hat{y}_1, \hat{y}_2, \dots, \hat{y}_n$ las correspondiente predicciones. El error cuadrático medio de

calibración $MSEC = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 / n$, toma valores tanto más próximos a cero cuanto mejor es el ajuste o calibración del modelo. Puesto que MSEC depende de las unidades de medida de la variable Y (estará medido en las unidades de medida de Y al cuadrado, u.m.²), definimos la siguiente medida adimensional $ARMSEC = RMSEC / \bar{y}$, siendo RMSEC la raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración (medido en u.m.) e \bar{y} la media de las observaciones y_1, y_2, \dots, y_n (medida en u.m.). Por tanto, el ajuste o calibración de un modelo será tanto mejor cuanto más próximo está ARMSEC a 0. Además, como ARMSEC es una medida adimensional, permitirá comparar en términos de calibración o ajuste los modelos de regresión que consideran el contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA como variables dependientes.

Por otra parte, sean $\hat{y}_{n+1}, \hat{y}_{n+2}, \dots, \hat{y}_{n+t}$ las predicciones para t observaciones futuras del modelo. El error cuadrático medio de predicción se define como

$$MSEP = \sum_{j=1}^t (y_{n+j} - \hat{y}_{n+j})^2 / t.$$

La capacidad predictiva de un modelo es tanto mejor cuanto más próximo a cero es MSEP. A partir de MSEP se define la siguiente medida adimensional $ARMSEP = RMSEP / \bar{y}_t$, siendo RMSEP la raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción e \bar{y}_t la media de las observaciones futuras $\hat{y}_{n+1}, \hat{y}_{n+2}, \dots, \hat{y}_{n+t}$. Así, ARMSEP permitirá comparar la capacidad de predictiva de modelos con distintas variables dependientes, que serán tanto mejores cuanto más próximo a 0 sea ARMSEP.

Para el estudio de la **variable de respuesta cualitativa** se emplea análisis discriminante. El análisis discriminante es una técnica estadística multivariante que permite asignar un individuo o caso a un grupo definido a priori (variable dependiente

cuantitativa) en función de una serie de características del mismo (variables independientes cuantitativas). Tiene como hipótesis de partida la normalidad y la homocedasticidad multivariantes. En ausencia de hipótesis de normalidad, es preferible la utilización de modelos de regresión logística, válidos únicamente en el caso en que la variable dependiente es dicotómica, es decir, cuando los grupos definidos a priori son exclusivamente dos. La hipótesis de homocedasticidad es contrastable mediante el test M de Box, si bien el procedimiento empleado en el análisis discriminante es robusto a la ausencia de esta hipótesis.

El análisis discriminante trata de analizar cuáles son las variables que contribuyen en mayor grado a discriminar los casos en los distintos grupos establecidos a priori. Para ello, las variables que mejor discriminan se reducen a *variables canónicas*, es decir, combinaciones lineales de las variables independientes originales. Esta combinación lineal es lo que se conoce como *función discriminante*, donde la variable dependiente es la pertenencia a uno u otro grupo. El número máximo de funciones discriminantes está dado por el mínimo entre el número de variables y el número de grupos menos 1. El criterio para obtener las funciones discriminantes pasa por maximizar la variabilidad existente entre los grupos (inter-grupos) respecto a la variabilidad existente dentro de los grupos (intra-grupos). Para que las funciones discriminantes sean óptimas han de proporcionar una regla de clasificación que minimice la probabilidad de cometer errores.

Para cada función discriminante se obtienen las correspondientes puntuaciones discriminantes (*scores*) al sustituir, para cada caso, el valor de cada variable independiente cuantitativa. A partir de la puntuación discriminante es posible obtener una regla de clasificación de los distintos casos en uno de los grupos. Esta regla de clasificación está basada en el *Teorema de Bayes*, que proporciona la *probabilidad a*

posteriori, es decir, la probabilidad de que un caso pertenezca a un grupo concreto, sabiendo que ha proporcionado una puntuación discriminante conocida. Así, el procedimiento de clasificación se llevará a cabo calculando, para cada caso, la puntuación en cada una de las funciones discriminantes y asignando el caso al grupo cuya probabilidad a posteriori es mayor.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Variable de respuesta cuantitativa: regresión

Los resultados obtenidos en este caso se representan gráficamente en la *Figura 4.28.*, donde se presentan los valores ARMSEC y ARMSEP que se obtienen al introducir sucesivamente factores PLS en el modelo.

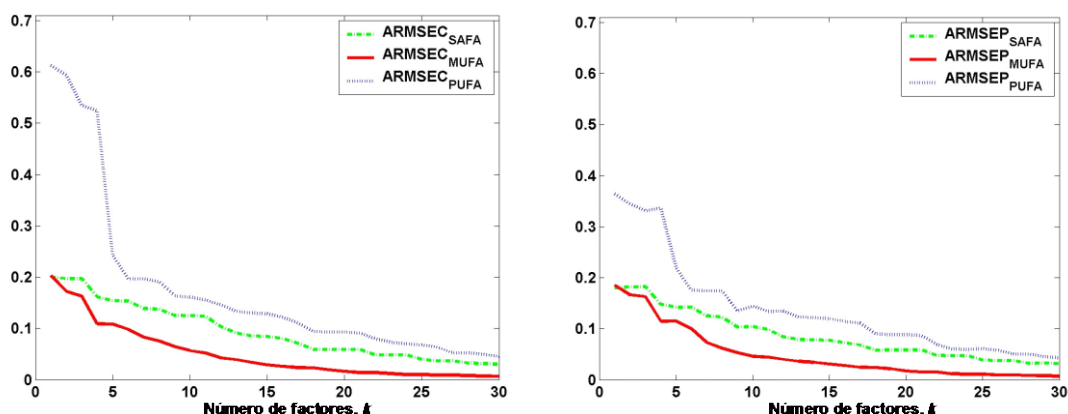


Figura 4.28. ARMSEC y ARMSEP en la estimación de ácidos SAFAs, MUFAs y PUFAs.

En primer lugar, tanto los errores de calibración o ajuste como los errores de validación o predicción van disminuyendo progresivamente con la introducción de factores PLS en el modelo, consiguiendo estabilizarse en torno a 25-30 factores PLS (un número superior de factores al que suele ser considerado internamente por los programas de ordenador). En segundo lugar, los datos espectrales Raman proporcionan mejores estimaciones, tanto en calibración como en predicción, para el contenido en ácidos MUFAs, seguida de la estimación en ácidos SAFAs, siendo la estimación de los

ácidos PUFA la menos precisa. Puesto que los valores ARMSEC y ARMSEP son adimensionales tiene sentido superponer los valores en un mismo gráfico de cara a su comparación. Esto hecho no hubiese sido posible de haber considerado los valores MSEC y MSEP. Finalmente, al comparar los valores ARMSEC y ARMSEP se observa un comportamiento similar, salvo para los primeros factores en la estimación de ácidos PUFA, especialmente elevado el correspondiente valor ARMSEC.

Las conclusiones anteriores se confirman y se generalizan mediante un estudio de validación cruzada (*cross-validation*), que contempla un algoritmo de estimación que modifica, en cada iteración del mismo, los conjuntos de calibración y validación, calculándose los valores ARMSEC y ARMSEP correspondientes. Además, estos valores se han calculado para los modelos que consideran 5, 10, 20 y 30 factores PLS, con la finalidad de analizar la evolución en la bondad de la estimación.

Los resultados sobre validación cruzada se recogen en la *Figura 4.29*, que se corresponde con una representación tridimensional de los valores ARMSEC y ARMSEP asociados a las estimaciones de ácidos SAFA, MUFA y PUFA en los ejes x , y , z , respectivamente. Además se superponen las nubes de puntos asociadas a los valores ARMSEC y ARMSEP para modelos con 5, 10, 20 y 30 factores PLS. A la vista de la *Figura 4.29* se confirma que, en efecto, los valores ARMSEC y ARMSEP disminuyen con la introducción progresiva de factores PLS en el modelo, dado que las sucesivas nubes de puntos se aproximan progresivamente al eje de coordenadas, $(0,0,0)$. En segundo lugar, comparando las gráficas correspondientes a calibración y predicción puede observarse de la variabilidad de los valores ARMSEP es superior a la de los valores ARMSEC obtenidos en las distintas iteraciones del algoritmo de validación cruzada.

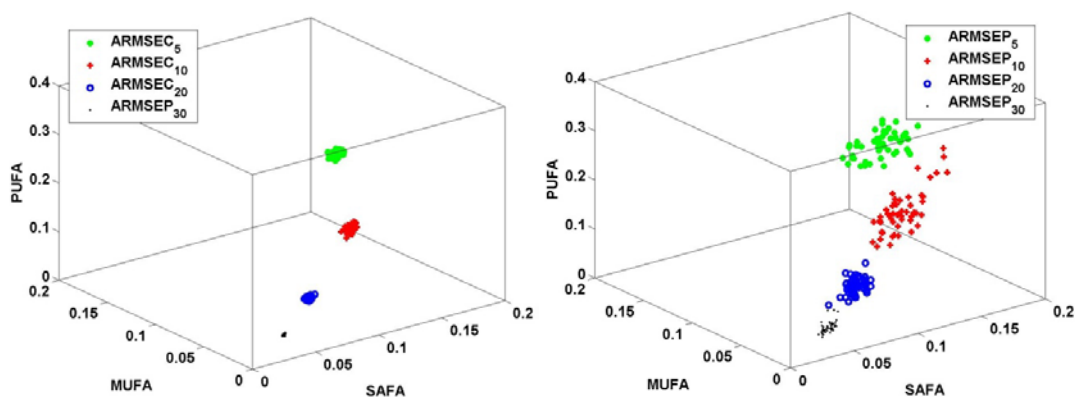


Figura 4.29. ARMSEC y ARMSEP obtenidos mediante validación cruzada al considerar 5, 10, 20 y 30 factores PLS

Como conclusión, podemos afirmar que los espectros Raman proporcionan información sobre el contenido en ácidos grasos del aceite de oliva. En particular, es el contenido en ácidos MUFA, seguido de ácidos SAFA y PUFA, el que mejor se consigue estimar, teniendo en cuenta aspectos de calibración y predicción, planteando modelos de regresión que posean en torno a 25-30 factores PLS de los determinados en la fase previa (mediante regresión PLS multivariante).

3.3.2. Variable de respuesta cualitativa: análisis discriminante.

En este caso concreto se ha aplicado el análisis discriminante considerando las componentes PLS extraídas en la fase previa como variables independientes cuantitativas y, como variables categóricas dependientes las siguientes:

- Campaña de recogida del aceite, distinguiendo entre Campañas 1 (2004-05) a 6 (2009-10).
- Variedad de aceituna, diferenciando entre Frantoio, Gordal, Hojiblanca y Picual.
- Procedencia geográfica del aceite, distinguiendo entre Jaén, Málaga y Sevilla.

Capítulo 4

- Denominación de origen protegida (DOP), diferenciando entre tres DOPs pertenecientes a la provincia de Córdoba: DOP Lucena, DOP Montoro-Adamuz y DOP Priego de Córdoba.

En primer lugar, en la *Figura 4.30* se compara el porcentaje de acierto en la clasificación en modelos de análisis discriminante de los que se consideran 5, 10, 20 y 30 factores PLS como variables dependientes. Esta figura analiza la evolución del acierto de clasificación en calibración en calibración y validación (en este caso, el procedimiento de validación se realiza al clasificar una observación usando el modelo de análisis discriminante que se obtiene al dejar fuera dicha observación). Puede observarse que, si bien el porcentaje de validación tiene un comportamiento algo más irregular, el porcentaje de calibración siempre mejora con la introducción de factores PLS. Por este motivo, continuaremos el desarrollo considerando el modelo de análisis discriminante que contempla 30 factores PLS como variables dependientes.

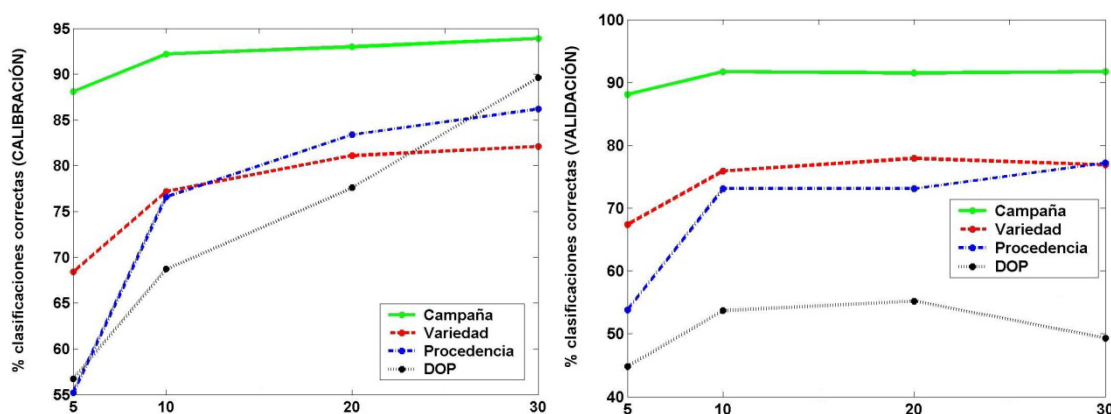


Figura 4.30. % clasificaciones correctas de calibración y validación en modelos de análisis discriminante con 5, 10, 20 y 30 factores PLS.

Los resultados de clasificación obtenidos para los modelos que discriminan las distintas categorías para las variables CAMPAÑA, VARIEDAD, PROCEDENCIA y DOP se resumen en la *Tabla 4.4*. En las columnas tercera y cuarta se recogen el número de casos contemplados en cada caso y el número de funciones discriminantes (FD) que

se consideran –en todos los casos, número de grupos menos 1-. La columna quinta especifica el porcentaje de variabilidad de los datos que explica cada FD y el porcentaje de variabilidad acumulado explicado.

Tabla 4.4. Resumen de los resultados obtenidos de la aplicación del análisis discriminante.

Variable categórica de respuesta	Categorías a discriminar	Núm. casos contemplados	Núm. FD ^(a)	% variabilidad explicada por cada FD y total	Correlación canónica ^(b)	Núm. FD diferentes (λ de Wilks) ^(c)	% clasificaciones correctas
CAMPAÑA	Campañas 1-6 (2004-05 hasta 2009-10)	412	5	69,4 21,9 6,3 2,1 <u>0,3</u> 100,0	0,993 0,978 0,929 0,822 0,482	5 (Sig: 0,00 en todos los casos)	94,3%
VARIEDAD	Frantoio, gordal, hojiblanca, picual	307	3	85,9 7,6 <u>6,5</u> 100,0	0,950 0,670 0,642	3 (Sig: 0,00 en todos los casos)	84,0%
PROCEDENCIA	Málaga, Jaén, Sevilla	145	2	68,5 <u>31,5</u> 100,0	0,817 0,693	2 (Sig: 0,00 en todos los casos)	89,0%
DOP	Lucena, Montoro-Adamuz, Priego de Córdoba	67	2	70,3 <u>29,7</u> 100,0	0,818 0,678	1 (Sig: 0,018 y 0,392, respec.)	86,6%

^(a) Mínimo entre el número de variables y el número de categorías menos 1.

^(b) Cuanto más próxima a 1 es la correlación canónica, mayor es el poder discriminante de una FD.

^(c) El test de la λ de Wilks contrasta la igualdad de medias de todas las FD en todos los grupos.

A continuación, se indica la correlación canónica asociada a cada FD, es decir, la raíz cuadrada del cociente entre la suma de cuadrados entre-grupos para cada FD y suma de cuadrados totales. La correlación canónica oscila entre 0 y 1 siendo tanto mayor el poder discriminante de una FD cuanto más próximo a 1 está el correspondiente valor. En todos los casos puede observarse que los FD están ordenados en cuanto a porcentaje de variabilidad de los datos que explican y poder discriminante. Así la FD1 consigue explicar el 69,4; 85,9; 68,5 y 70,3 % de variabilidad de los datos en los modelos con las variables CAMPAÑA, VARIEDAD, PROCEDENCIA y DOP, respectivamente, teniendo esta FD1 una correlación canónica de 0,993; 0,950; 0,817 y 0,818, en cada caso. La siguiente columna de la *Tabla 4.4.* indica la información correspondiente al contraste de la λ de Wilks, que tiene por hipótesis nula la igualdad de medias de todas las funciones discriminantes en todos los grupos que determina la variable dependiente. El proceso comienza contrastando todas las funciones discriminantes simultáneamente para ir las eliminando posteriormente una a una y contrastando las que quedan. A la vista de los resultados obtenidos, considerando el nivel de significación $\alpha = 0,05$, las medias de todas las funciones discriminantes difieren significativamente en todos los correspondiente grupos (puesto que tienen una probabilidad límite asociada inferior a 0,05) salvo para la segunda función discriminante de la variable DOP. Finalmente, la última columna de la *Tabla 4.4.* recoge el porcentaje total de casos que el análisis discriminante consigue clasificar convenientemente en cada uno de los modelos considerados: 94,3; 84,0; 89,0; 86,6 %.

El porcentaje de acierto en la clasificación para cada variable categórica dependiente y para cada grupo puede observarse en las *Tablas 4.5. a 4.8.* Así, según puede observarse en la *Tabla 4.5.*, para la variable CAMPAÑA todos los casos de las campañas 1 y 6 son clasificados correctamente, mientras que los porcentajes de

clasificación correcta son del 86,6; 98,4; 91,3 y 93,4% para las campañas 2, 3, 4 y 5. Para la variable VARIEDAD, los porcentajes de clasificación correcta son del 84,2; 100; 80,8 y 85,0% para las variedades Frantoio, Gordal, Hojiblanca y Picual, respectivamente (Tabla 4.6). Para la variable PROCEDENCIA, los casos de Málaga, Jaén y Sevilla son clasificados correctamente en un 95,3; 90 y 70% (Tabla 4.7). Finalmente, con respecto a la DOP, los casos de las DOP de Lucena, Montoro-Adamuz y Priego de Córdoba son clasificados correctamente en 84,2; 89,5 y 80% de los casos (Tabla 4.8).

Tabla 4.5. Resultados en la clasificación por grupo para la variable CAMPAÑA^(a)

Original	%	Campana	Grupo de pertenencia pronosticada						Total
			Campana 1	Campana 2	Campana 3	Campana 4	Campana 5	Campana 6	
		Campana 1	100,0	,0	,0	,0	0	,0	100,0
		Campana 2	,0	86,6	13,4	,0	0	,0	100,0
		Campana 3	,0	1,6	98,4	,0	0	,0	100,0
		Campana 4	,0	,0	8,7	91,3	,0	,0	100,0
		Campana 5	,0	,0	,0	,0	98,4	6,6	100,0
		Campana 6	,0	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0

^(a) Clasificados correctamente el 94,3% de los casos agrupados originales

Tabla 4.6. Resultados en la clasificación por grupo para la variable VARIEDAD^(a)

Original	%	Variedad	Grupo de pertenencia pronosticada				Total
			Frantoio	Gordal	Hojiblanca	Picual	
		Frantoio	84,2	,0	5,3	10,5	100,0
		Gordal	,0	100,0	,0	,0	100,0
		Hojiblanca	,8	,0	80,8	18,5	100,0
		Picual	,7	,0	14,3	85,0	100,0

^(a) Clasificados correctamente el 84,0% de los casos agrupados originales

Tabla 4.7. Resultados en la clasificación por grupo para la variable PROCEDENCIA^(a)

Original	%	Procedencia	Grupo de pertenencia pronosticada			Total
			Málaga	Jaén	Sevilla	
		Málaga	95,3	12	35	100,0
		Jaén	67	90	33	100,0
		Sevilla	20	10	70	100,0

^(a) Clasificados correctamente el 89,0% de los casos agrupados originales

Tabla 4.8. Resultados en la clasificación por grupo para la variable DOP^(a)

		DOP	Grupo de pertenencia pronosticada			Total
			DOP Lucena	DOP Montoro-Adamuz	DOP Priego Córdoba	
Original	%	DOP Lucena	84,2	15,8	,0	100,0
		DOP Montoro-Adamuz	2,6	89,5	7,9	100,0
		DOP Priego Córdoba	10,0	10,0	80,0	100,0

^(a) Clasificados correctamente el 86,6% de los casos agrupados originales

Finalmente, se presentan los gráficos de dispersión en los que se cruzan los valores obtenidos para las puntuaciones discriminantes para cada variable categórica y grupo. A la vista de la *Figura 4.31* (Campaña), los casos de las campañas 5-6 tienen puntuaciones elevadas en la FD1, los casos correspondientes a la campaña 1 tienen puntuaciones intermedias y los casos correspondientes a las campañas 2-3-4 tienen puntuaciones bajas. Por tanto, la FD1 consigue discriminar entre las campañas 5-6, 1 y 2-3-4. La FD2 discrimina claramente entre la campaña 1, con puntuaciones altas, y todas las demás, con puntuaciones bajas. La FD3 discrimina fundamentalmente entre las campañas 2-3, con puntuaciones altas, y la campaña 4, con puntuaciones bajas. Con respecto a la *Figura 4.32* (Variedad), la FD1 asocia puntuaciones más altas a la variedad de aceituna gordal, puntuaciones intermedias a la variedad Frantoio y puntuaciones más bajas a las variedades hojiblanca y picual. Estas dos últimas variedades consiguen ser discriminadas fundamentalmente por la FD3. A la vista de la *Figura 4.33* (Procedencia), la FD1 consigue discriminar a los aceites procedentes de Sevilla de los de Jaén-Málaga. Estas dos últimas procedencias son diferenciadas en mediante la FD2. Finalmente, teniendo en cuenta la *Figura 4.34* (DOP), que resulta de la aplicación del análisis discriminante a tres DOPs de la provincia de Córdoba, la FD1 discrimina la DOP Sevilla de la DOP Montoro-Adamuz y la DOP Priego de Córdoba. La FD2 consigue discriminar estas dos últimas DOPs

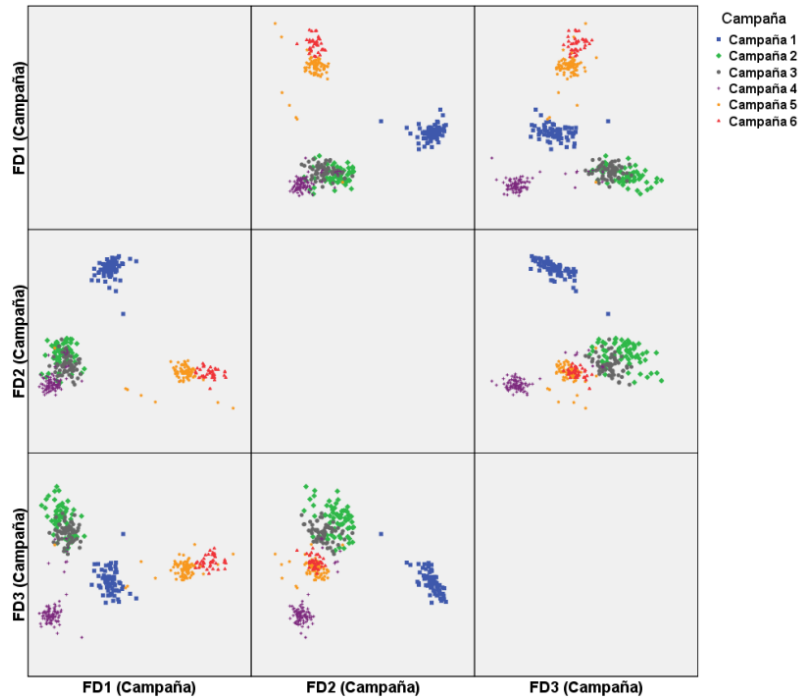


Figura 4.31. Matriz de dispersión de las puntuaciones discriminantes para las tres primeras FDs para CAMPAÑA.

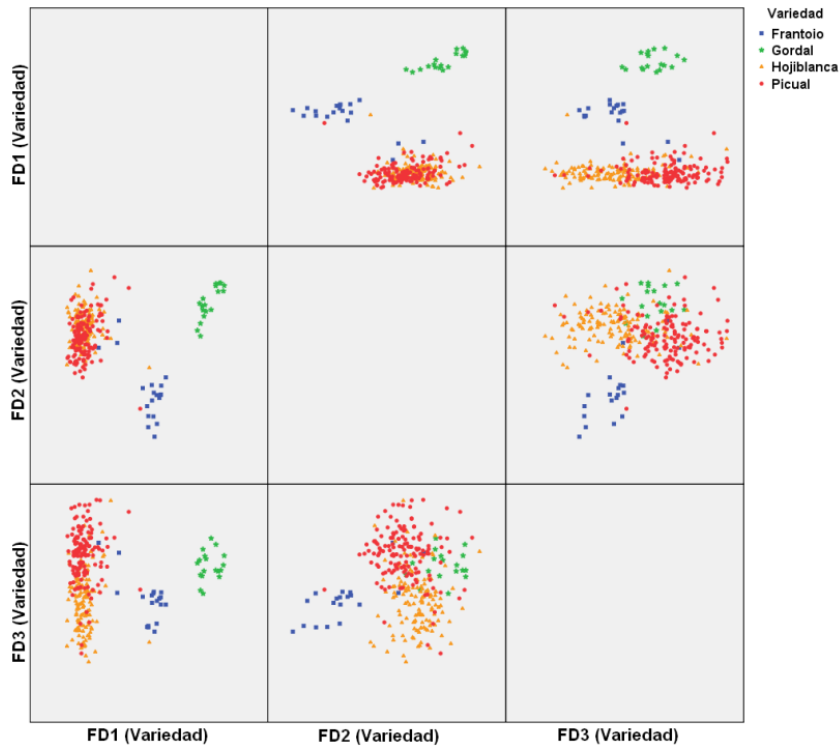


Figura 4.32. Matriz de dispersión de las puntuaciones discriminantes para las tres FDs para VARIEDAD.

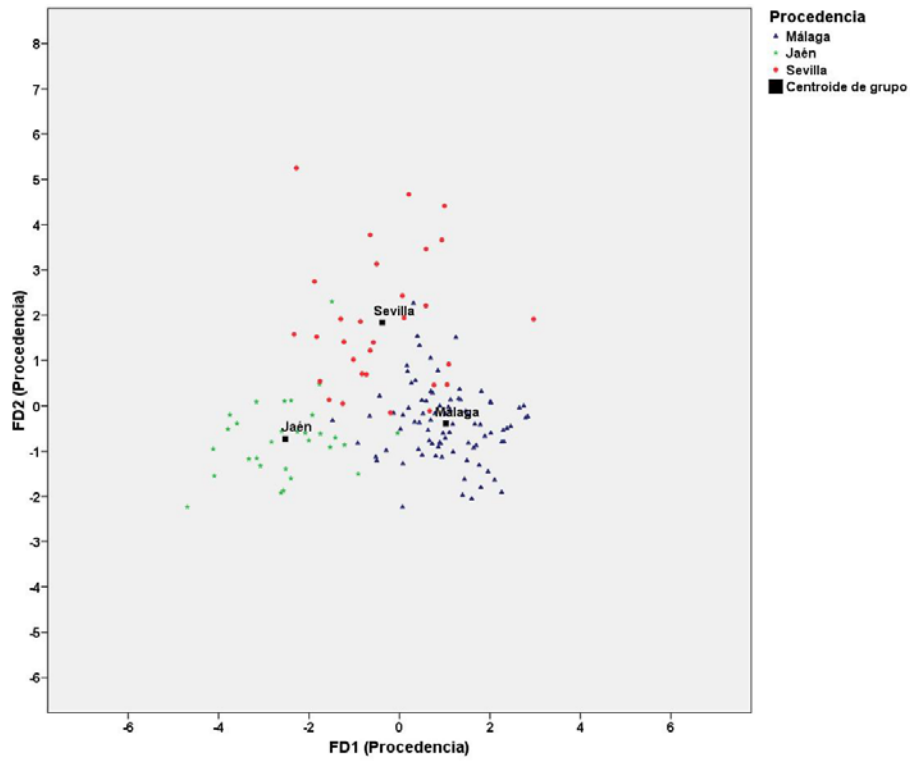


Figura 4.33. Gráfico de dispersión de las puntuaciones discriminantes para las dos FDs para PROCEDENCIA.

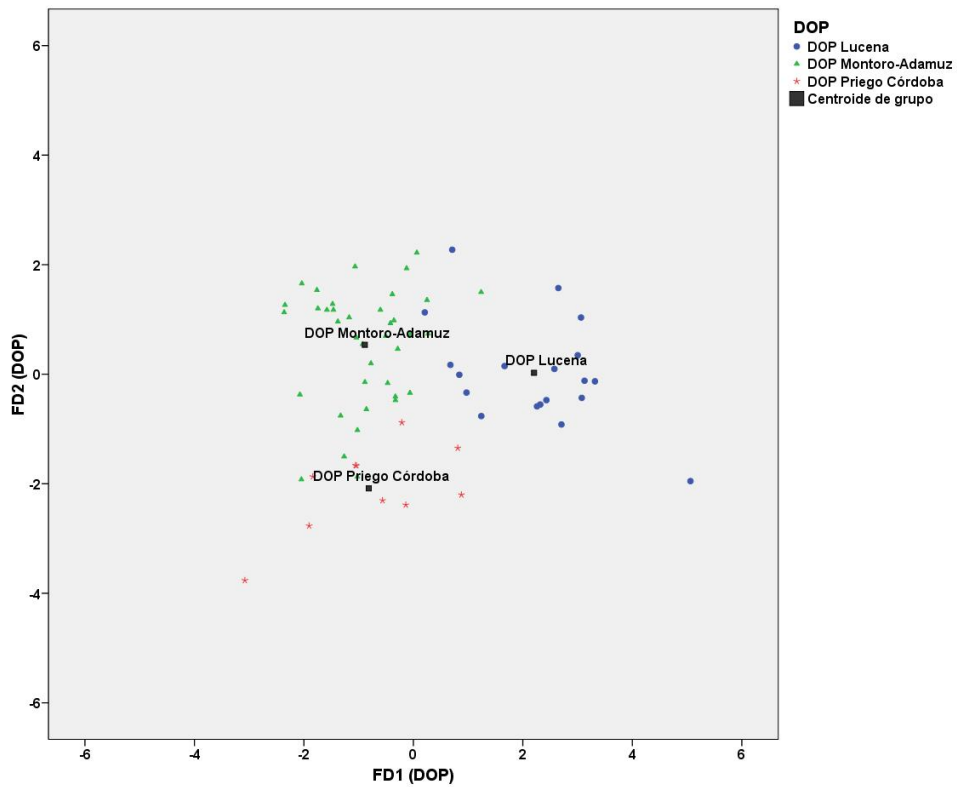


Figura 4.34. Gráfico de dispersión de las puntuaciones discriminantes para las dos FDs para DOP.

Como conclusión hay que señalar que los espectros Raman proporcionan valiosa información cuantitativa y cualitativa útil en la autentificación de aceites de oliva. Concretamente, se ajustan modelos de regresión que pronostican el contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA, cometiendo el menor error tanto en ajuste como en predicción en el caso de los ácidos MUFA, seguidos de SAFA y PUFA, si bien los errores están muy próximos a 0 en todos los casos. Estos resultados son generalizados mediante procedimientos de validación cruzada. Con respecto a la información cualitativa, se plantean modelos de análisis discriminante para diferenciar entre las campañas de recogida de la aceituna, sus distintas variedades, las procedencias del aceite de oliva y sus DOPs, consiguiendo un porcentaje de acierto en la clasificación elevado en todos los casos.

La elevada dimensión espectral se resume en factores PLS. En todos los programas informáticos usuales en quimiometría este número de factores se determina en base a un criterio interno de parada. Sin embargo, en esta Memoria se ha analizado cuál es el número óptimo de factores PLS a introducir en los modelos de regresión y clasificación, estudiando la evolución en los errores de calibración y predicción

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Baeten, V.; Aparicio, R.; Marigheto, N. A.; Wilson, R. H. Olive oil analysis by infrared and Raman spectroscopy: methodologies and applications. In *Handbook of olive oil: Analysis and properties*, Harwood, J. L.; Aparicio, R., Eds.; USA, **2000**; pp 207-245.
2. Frank, L. E.; Friedman, J. H. A statistical view of some chemometrics regression tools. *Technometrics* **1993**, *35* (2), 109-135.
3. Maggio, R. M.; Valli, E.; Bendini, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Toschi, T. G.; Cerretani, L. A spectroscopic and chemometric study of virgin olive oils subjected to thermal stress. *Food Chemistry* **2011**, *127* (1), 216-221.
4. Guillén, M. D.; Cabo, N. Characterization of edible oils and lard by fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **1997**, *74* (10), 1281-1286.
5. Guillén, M. D.; Cabo, N. Usefulness of the frequency data of the Fourier transform infrared spectra to evaluate the degree of oxidation of edible oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47* (2), 709-719.
6. Guillén, M. D.; Cabo, N. Relationships between the composition of edible oils and lard and the ratio of the absorbance of specific bands of their Fourier transform infrared spectra. Role of some bands of the fingerprint region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (5), 1788-1793.
7. Berrueta, L. A.; Alonso-Salces, R. M.; Héberger, K. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1158* (1-2), 196-214.
8. Sánchez-Rodríguez, M. I.; Sánchez-López, E.; Caridad, J. M.; Marinas, A.; Marinas, J. M.; Urbano, F. J. New insights into evaluation of regression models through a decomposition of the prediction errors: Application to near-infrared spectral data. *SORT* **2013**, *37* (1), 57-78.
9. Korifi, R.; Le Dréau, Y.; Molinet, J.; Artaud, J.; Dupuy, N. Composition and authentication of virgin olive oil from French PDO regions by chemometric treatment of Raman spectra. *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *42* (7), 1540-1547.
10. Aparicio, R.; Morales, M. T.; Aparicio-Ruiz, R.; Tena, N.; García-González, D. L. Authenticity of olive oil: Mapping and comparing official methods and promising alternatives. *Food Research International* **2013**, *54* (2), 2025-2038.
11. Osorio, M. T.; Haughey, S. A.; Elliott, C. T.; Koidis, A. Evaluation of methodologies to determine vegetable oil species present in oil mixtures: Proposition of an approach to meet the EU legislation demands for correct vegetable oils labelling. *Food Research International* **2014**, *60*, 66-75.
12. Nunes, C. A. Vibrational spectroscopy and chemometrics to assess authenticity, adulteration and intrinsic quality parameters of edible oils and fats. *Food Research International* **2014**, *60*, 255-261.

**CAPÍTULO 5. RESONANCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)
APLICADA AL ESTUDIO DE
ACEITES DE OLIVA**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	273
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	274
2.1. MUESTRAS.....	274
2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SER ANALIZADAS.....	274
2.3. EQUIPO Y CONDICIONES EMPLEADAS.....	275
2.4. ANÁLISIS MEDIANTE ¹ H RMN.....	276
2.4.1. Determinación de ácidos grasos.....	276
2.5. ANÁLISIS MEDIANTE ¹³ C RMN.....	277
2.5.1. Determinación de ácidos grasos.....	277
2.5.2. Distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol.....	280
3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	282
3.1. ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LAS POSICIONES 1,3 Y 2 DEL GLICEROL.....	283
3.2. ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS (SAFA, MUFA Y PUFA) MEDIANTE ¹ H RMN, APLICANDO ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	286
3.3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS SAFA, MUFA Y PUFA MEDIANTE LOS ESPECTROS RMN DE ¹³ C Y ¹ H.....	290
4. BIBLIOGRAFÍA.....	308
ANEXO 4.1. RESULTADOS DE RMN.....	309

CAPÍTULO 5. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) APLICADA AL ESTUDIO DE ACEITES DE OLIVA

1. INTRODUCCIÓN

La técnica de Resonancia Magnética Nuclear, tal y como se muestra en el *Capítulo 1*, está bastante extendida en el estudio de aceites de oliva ya que se trata de una técnica simple y no destructiva que permite extraer gran cantidad de información a partir de sus espectros. Los núcleos más estudiados en aceites de oliva son ^{13}C y ^1H (en los cuales se centra nuestro estudio), aunque últimamente también se está aplicando ^{31}P . Los espectros de ^1H , debido a su alta razón giromagnética y su elevada abundancia natural, se obtienen en tiempos muy cortos, presentando gran sensibilidad [1]. El núcleo de ^{13}C , en cambio, presenta una abundancia natural del 1,1% aproximadamente, por lo que su sensibilidad es relativamente más baja que para el protón. Para mejorar la relación señal/ruido en ^{13}C RMN, se recurre a la acumulación de muchos barridos antes de la Transformada de Fourier y se obtiene el espectro de ^{13}C desacoplado del ^1H . Además, si se quiere aplicar ^{13}C RMN con fines cuantitativos (esto es, que las intensidades o áreas de las señales sean proporcionales al número de átomos que representan) se debe eliminar el llamado efecto NOE y tener en cuenta los grandes tiempos de relajación requeridos por los núcleos de carbono, lo que hace que registrar un espectro de ^{13}C RMN lleve más tiempo que uno de ^1H . Sin embargo, una ventaja de la espectroscopia ^{13}C RMN frente a ^1H es que su resolución es mayor debido a que presenta una escala más amplia, como se comentó en el *Capítulo 1*.

Durante la presente Tesis Doctoral, la técnica RMN se ha utilizado para determinar el contenido en ácidos grasos (SAFA, MUFA y PUFA) de los aceites de oliva, empleando distintas zonas de los espectros y aplicando métodos quimiométricos, como se describe a continuación. Además, mediante ^{13}C RMN se ha podido distinguir los ácidos grasos que esterifican en las posiciones 1,3 o 2 del glicerol, lo cual puede ser útil con vistas a detectar fraudes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MUESTRAS

Se ha seleccionado un amplio número de muestras de las siete campañas, las cuales han sido analizadas mediante RMN de protón y de carbono. Estos análisis se han realizado en el Servicio General de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad de Sevilla. Posteriormente, los espectros han sido procesados en nuestro Departamento, para poder conocer su contenido en ácidos grasos individuales y agrupados en SAFA, MUFA y PUFA.

2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SER ANALIZADAS

Para preparar las muestras se han tomado 200 μL de aceite y se ha colocado en un vial Eppendorf al que se añaden 500 μL de Cloroformo deuterado inmediatamente antes de introducir las muestras en el equipo de RMN, para evitar la evaporación del disolvente ya que la posición de las señales de los carbonos carbonílicos (entre 172-174 ppm), depende de la concentración [2].

2.3. EQUIPO Y CONDICIONES EMPLEADAS

Se ha utilizado un Espectrómetro Bruker Avance 500 (frecuencias de resonancia: 500.2 MHz para ^1H y 125.77 MHz para ^{13}C) con una sonda 5 mm QNP $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ de detección directa.

Los parámetros empleados para la adquisición de los espectros de ^1H han sido:

- Pulso de $90^\circ = p1 = 7.9 \mu\text{sec}$.
- Ancho espectral = sw = 10.5 ppm.
- N° de puntos de la fid = td = 32 k.
- Tiempo de adquisición = aq = 3.119 s.
- Retraso de la relajación = d1 = 5 s.
- N° de exploraciones = ns = 16.
- Exploraciones simuladas = ds = 4.
- Programa de pulsos = zg.

Los parámetros empleados para la adquisición de los espectros de ^{13}C han sido:

- Pulso de $90^\circ = p1 = 8 \mu\text{sec}$ (en realidad, el programa de pulsos usa un pulso de 30° , es decir de $2.64 \mu\text{sec}$).
- Ancho espectral = sw = 200.755 ppm.
- N° de puntos de la fid = td = 202016.
- Tiempo de adquisición = aq = 4 s.
- Retraso de la relajación = d1 = 10 s.
- N° de exploraciones = ns = 256.
- Exploraciones simuladas = ds = 2.
- Programa de pulsos = zgig30.

2.4. ANÁLISIS MEDIANTE ¹H RMN

2.4.1. Determinación de ácidos grasos

En el espectro de RMN ¹H (*Figura 5.1.*) aparecen identificados los distintos tipos de protones de los ácidos grasos. Los olefínicos resuenan entre 5,2 y 5,5 ppm, los protones en posición 2 del glicerol a $\geq 5,2$ ppm, los protones en posición 1 y 3 del glicerol resuenan a 4,1 y 4,3 ppm, respectivamente. Los dialílicos se encuentran en 2,78 ppm y los alílicos o α -olefínicos alrededor de 2,05 ppm. Los protones de los metilenos en α y β (α -carbonílicos y β -carbonílicos) respecto al grupo ácido de las cadenas ácidas resuenan a 2,30 y 1,60 ppm, respectivamente. Los protones de los demás grupos metileno de las cadenas ácidas se encuentran a 1,2 ppm y todos los metilos terminales a 0,88 ppm, excepto el del linolénico que se encuentra a 0,95 ppm.

Para la determinación de ácidos grasos por ¹H RMN, existen, en la bibliografía, distintos métodos. Los mejores resultados los hemos obtenido aplicando el método de Guillén [3]. El método seguido, calcula los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico principalmente), los monoinsaturados (oleico principalmente), linoleico y linolénico mediante las siguientes fórmulas:

$$Ln (\%) = 100 [B/(A + B)]$$

$$L (\%) = 100 [(E/D) - 2[B/(A + B)]]$$

$$O (\%) = 100[(C/2D) - (E/D) + [B/(A + B)]]$$

$$S (\%) = 100 [1 - (C/2D)]$$

Donde A es el área de la señal 1 correspondiente a los hidrógenos de los metilos de todos los ácidos menos el linolénico, B el área de la señal 2 correspondiente a la señal de los hidrógenos del metilo del linolénico, C el área de la señal correspondiente al área de los hidrógenos de los metilenos alílicos (o alfa olefínicos), D es el área de los hidrógenos de los grupos metileno en α respecto al carbonilo y E el área de los

metilenos bisalílicos (o dialílicos) (Véase Figura 5.1). Hay que destacar que el ácido linolénico, dado su bajo contenido en aceites de oliva virgen, sólo puede ser cuantificado por ^1H RMN, ya que ^{13}C RMN es menos sensible.

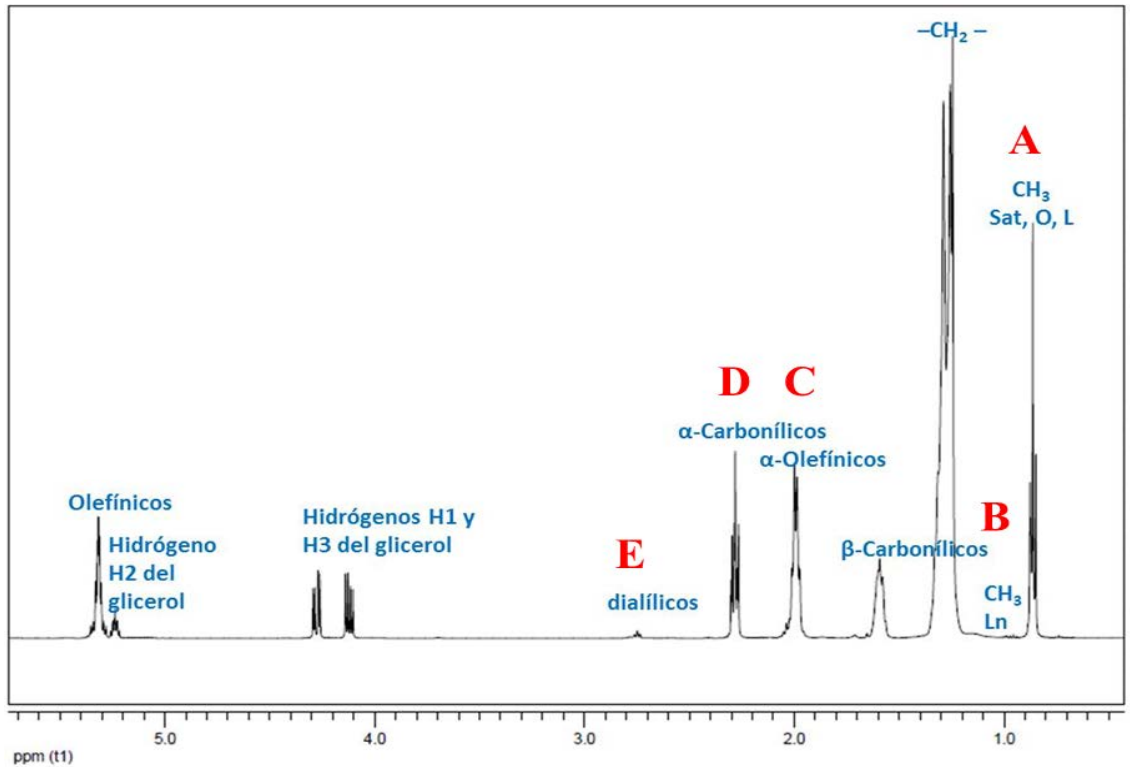


Figura 5.1. Espectro de RMN ^1H de aceite de oliva virgen extra, obtenido a 500 MHz. O, L y Ln denotan oleico, linoleico y linolénico, respectivamente. Las iniciales en rojo corresponden a la nomenclatura para el cálculo de los ácidos grasos.

2.5. ANÁLISIS MEDIANTE ^{13}C RMN

2.5.1. Determinación de ácidos grasos

La determinación de ácidos grasos en el espectro de RMN ^{13}C (Figura 5.2.) se lleva a cabo en tres zonas distintas:

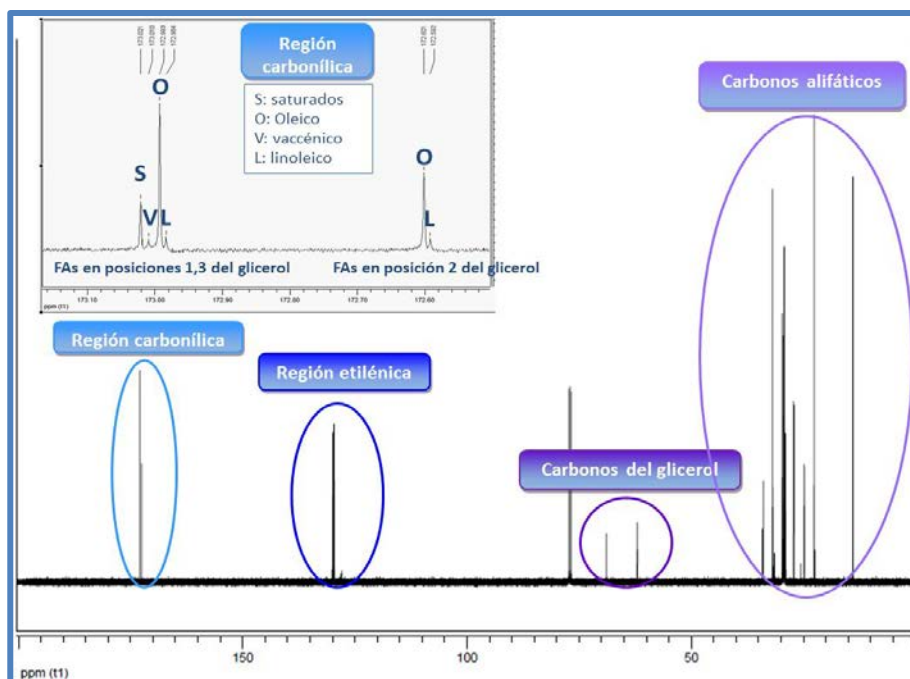


Figura 5.2. Espectro ^{13}C RMN de un aceite de oliva virgen extra, obtenido a 127,55 MHz. S, V, O y L denotan ácidos grasos saturados, vaccénico+gadoleico, oleico y linoleico, respectivamente.

- **Zona Carbonílica:** Esta zona se encuentra entre 172-174 ppm. En esta zona los triglicéridos aparecen en dos grupos, las cadenas que esterifican las posiciones 1 y 3 del glicerol aparecen a frecuencias más altas que las que lo hacen en la posición 2 del mismo debido a que los grupos C=O de la posición 2 experimentan dos interacciones “*γ gauche*” mientras que los de las posiciones 1 y 3 sólo una [4,5]. En el grupo de señales de las posiciones 1 y 3 aparecen, de mayor a menor frecuencia, la señal de los ácidos saturados (palmítico y esteárico, principalmente), un pequeños pico asignado a los ácidos vaccénico (presente únicamente en aceites de oliva) y gadoleico, una señal intensa que se corresponde con ácido oleico y una cuarta señal correspondiente al ácido linoleico; en esta región el ácido linolénico se encuentra en proporciones inferiores al 1% y no se separa de la señal del linoleico. El grupo de señales a menor frecuencia (posición 2 del glicerol) está formado por dos señales, estando la del ácido oleico a mayor frecuencia y la

del linoleico a menor (*Figura 5.2*). La determinación de la distribución de ácidos grasos en las posiciones 1,3 y 2 del glicerol sólo es posible por ^{13}C RMN.

- **Zona C16:** Esta zona se encuentra entre 31 y 32 ppm y en ella se encuentran señales para los ácidos grasos saturados, oleico, vaccénico y linoleico (*Figura 5.3*.)

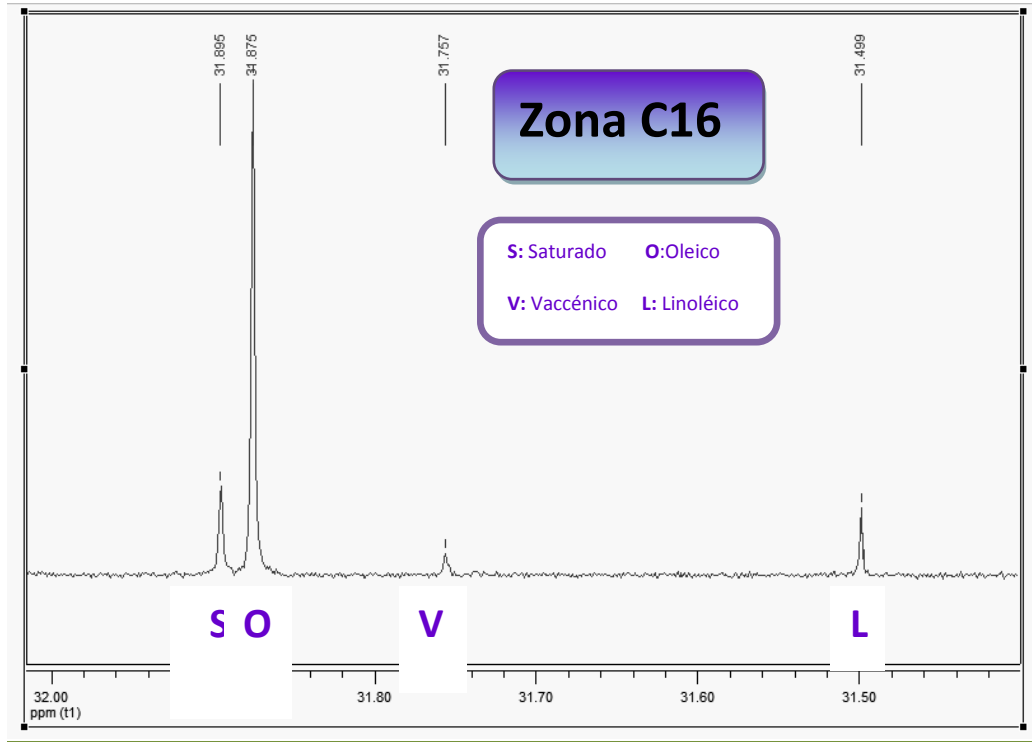


Figura 5.3. Zona C16 del espectro de RMN ^{13}C de un aceite de oliva virgen extra. S, O, V y L denotan ácidos grasos saturados, oleico, vaccénico y linoleico, respectivamente.

- **Zona de los carbonos alifáticos:** Esta es la zona de las regiones metilo y metileno del carbono, comprendiendo desde 10 a 35 ppm. Las señales utilizadas para el cálculo de los ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA son A, B', D, E y F [6] (*Figura 5.4*).

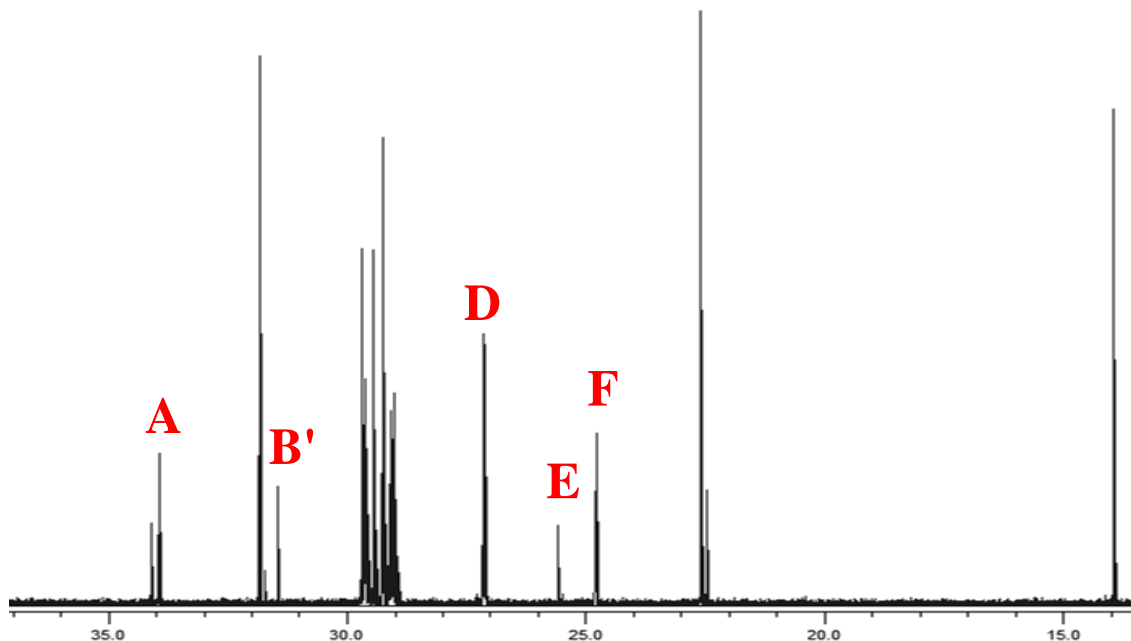


Figura 5.4. Zona de los carbonos alifáticos del espectro de ^{13}C RMN de un aceite de oliva virgen extra. Las señales marcadas en rojo son las empleadas para determinar la distribución de ácidos grasos.

2.5.2. Distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol.

La RMN de ^{13}C permite calcular la distribución de los ácidos oleico, linoleico, gadoleico+vaccénico y palmítico+esteárico entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol. Para ello (Véase Fig. 5.2), se puede utilizar la zona de los carbonos carbonílicos o la de los carbonos olefínicos (o etilénicos) C-9 del oleico y C-9 del linoleico (Figura 5.5). Si se utiliza la zona de los carbonos carbonílicos, cuando el contenido en ácido oleico es muy alto y el de linoleico es muy bajo, la deconvolución de los picos no es del todo satisfactoria y conduce siempre a un error por exceso en la determinación del contenido en este último ácido graso. En estos casos, es mejor calcular la distribución de oleico y linoleico entre las posiciones 1,3 y 2 a partir de la zona olefínica (o etilénica). La señal de los saturados no se detecta en la posición 2, ya que es conocido que los ácidos saturados son dirigidos preferentemente a las posiciones 1 y 3 [7].

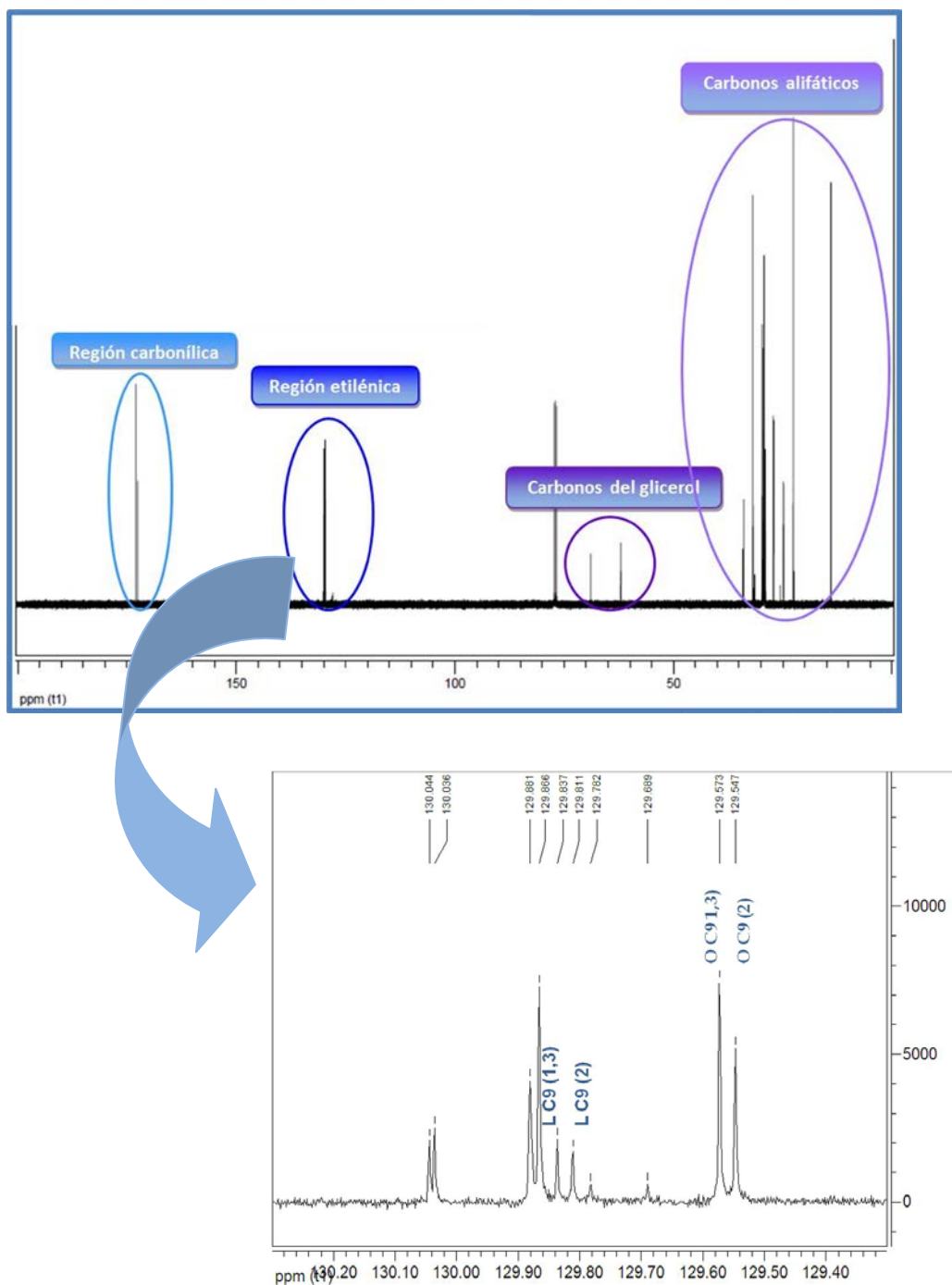


Figura 5.5. Zona etilénica u olefínica del espectro de ^{13}C RMN de un aceite de oliva virgen extra. L y O denotan linoleico y oleico, respectivamente.

De hecho, como se indicó con anterioridad, en la zona carbonílica asignada a la posición 2 del glicerol, aparecen dos únicas señales debidas a los ácidos oleico y linoleico. La aparición de más señales en esa zona, se relaciona con algún tipo de adulteración [8,9].

Cabe destacar que los ácidos vaccénico y gadoleico, a pesar de ser insaturados, son dirigidos a las posiciones 1 y 3. Al estar el doble enlace tan alejado del grupo carbonilo la enzima no lo reconoce como insaturado. En la zona carbonílica, los ácidos se separan por el número de insaturaciones, no haciéndolo por la longitud de la cadena.

3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mediante RMN de protón y de carbono se muestran en el *Anexo 5.1. (Tablas 5.6 a 5.73)*. Para la obtención de dichos datos se ha utilizado el Software MestReC 4.9.9.9. Las aplicaciones quimiométricas han sido desarrolladas utilizando diferente software como MatLab, Microsoft Excel, SPSS, Unscrambler de Camo y R-Project.

Se han realizado distintos estudios basándonos en esta técnica. En uno de ellos se analizan los valores de los ácidos grasos en las posiciones 1,3 y 2 y sus relaciones (r_1 y r_2 , donde $r_1 = \text{Oleico}_{1,3} / \text{Oleico}_2$ y $r_2 = \text{Linoleico}_{1,3} / \text{Linoleico}_2$), a partir de datos de RMN de ^{13}C . En otro de ellos se han estudiado los ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA, obtenidos a partir del espectro de protón, en distintas variedades, asociadas, en algunos casos, a las DOPs presentes en nuestro estudio y pertenecientes a cinco campañas consecutivas (desde 2004-2005 a 2008-2009). Se ha aplicado Análisis Multivariante, en concreto, Análisis Clúster y Análisis de la Varianza Multivariante (MANOVA). En un tercero y último, se realiza un estudio comparativo entre los ácidos

grasos, SAFA, MUFA y PUFA, obtenidos a partir de los espectros de carbono y de protón, en muestras de DOPs (Estepa, Sierra de Cazorla, Priego de Córdoba, Poniente de Granada, Montoro-Adamuz, Antequera y Sierra de Cádiz) correspondientes a cuatro campañas consecutivas (2007-2008 a 2010-2011). Para ello se estudian los errores cuadráticos medios con respecto a los valores obtenidos por la técnica de referencia (GC), analizándose cuatro estimaciones diferentes. A continuación se encuentra la explicación detallada.

3.1. ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LAS POSICIONES 1,3 Y 2 DEL GLICEROL

A la vista de los resultados reflejados en las *Tablas 5.41 a 5.57*, donde se muestra el contenido de ácidos grasos saturados, vaccénico+gadoleico, oleico y linoleico en la posición 1,3 y oleico y linoleico en la posición 2, así como los valores r_1 y r_2 (r_1 representa el tanto por ciento de área del ácido oleico en la posiciones 1,3 dividido por el tanto por ciento de área en la posición 2 (oleico 1,3/oleico 2) y r_2 (linoleico 1,3 / linoleico 2), representa el tanto por ciento de área del ácido linoleico en las posiciones 1,3 dividido por el correspondiente tanto por ciento de área en la posición 2) siendo calculados en la zona carbonílica, se confirma que los ácidos insaturados son orientados preferentemente a la posición 2 (r_1 y r_2 tienden a ser menores de 2, en todos los casos excepto en las muestras 51G1, 13DO6, 36DO6 y 3DO7), pero la selectividad es mayor para el linoleico que para el oleico. En nuestras condiciones de trabajo, el ácido linolénico por tener un contenido inferior al 1%, no se detecta en ningún caso por RMN de ^{13}C , apareciendo, en cambio, como un triplete perfectamente diferenciado de las señales del resto de los ácidos grasos al estudiar la zona de los metilos terminales por RMN de ^1H . Por otra parte, los ácidos vaccénico+ gadoleico se

pueden cuantificar muy bien en diversas zonas del espectro de RMN de ^{13}C . La distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol sólo es posible por RMN ^{13}C . Por todo lo dicho ambas técnicas son complementarias en el estudio de la química de aceite de oliva virgen. En las *Tablas 5.57 a 5.73* se comparan los valores de r_1 y r_2 obtenidos tanto en la zona carbonílica como en la olefínica, observándose que dichos parámetros difieren muy poco en el contenido de ácido oleico, pero sí lo hacen para el linoleico. El rango de valores para r_1 en la zona carbonílica está entre 1,9 y 1,3, muy similar al de r_1 en la zona olefínica que está entre 1,8 y 1,3. Para r_2 en la zona carbonílica encontramos valores entre 0 y 2,3, aunque lo normal es que se sitúen debajo de 2, a excepción de las muestras que se mostraron anteriormente; sin embargo, r_2 en la zona olefínica presentan un rango más estrecho, entre 0,5 y 1,6.

Por otro lado, el perfil característico de las muestras de aceite de oliva respecto a otros aceites vegetales en RMN ^{13}C , por ejemplo en la zona carbonílica, podría distinguirlo de otros aceites vegetales, tal y como se muestra en la *Figura 5.6*.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN) aplicada al estudio de aceites de oliva.

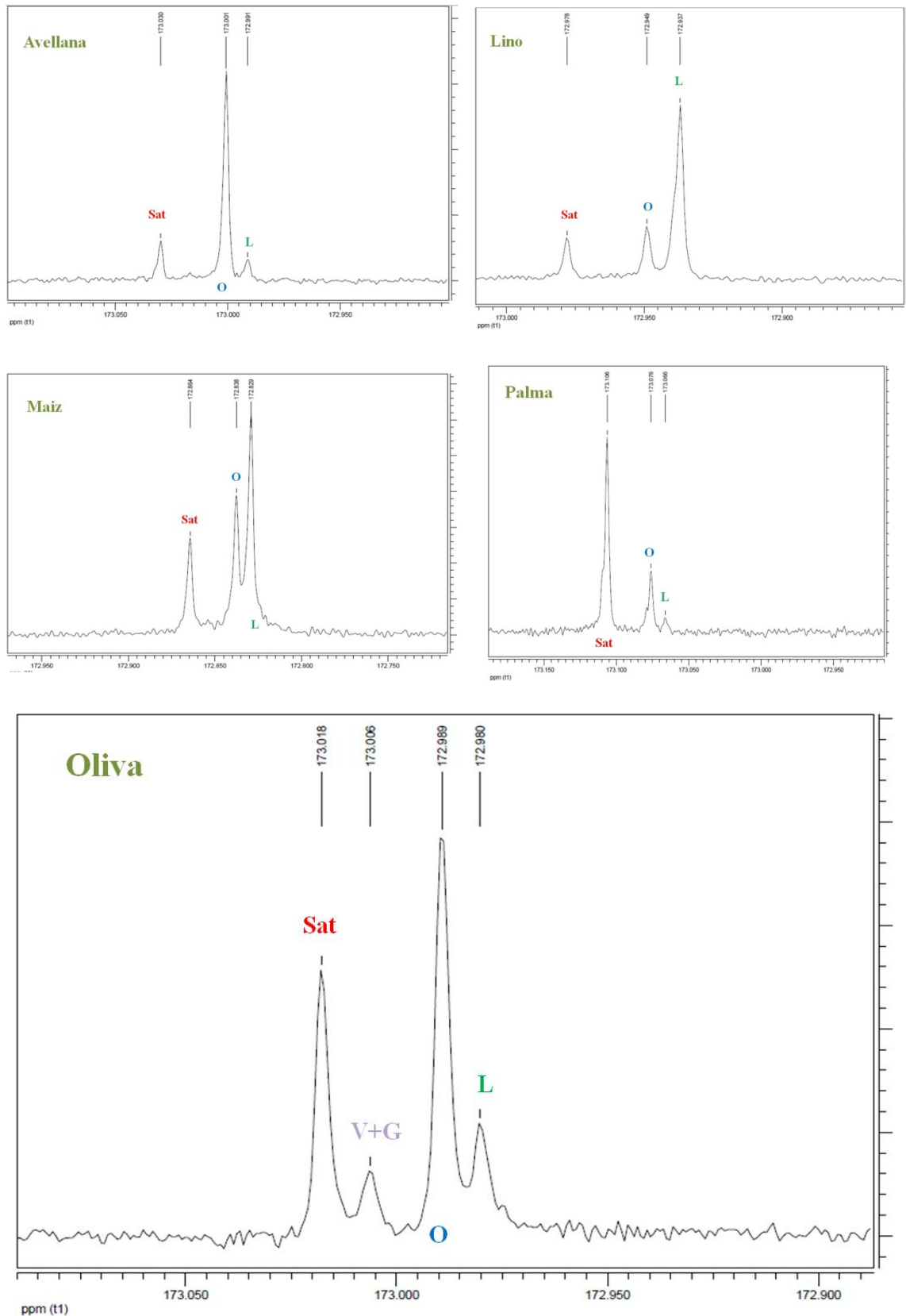


Figura 5.6. Comparación de diferentes aceites en la zona carbonílica (posiciones 1,3 del glicerol) por ^{13}C RMN. Sat, V+G, O y L denotan ácidos grasos saturados, vaccénico+gadoleico, oleico y linoleico, respectivamente,

3.2. ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS (SAFA, MUFA Y PUFA) MEDIANTE ¹H RMN, APLICANDO ANÁLISIS MULTIVARIANTE.

En este estudio se han analizado los datos extraídos del espectro de RMN de ¹H de 320 muestras de distintas variedades de aceituna (fundamentalmente, Zaity, Arbequina, Gordal, Frantoio, Hojiblanca y Picual), de cinco campañas consecutivas (2004-2005 a 2008-2009), asociadas, a DOPs andaluzas (Estepa, Antequera, Sierra de Cádiz, Lucena, Montoro-Adamuz, Poniente de Granada, Priego de Córdoba y Sierra de Cazorla) y, en algunos casos, a muestras procedentes de Tarragona.

Según Rallo y col. [10] los aceites se pueden clasificar en cuatro grupos según el contenido en ácidos grasos, en función de la relación MUFA/PUFA:

- Grupo I: MUFA/PUFA > 11. Son aceites que presentan alto contenido en oleico y bajo en palmítico y linoleico.
- Grupo II: MUFA/PUFA entre 11 y 6.
- Grupo III: MUFA/PUFA entre 6 y 4. Presentan alto contenido en palmítico y medio-alto en linoleico.
- Grupo IV: MUFA/PUFA < 4. Tienen un contenido en linoleico inusualmente alto.

De acuerdo a esta clasificación, nuestros aceites analizados comprenden todos los grupos.

A los datos se les aplica análisis multivariante, para ello se van a observar distintas variables, por un lado estarán las variables categóricas (variedad, procedencia, DOP y campaña) y por otro las variables numéricas (ácidos grasos SAFA, MUFA y

PUFA, cuya determinación se ha llevado a cabo mediante el procedimiento citado en el Apartado 2.4.1).

Para ver, de forma global, la distribución, se representan los diagramas de caja (Figura 5.7.) para las variables SAFA, MUFA y PUFA. En este diagrama se puede observar que la dispersión de los datos de MUFA y PUFA es superior a la de SAFA. También se observa que en las variables MUFA y PUFA se presentan valores atípicos (Outliers) que corresponden a los casos 77, 78 y 79, los cuales pertenecen a aceites vegetales de maíz, soja con girasol y girasol, respectivamente.

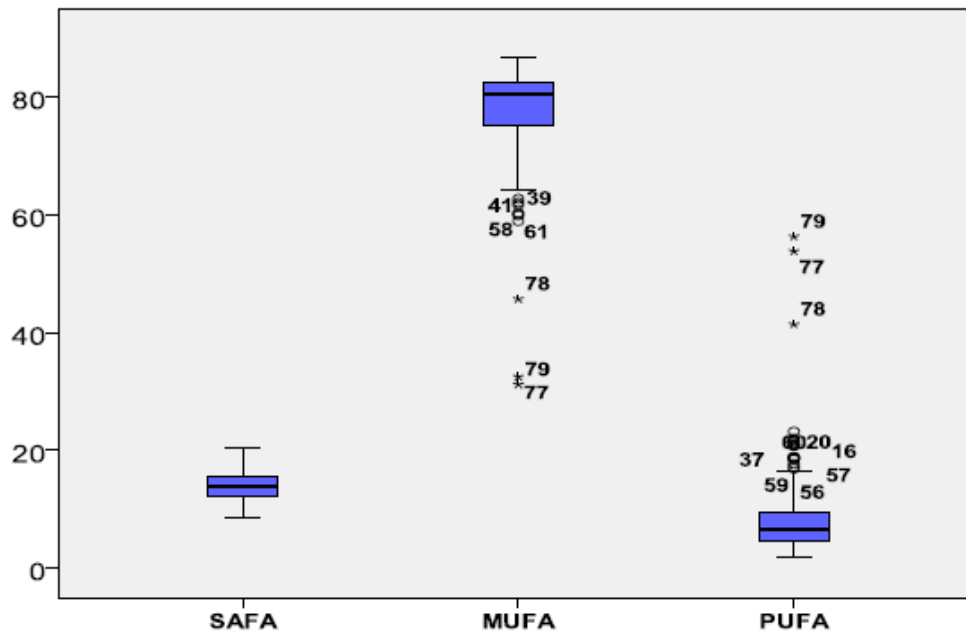


Figura 5.7. Diagrama de caja para las variables SAFA, MUFA y PUFA.

Para clasificar las distintas variedades de aceites en base al contenido en ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA, se aplica Análisis Clúster Jerárquico aglomerativo (Los clúster son formados agrupando casos o variables en conglomerados cada vez más grandes, hasta que todos formen parte de uno único, de forma que inicialmente existirán tantos clúster como casos y al final unos solo; además, una vez formado un clúster no

puede dividirse). Una vez que los aceites se han clasificado en tres grupos de características similares, se muestran los resultados (Tabla 5.1.) obtenidos al cruzar el clúster de pertenecía con la variedad de aceituna, considerando solamente las mayoritarias. En la Figura 5.8. se puede observar la relación entre el clúster de pertenencia y la variedad asociada

Tabla 5.1. Tabla de contingencia obtenida al cruzar el número de clúster y variedad.

	Variedad						Total
	Zaity	Arbequina	Frantoio	Gordal	Picual	Hojiblanca	
Clúster 1	3	4	1	0	81	77	166
Clúster 2	11	15	18	0	10	10	64
Clúster 3	0	10	2	18	0	1	31
Total	14	29	21	18	91	88	261

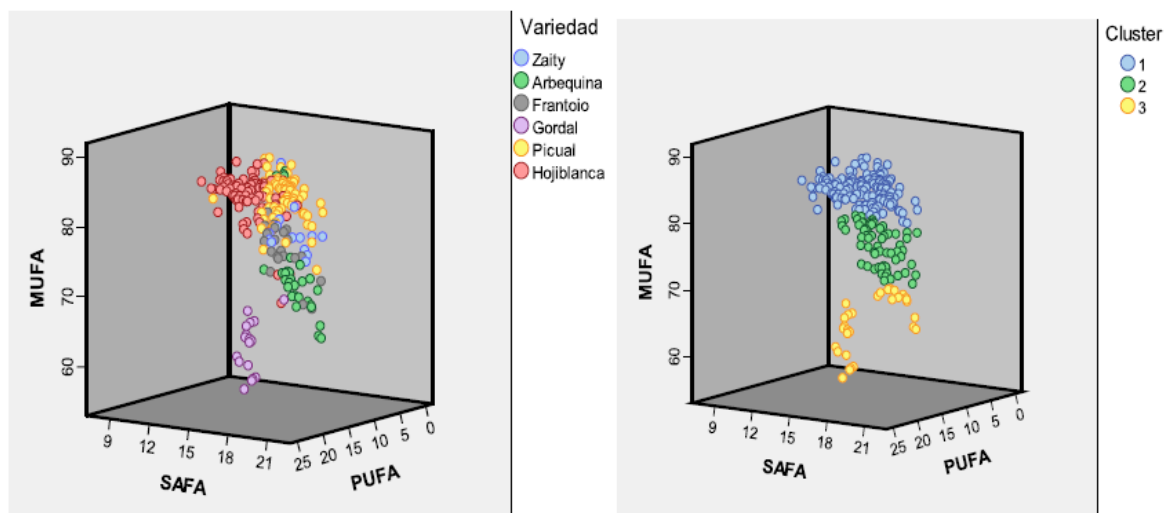


Figura 5.8. Representación según variedad y clúster.

De aquí se observa que el Clúster 1 se asocia a las variedades Picual y Hojiblanca, el Clúster 2, está relacionado con las variedades Zaity, Arbequina y Frantoio. La variedad Gordal está asociada al Clúster 3.

Mediante un Análisis de la Varianza Multivariante (MANOVA) se pretende determinar si dos variables categóricas, en este caso campaña y DOP, y las interacciones entre ellas, influyen en el contenido de ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA. Así, se pone de manifiesto que el factor campaña afecta al contenido de ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA del aceite; sin embargo, el factor denominación de origen influye únicamente en el contenido de ácidos SAFA y MUFA, pero no PUFA (la interacción entre los factores afecta sólo en el contenido de ácidos SAFA). Una vez determinados los factores que influyen en las correspondientes variables dependientes, la realización de un contraste *post hoc* -como son los contrastes de Tukey o Bonferroni- permite determinar los niveles concretos de los factores que difieren significativamente entre sí. En la *Figura 5.9* se representa el contenido medio para cada tipo de ácido y para cada uno de los niveles de los dos factores (campaña y denominación de origen), obteniéndose que:

- Las campañas de recogida de la aceituna 2007/08 y 2008/09 son las más diferentes con respecto al contenido en ácidos MUFA y PUFA, puesto que el contenido en ácidos SAFA no muestra diferencias significativas por campañas;
- por otra parte, las denominaciones de origen de Antequera y Estepa son las que más difieren en el contenido en ácidos SAFA, Estepa y Sierra de Cazorla son las más diferentes en el contenido en ácidos MUFA, mientras que el contenido en ácidos PUFA distingue fundamentalmente a la denominaciones de Estepa y Poniente de Granada.

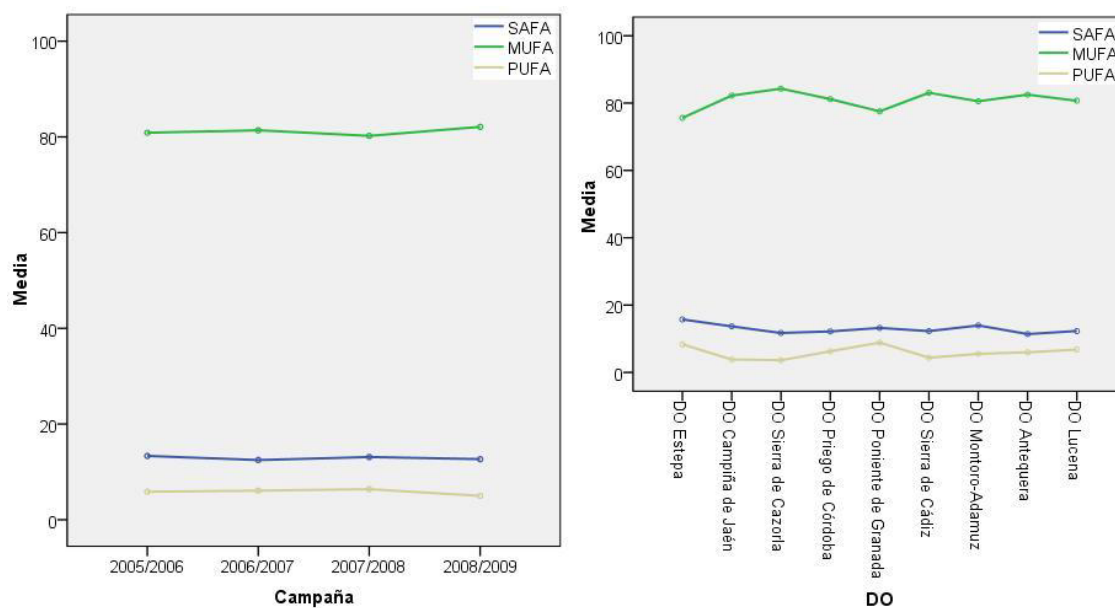


Figura 5.9. Gráficos de medias para cada tipo de ácido por campaña y por DOP.

3.3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS SAFA, MUFA Y PUFA MEDIANTE LOS ESPECTROS RMN DE ^{13}C Y ^1H .

En este caso, se han estudiado 128 muestras de aceites de oliva vírgenes extra procedentes de diferentes DOPs andaluzas (Estepa, Sierra de Cazorla, Priego de Córdoba, Poniente de Granada, Montoro-Adamuz, Antequera y Sierra de Cádiz), pertenecientes a cuatro campañas consecutivas (de 2007-2008 a 2010-2011), presentando un índice de madurez de 3. Las variedades estudiadas han sido, principalmente, Arbequina, Hojiblanca, Picual, Lechín, Manzanilla, Picudo y Royal.

Se pretende utilizar procedimientos estadísticos, para estimar, utilizando la información que proporcionan las cuatro zonas espectrales (las tres obtenidas de las zonas carbonílica, carbono 16 y carbonos alifáticos del espectro ^{13}C RMN (Apartado 2.5.1) y la asociada al espectro ^1H RMN (Apartado 2.4.1.), el contenido en ácidos

SAFA, MUFA y PUFA de las muestras de aceite, utilizando como referencia los valores obtenidos por cromatografía de gases (técnica clásica).

Tal y como se ha indicado anteriormente en el proceso de adquisición de datos, se han observado aceites pertenecientes a $i=1,2,\dots,7$ denominaciones de origen protegidas, DOP (Estepa –E-, Sierra de Cazorla –SCz-, Priego de Córdoba –PC-, Poniente de Granada –PG-, Montoro-Adamuz –MA-, Antequera –A, Sierra de Cádiz –SCd-) extrayéndose, en cada caso, una muestra de tamaño $n_i : n_1 = 16, n_2 = 8, n_3 = 12, n_4 = 24, n_5 = 28, n_6 = 28, n_7 = 12$ (en total, $N = 128$ aceites observados). Para cada aceite se conoce el contenido en ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA proporcionado por cromatografía de gases y por las $k = 1, 2, 3, 4$ técnicas RMN (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Parte de la matriz de datos obtenida en el proceso de adquisición de datos

	CG			¹³ C NMR									¹ H NMR		
				Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona C Alifáticos					
	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
E	17	72,8	10,1	17,1	69,3	13,6	19,08	70,57	10,3	17,6	73,5	8,86	16,6	74,3	9,06
	15,5	75,5	9,1	16,1	72,1	11,8	17,04	74,05	8,9	15,7	76,3	8,04	14,2	78	7,85
	⋮			⋮			⋮			⋮			⋮		
	16,7	71,2	12,1	18	68,4	13,5	18,96	68,96	12,1	9,9	80,8	9,3	17,7	73,1	9,2
SCz	12,5	80,6	6,8	12,7	77,1	10,2	13,64	79,97	6,39	11,7	82,9	5,39	10,7	83,8	5,57
	14,2	81,1	4,8	14,3	77,1	8,54	15,18	80,2	4,62	11	85,1	3,82	14,6	81,5	3,86
	⋮			⋮			⋮			⋮			⋮		
	11,8	84,6	3,6	11,8	82,9	5,27	13,05	83,33	3,61	8,1	88,6	3,3	8,3	90,8	0,9
⋮						⋮									

Capítulo 5

SCd	13,3	80	6,7	13,4	75,6	11,1	14,6	79,4	6	10,9	81,8	7,3	12,8	82,9	4,3
	12,5	83	4,5	12,8	77,6	9,6	13,8	82,2	3,9	12	83,4	4,6	12,1	84	3,9
	⋮			⋮			⋮			⋮			⋮		
	14,8	78,2	7	17,3	82,7	0	19,36	74,73	5,9	15,5	77,4	7,1	13,8	80,4	5,7

Tabla 5.3. Notación empleada para las observaciones que constituyen la matriz de datos

	CG			¹³ C NMR									¹ H NMR		
				Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona C alifáticos					
	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
E	$y_{1,1}^S$	$y_{1,1}^M$	$y_{1,1}^P$	$x_{1,1,1}^S$	$x_{1,1,1}^M$	$x_{1,1,1}^P$	$x_{1,2,1}^S$	$x_{1,2,1}^M$	$x_{1,2,1}^P$	$x_{1,3,1}^S$	$x_{1,3,1}^M$	$x_{1,3,1}^P$	$x_{1,4,1}^S$	$x_{1,4,1}^M$	$x_{1,4,1}^P$
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	$y_{1,n}^S$	$y_{1,n}^M$	$y_{1,n}^P$	$x_{1,1,n}^S$	$x_{1,1,n}^M$	$x_{1,1,n}^P$	$x_{1,2,n}^S$	$x_{1,2,n}^M$	$x_{1,2,n}^P$	$x_{1,3,n}^S$	$x_{1,3,n}^M$	$x_{1,3,n}^P$	$x_{1,4,n}^S$	$x_{1,4,n}^M$	$x_{1,4,n}^P$
SCz	$y_{2,1}^S$	$y_{2,1}^M$	$y_{2,1}^P$	$x_{2,1,1}^S$	$x_{2,1,1}^M$	$x_{2,1,1}^P$	$x_{2,2,1}^S$	$x_{2,2,1}^M$	$x_{2,2,1}^P$	$x_{2,3,1}^S$	$x_{2,3,1}^M$	$x_{2,3,1}^P$	$x_{2,4,1}^S$	$x_{2,4,1}^M$	$x_{2,4,1}^P$
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	$y_{2,n}^S$	$y_{2,n}^M$	$y_{2,n}^P$	$x_{2,1,n}^S$	$x_{2,1,n}^M$	$x_{2,1,n}^P$	$x_{2,2,n}^S$	$x_{2,2,n}^M$	$x_{2,2,n}^P$	$x_{2,3,n}^S$	$x_{2,3,n}^M$	$x_{2,3,n}^P$	$x_{2,4,n}^S$	$x_{2,4,n}^M$	$x_{2,4,n}^P$
⋮															
SCd	$y_{7,1}^S$	$y_{7,1}^M$	$y_{7,1}^P$	$x_{7,1,1}^S$	$x_{7,1,1}^M$	$x_{7,1,1}^P$	$x_{7,2,1}^S$	$x_{7,2,1}^M$	$x_{7,2,1}^P$	$x_{7,3,1}^S$	$x_{7,3,1}^M$	$x_{7,3,1}^P$	$x_{7,4,1}^S$	$x_{7,4,1}^M$	$x_{7,4,1}^P$
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	$y_{7,n}^S$	$y_{7,n}^M$	$y_{7,n}^P$	$x_{7,1,n}^S$	$x_{7,1,n}^M$	$x_{7,1,n}^P$	$x_{7,2,n}^S$	$x_{7,2,n}^M$	$x_{7,2,n}^P$	$x_{7,3,n}^S$	$x_{7,3,n}^M$	$x_{7,3,n}^P$	$x_{7,4,n}^S$	$x_{7,4,n}^M$	$x_{7,4,n}^P$

Para el posterior tratamiento de los datos, la matriz referida en la *Tabla 5.2* será subdividida en cajas, cuyos elementos se denotarán de la forma indicada en la *Tabla 5.3*. Los subíndices de los elementos refieren, respectivamente, la DOP (*i*), la zona de RMN (*k*) y la posición en la submuestra de la DOP (*j*). Los superíndices *S*, *M*, *P* hacen referencia a los ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA.

Teniendo en cuenta esta notación, los errores cuadráticos medios que se producen al estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA obtenido mediante cromatografía de

gases mediante los respectivos contenidos proporcionados por las cuatro zonas de RMN tienen las siguientes expresiones:

$$MSE_k^S = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^7 \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^S - x_{i,k,j}^S \right)^2,$$

$$MSE_k^M = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^7 \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^M - x_{i,k,j}^M \right)^2, \quad (1)$$

$$MSE_k^P = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^7 \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^P - x_{i,k,j}^P \right)^2,$$

$$k = 1, 2, 3, 4$$

Y las expresiones que diferencian entre DOP son:

$$MSE_{i,k}^S = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^S - x_{i,k,j}^S \right)^2, \quad MSE_{i,k}^M = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^M - x_{i,k,j}^M \right)^2, \quad MSE_{i,k}^P = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^P - x_{i,k,j}^P \right)^2,$$

$$i = 1, \dots, 7, \quad j = 1, \dots, n_i \quad (2)$$

La *Tabla 5.4* presenta el error cuadrático medio cometido al estimar el contenido de cada uno de los tres tipos de ácidos grasos y mediante cada una de las zonas RMN. Se presentan los resultados totales y los obtenidos en cada DOP.

Tabla 5.4. MSE total y por DOP obtenido para cada zona de RMN y para cada tipo de ácido graso.

	¹³ C NMR									¹ H NMR		
	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona C alifáticos					
MSE	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
Estepa	1,285	30,063	36,589	3,795	3,32	0,11	9,249	10,763	2,124	2,272	7,105	2,848
Sierra de Cazorla	0,138	19,989	21,179	1,547	0,979	0,205	13,699	16,318	1,213	5,705	22,734	6,247
Priego de Córdoba	0,59	13,387	84,005	2,16	1,495	0,25	10,814	13,943	2,194	5,711	19,785	4,656

Poniente de Granada	1,694	16,93	17,735	3,352	6,265	2,676	2,839	5,317	2,666	8,666	28,762	7,466
Montoro-Adamuz	2,392	14,002	13,873	5,225	4,168	1,086	7,9276	7,430	2,624	4,398	19,522	7,178
Antequera	2,811	10,54	13,754	10,24	8,097	0,55	5,875	3,253	2,177	5,149	17,506	5,012
Sierra de Cádiz	0,704	23,728	23,808	5,264	3,397	0,302	2,828	3,036	1,075	0,719	9,639	5,237
TOTAL	1,746	17,03	25,373	5,278	4,792	0,938	6,843	7,292	2,198	4,956	18,56	5,74

A continuación, se indicarán las sucesivas formas propuestas para estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA de los diversos aceites (usando los valores obtenidos mediante cromatografía de gases como referencia) empleando la información proporcionada mediante RMN.

- **Estimación 1. Usando la zona carbono 16 del espectro ^{13}C RMN**

A partir de la *Tabla 5.4* puede observarse que, si bien los resultados son diferentes en cada DOP, los mejores resultados totales se obtienen al estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA utilizando la estimación que proporciona la zona carbono 16 del espectro RMN ($MSE_2^S = 5,278$, $MSE_2^M = 4,792$, $MSE_2^P = 0,938$). En tal caso, la primera estimación que se propone para predecir el contenido en ácidos grasos del aceite pasa con considerar la estimación que proporciona el espectro RMN en la zona carbono 16, dado que proporciona un menor MSEC:

$$\hat{y}_{i,j}^{1S} = x_{i,2,j}^S, \quad \hat{y}_{i,j}^{1M} = x_{i,2,j}^M, \quad \hat{y}_{i,j}^{1P} = x_{i,2,j}^P, \quad i = 1, \dots, 7, \quad j = 1, \dots, n_i$$

- **Estimación 2. Usando el promedio de los valores obtenidos por cada una de las cuatro zonas RMN**

A la vista de la *Figura 5.10*, parece intuirse que un promedio de las estimaciones obtenidas por las cuatro zonas RMN podría proporcionar una estimación más próxima al valor de referencia obtenido por GC (dado que unas estimaciones difieren por exceso y

otras por defecto del valor observado por GC). Además, este procedimiento permite utilizar toda la información estadística que el espectro ^1H y el espectro ^{13}C (en sus tres zonas) proporcionan. De este modo, la segunda estimación que se considera para estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA es:

$$\hat{y}_{i,j}^{2S} = \frac{1}{4} \sum_{k=1}^4 x_{i,k,j}^S, \quad \hat{y}_{i,j}^{2M} = \frac{1}{4} \sum_{k=1}^4 x_{i,k,j}^M, \quad \hat{y}_{i,j}^{2P} = \frac{1}{4} \sum_{k=1}^4 x_{i,k,j}^P, \quad i = 1, \dots, 7, \quad j = 1, \dots, n_i$$

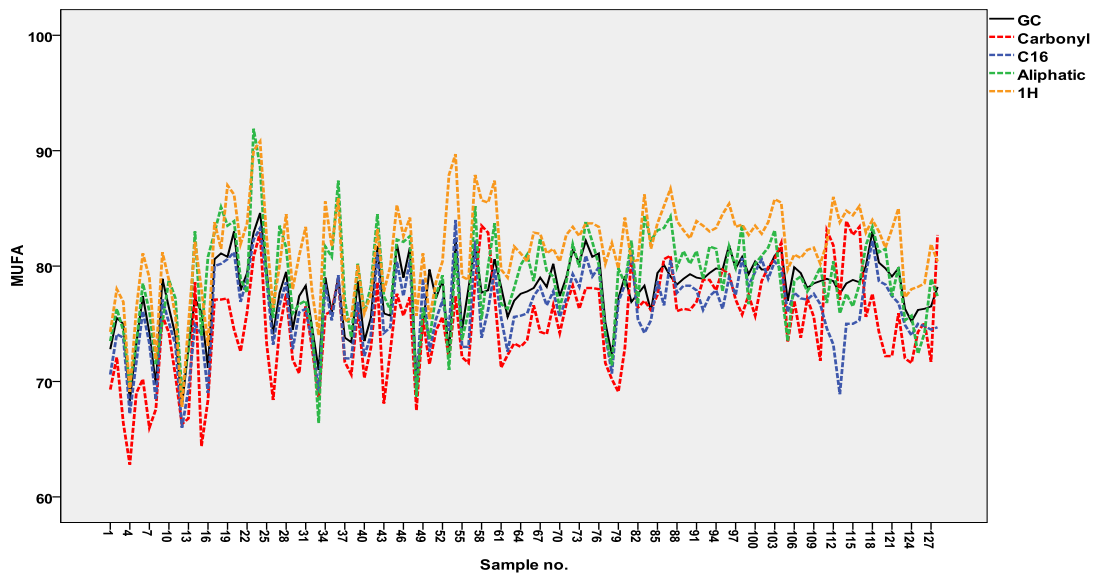


Figura 5.10. Contenido en MUFA obtenido mediante GC y las cuatro zonas RMN.

Por otra parte, si se considera al error cuadrático medio como una medida (inversamente proporcional) de la precisión obtenida al estimar el contenido en cada uno de los ácidos a partir de cada una de las zonas (y en cada DOP), una estimación más acertada que la proporcionada anteriormente se obtiene al realizar el promedio ponderando los valores por el inverso del error cuadrático medio obtenido en cada caso. Llevar a la práctica este procedimiento no sería factible dado que la estimación que se propone requeriría conocer los valores del error cuadrático medio para cada ácido y cada zona, y este hecho conllevaría conocer los valores de SAFA, MUFA y PUFA obtenidos mediante

cromatografía de gases, técnica considerada de referencia (es decir, para obtener esta estimación del valor real es necesario conocer el valor real; por tanto, carece de sentido proporcionar una estimación).

De manera alternativa, se propone reservar aproximadamente un 20% de los aceites observados (en total, 26 de los 128, considerando la representatividad de las distintas DOP). Después, obtener los errores cuadráticos medios (de ajuste o calibración) para cada ácido y zona RMN usando el 80% de los datos restantes (102). Finalmente, utilizar estos errores cuadráticos medios para corregir las estimaciones proporcionadas mediante el 20% de los datos restantes. Siempre y cuando la muestra considerada (muestra piloto) fuese representativa de la población de aceites (y las submuestras representativas de las diferentes DOP consideradas) estos errores se podrían considerar estimaciones de los errores cuadráticos medios que se cometerían al estimar cada tipo de ácido, a partir de cada zona y en cada DOP y podrían utilizarse para ponderar los datos en predicciones posteriores en el sentido que a continuación se propone.

En adelante, se denotará por n'_i ($i = 1, 2, \dots, 7$) al tamaño de submuestra relativa a la DOP i utilizada para calibración ($N' = \sum_{i=1}^7 n'_i$) y, por tanto, $n_i - n'_i$ representa el número de observaciones reservadas para predicción, en cada caso. Las observaciones han sido seleccionadas aleatoriamente en cada DOP y, buscando la representatividad de la muestra total, se han seleccionado aproximadamente un 20% de aceites por DOP, que suponen también aproximadamente un 20% sobre el total. Así, $n'_1 = 13$, $n'_2 = 6$, $n'_3 = 10$, $n'_4 = 19$, $n'_5 = 22$, $n'_6 = 22$, $n'_7 = 10$, $N' = 102$.

Los errores cuadráticos medios de calibración (calculados usando expresiones similares a las determinadas en (1), empleando la muestra de tamaño N' y las submuestras

de tamaño n_i) para cada técnica y tipo de ácido se denotan mediante $MSEC_k^S$, $MSEC_k^M$, $MSEC_k^P$ ($k=1,2,3,4$) y las expresiones de calibración que diferencian entre DOP (con expresiones similares a las recogidas en (2)) se denotan por $MSEC_{i,k}^S$, $MSEC_{i,k}^M$, $MSEC_{i,k}^P$ ($i=1,2,\dots,7$, $k=1,2,3,4$).

- **Estimación 3.** *Usando el promedio ponderado de los valores obtenidos a partir de cada una de las zonas RMN, con pesos inversamente proporcionales al MSEC total cometido en cada caso*

En este caso, teniendo en cuenta todos los comentarios anteriores, las observaciones reservadas para predicción serán ponderadas inversamente por el error cuadrático medio de calibración obtenido para cada tipo de técnica RMN y ácido:

$$\hat{y}_{i,j}^{3S} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{x_{i,k,j}^S}{MSEC_k^S}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_k^S}}, \quad \hat{y}_{i,j}^{3M} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{x_{i,k,j}^M}{MSEC_k^M}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_k^M}}, \quad \hat{y}_{i,j}^{3P} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{x_{i,k,j}^P}{MSEC_k^P}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_k^P}}, \quad i=1,\dots,7, \quad j=1,\dots,n_i - n_i'$$

- **Estimación 4.** *Usando el promedio ponderado de los valores obtenidos por cada una de las cuatro zonas RMN, con pesos inversamente proporcionales al MSEC cometido, para cada DOP, en cada caso.*

En este caso, teniendo en cuenta que se conoce la DOP (entre las 7 posibles) a la que pertenece un aceite, puede considerarse que la precisión en las estimaciones por cada tipo de zona RMN puede diferir según la DOP considerada. De este modo, en este caso se considera como estimación del contenido en los diversos ácidos SAFA, MUFA y PUFA el promedio ponderado, donde cada observación está acompañada de un peso inversamente

proporcional al error cuadrático medio de calibración existente, para cada tipo de ácido, en su DOP de procedencia:

$$\hat{y}_{i,j}^{4S} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{x_{i,k,j}^S}{MSEC_{i,k}^S}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_{i,k}^S}}, \quad \hat{y}_{i,j}^{4M} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{x_{i,k,j}^M}{MSEC_{i,k}^M}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_{i,k}^M}}, \quad \hat{y}_{i,j}^{4P} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{x_{i,k,j}^P}{MSEC_{i,k}^P}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_{i,k}^P}}, \quad i = 1, \dots, 7, \quad j = 1, \dots, n_i - n_i'$$

Finalmente, para cada estimación propuesta (y tipo de ácido) pueden calcularse los errores cuadráticos medios de predicción mediante la expresión genérica:

$$MSEP = \frac{1}{N - N'} \sum_{i=1}^7 \sum_{j=1}^{n_i - n_i'} (y_{i,j} - \hat{y}_{i,j})^2,$$

o bien distinguiendo entre DOP:

$$MSEP_i = \frac{1}{n_i - n_i'} \sum_{j=1}^{n_i - n_i'} (y_{i,j} - \hat{y}_{i,j})^2, \quad i = 1, 2, \dots, 7$$

La *Tabla 5.5* muestra los errores cuadráticos medios de predicción que se obtienen al estimar cada tipo de ácido empleando cada zona RMN. Se han considerado los MSEP referidos a las cuatro estimaciones propuestas -E1, E2, E3, E4- y además los que se obtienen al emplear las zonas RMN directamente (que no difieren significativamente de los MSE, recogidos en la *Tabla 5.4* calculados al considerar el 100% de los datos). La mejor estimación se obtiene al realizar el promedio ponderado de los valores obtenidos mediante las cuatro zonas RMN, empleando como pesos los inversos de los MSEC para cada ácido y DOP. Esta conclusión es lógica, dado que este último estimador es el que consigue emplear toda la información que los datos disponibles proporcionan, contemplando todas sus fuentes de variabilidad conocidas.

Tabla 5.5. MSEP para cada tipo de ácido y técnica de estimación empleada.

Técnica	MSEP		
	SAFA	MUFA	PUFA
Zona Carbonílica ¹³ C RMN	1,211	19,658	25,162
Zona C-16 ¹³ C RMN	6,206	4,674	0,251
Zona C alifáticos ¹³ C RMN	8,578	11,188	1,709
¹ H RMN	7,139	25,348	6,444
Promedio (E2)	0,830	2,213	1,602
Media ponderada MSEC total (E3)	0,599	1,540	0,433
Media ponderada MSEC DOP (E4)	0,501	0,778	0,398

Estos resultados son confirmados a la vista de la *Figura 5.11* donde se representan los errores cuadráticos medios de predicción acumulados para cada técnica en el caso en que se predice el contenido en ácidos MUFA (porcentaje mayoritario). Para los ácidos SAFA y PUFA se obtendrían representaciones similares.

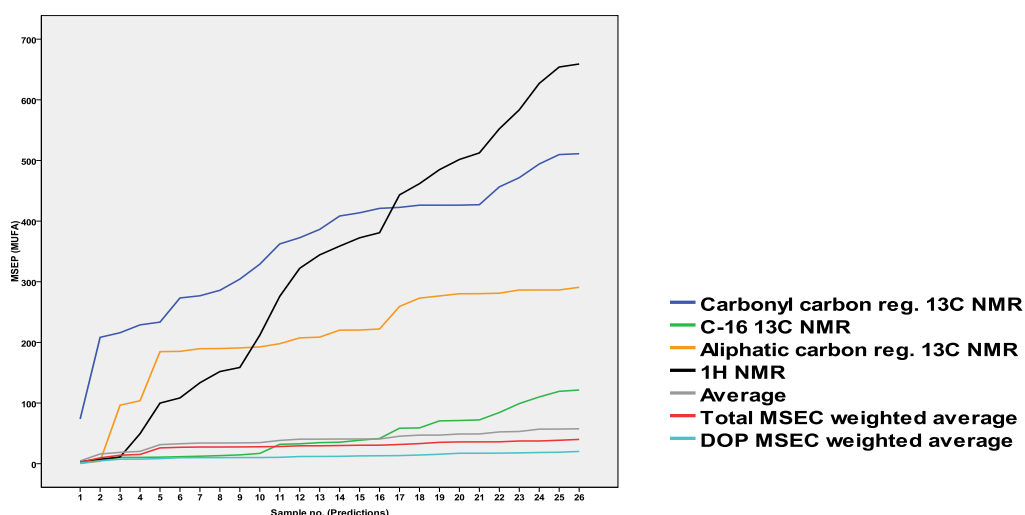


Figura 5.11. MSEP acumulado para el contenido en MUFA para cada técnica de estimación empleada.

Las Figuras 5.12, 5.13 y 5.14 ponen de manifiesto cómo las sucesivas estimaciones propuestas se van aproximando a los valores de referencia obtenidos mediante GC para SAFA, MUFA y PUFA, siendo mejor la estimación 4.

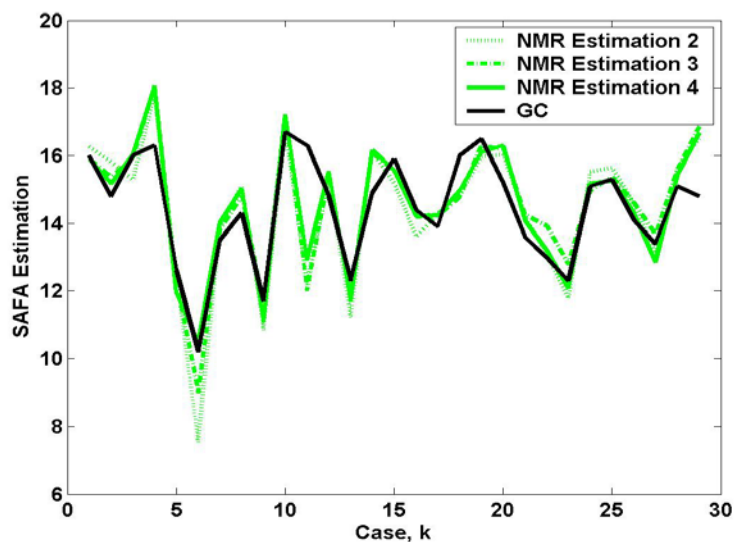


Figura 5.12. Representación de los valores obtenidos con las estimaciones propuestas y los procedentes de GC, para ácidos grasos SAFA.

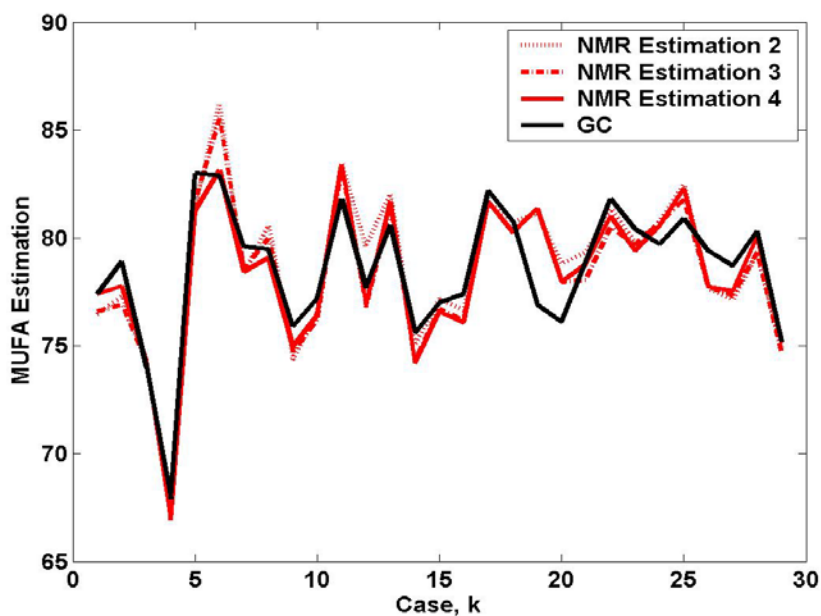


Figura 5.13. Representación de los valores obtenidos con las estimaciones propuestas y los procedentes de GC, para ácidos grasos MUFA.

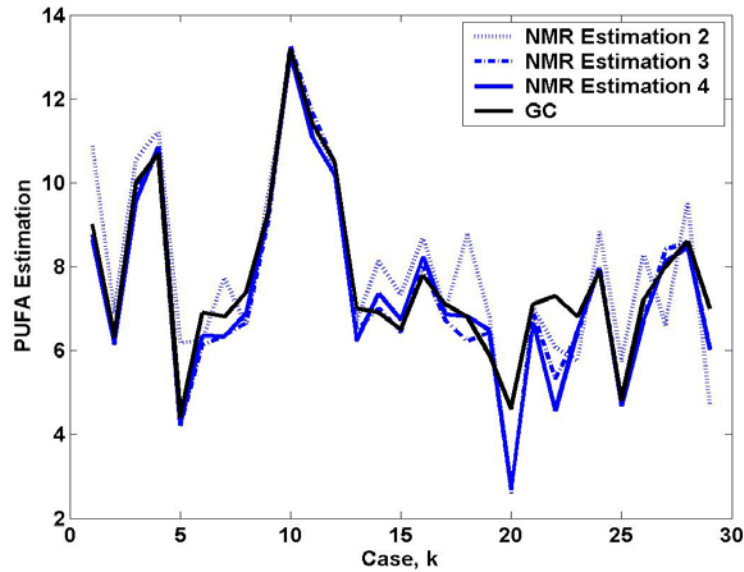


Figura 5.14. Representación de los valores obtenidos con las estimaciones propuestas y los procedentes de GC, para ácidos grasos PUFA.

Las Figuras 5.15, 5.16 y 5.17 representan los pesos por los que se ponderan las observaciones obtenidas mediante cada una de las cuatro zonas RMN en cada DOP en la estimación de ácidos SAFA, MUFA y PUFA. Dichas gráficas ponen de manifiesto aspectos tales como: la zona carbonílica es la más importante en todas las DOP en la determinación de ácidos SAFA y la zona carbono 16 es fundamental en la determinación de ácidos PUFA. Sin embargo, en la determinación de ácidos MUFA existen diferencias por DOP: en Estepa, Sierra de Cazorla, Priego de Córdoba o Montoro-Adamuz tiene un peso superior la zona carbono 16 mientras que en Poniente de Granada o Antequera es la zona correspondiente a los carbonos alifáticos la que tiene asociado un peso superior en la estimación de ácidos MUFA.

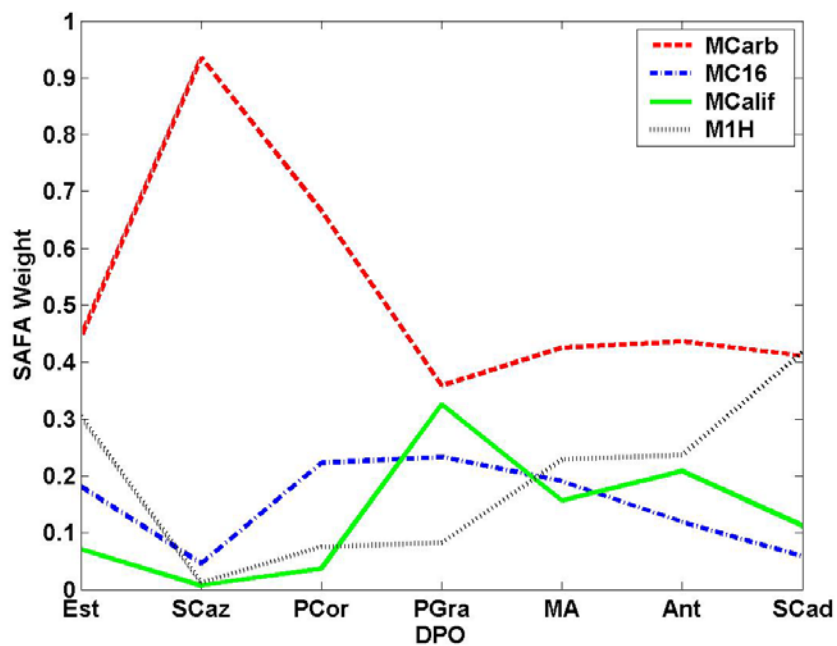


Figura 5.15. Comparación de los pesos correspondientes a las distintas observaciones realizadas en la Estimación 4 para ácidos grasos SAFA.

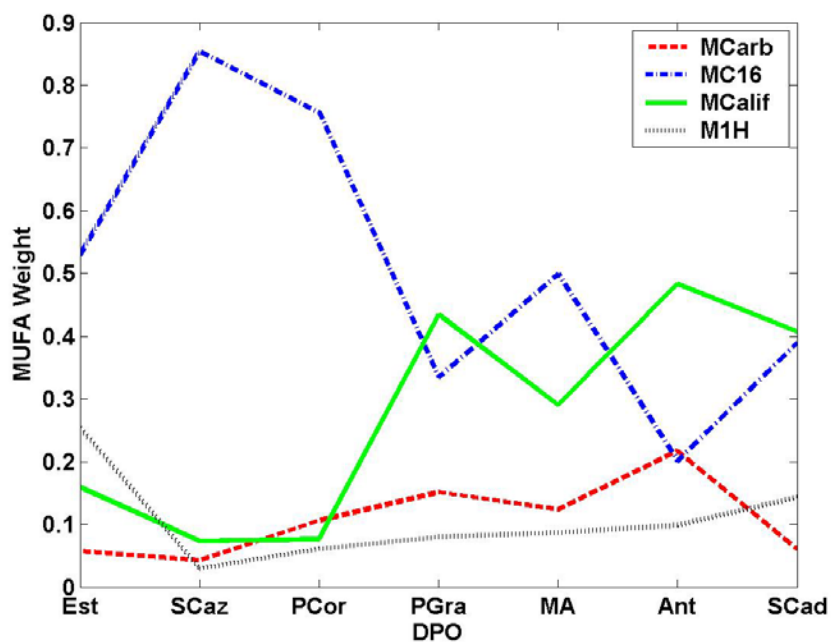


Figura 5.16. Comparación de los pesos correspondientes a las distintas observaciones realizadas en la Estimación 4 para ácidos grasos MUFA.

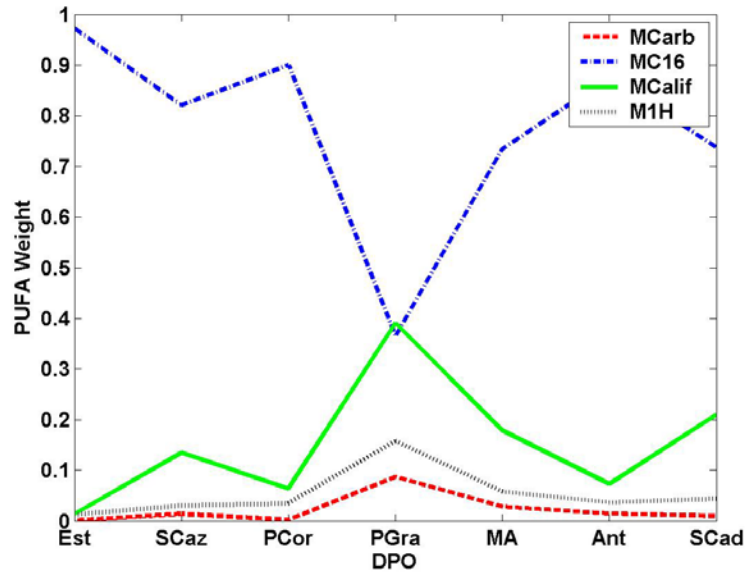


Figura 5.17. Comparación de los pesos correspondientes a las distintas observaciones realizadas en la Estimación 4 para ácidos grasos PUFA.

Generalización de los resultados anteriores mediante validación cruzada

Las conclusiones obtenidas anteriormente se generalizan, a continuación, utilizando procedimientos de validación cruzada (cross-validation). Estos procedimientos están diseñados en base a un algoritmo repetitivo que, en cada iteración, modifica la partición del conjunto de datos originales en conjunto de calibración y conjunto de validación. En cada iteración, el algoritmo proporciona los correspondientes valores MSEC y MSEP.

Las Figuras 5.18, 5.19 y 5.20 comparan los valores MSEP obtenidos para las Estimaciones 2 y 4 de ácidos SAFA, MUFA y PUFA en las diversas iteraciones del algoritmo de validación cruzada. Salvo algunos valores concretos que podrían ser fruto de la aleatoriedad, los valores correspondientes a la Estimación 4 son claramente inferiores a los correspondientes a la Estimación 2 en todas las DOP.

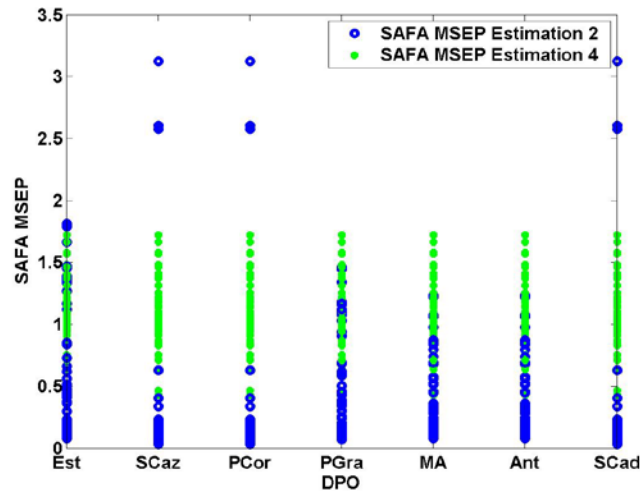


Figura 5.18. Comparación, mediante validación cruzada, de los valores MSEP para las Estimaciones 2 y 4, en ácidos grasos SAFA.

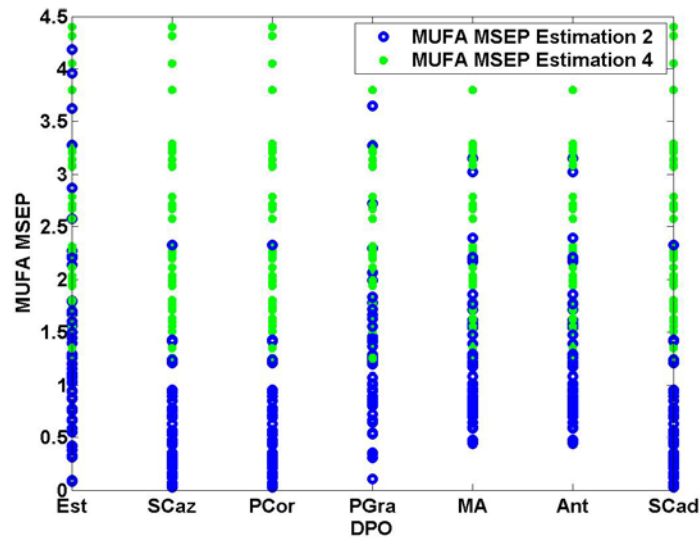


Figura 5.19. Comparación, mediante validación cruzada, de los valores MSEP para las Estimaciones 2 y 4, en ácidos grasos MUFA.

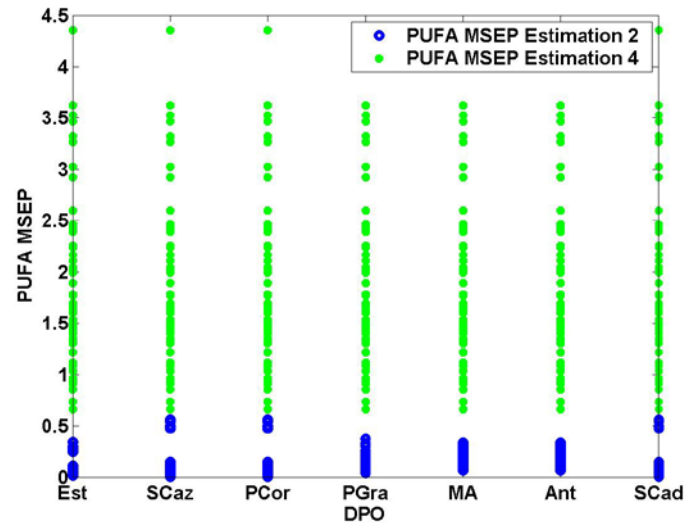


Figura 5.20. Comparación, mediante validación cruzada, de los valores MSEP para las Estimaciones 2 y 4, en ácidos grasos PUFA.

Finalmente, se comparan los pesos correspondientes a las observaciones obtenidas de cada zona RMN y para cada DOP, utilizando validación cruzada (*Figuras 5.21, 5.22 y 5.23*). Se observa que la zona carbonílica es determinante en la estimación de ácidos SAFA en la DOP Sierra de Cazorla. En esta DOP, sin embargo, es la zona carbono 16 la que proporciona estimaciones más precisas de ácidos MUFA.

Estas figuras confirman las conclusiones sobre los pesos realizadas anteriormente para una selección única de conjuntos de calibración y validación (*Figuras 5.15, 5.16 Y 5.17*): las zonas carbonílica y carbono 16 son las fundamentales, en todas las DOP, en la determinación de ácidos SAFA y PUFA, respectivamente. En la determinación de ácidos MUFA, sin embargo, se constatan las diferencias observadas anteriormente por DOP: la zona carbono 16 tiene un peso muy elevado en la estimación de estos ácidos en Estepa, Sierra de Cazorla, Priego de Córdoba o Montoro-Adamuz mientras que la zona de carbonos alifáticos es la más interesante en Poniente de Granada o Antequera.

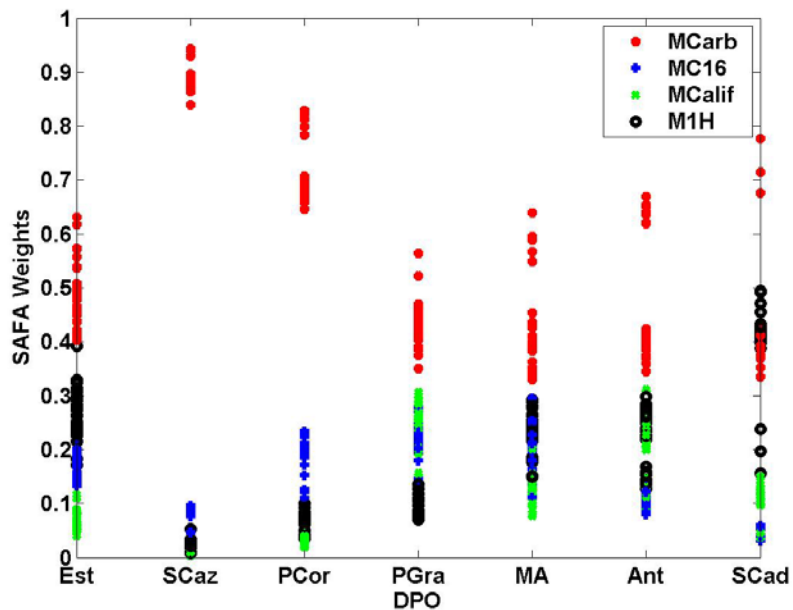


Figura 5.21. Comparación, mediante validación cruzada, de los pesos correspondientes a las distintas observaciones obtenidas en cada zona de RMN, en cada DOP, para ácidos grasos SAFA.

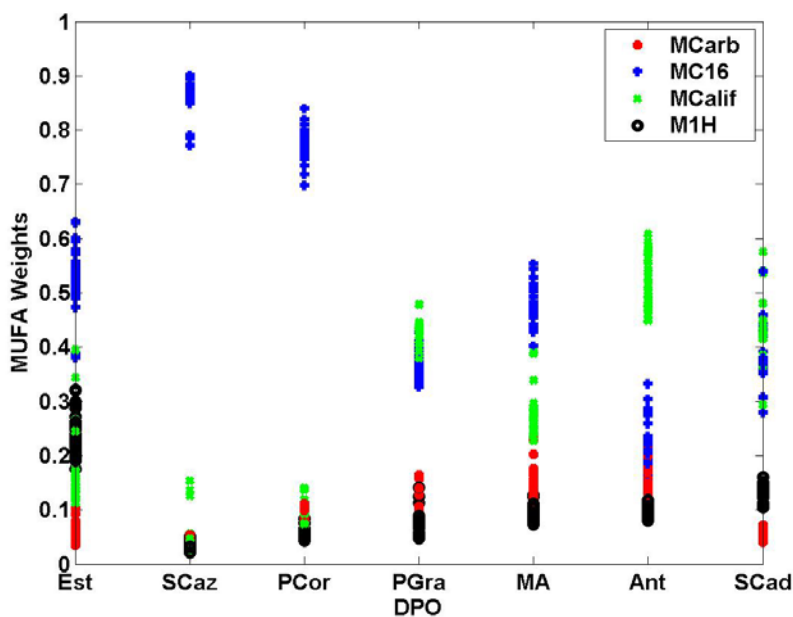


Figura 5.22. Comparación, mediante validación cruzada, de los pesos correspondientes a las distintas observaciones obtenidas en cada zona de RMN, en cada DOP, para ácidos grasos MUFA.

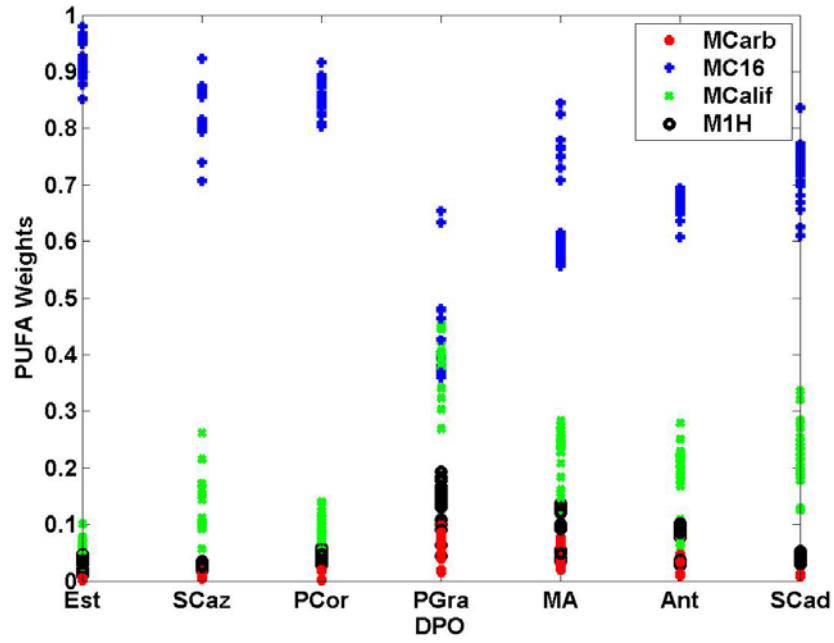


Figura 5.23. Comparación, mediante validación cruzada, de los pesos correspondientes a las distintas observaciones obtenidas en cada zona de RMN, en cada DOP, para ácidos grasos PUFA.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Métodos espectroscópicos en química orgánica*; 2ª Edición ;Síntesis: Madrid, 1999.
2. Mannina, L.; Luchinat, C.; Patumi, M.; Emanuele, M. C.; Rossi, E.; Segre, A. Concentration dependence of ¹³C NMR spectra of triglycerides: Implications for the NMR analysis of olive oils. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2000**, *38* (10), 886-890.
3. Guillén, M. D.; Ruiz, A. Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2003**, *105* (11), 688-696.
4. Sacchi, R.; Addeo, F.; Paolillo, L. ¹H and ¹³C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1997**, *35*, S133-S145.
5. Vlahov, G. Application of NMR to the study of olive oils. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1999**, *35* (4), 341-357.
6. Miyake, Y.; Yokomizo, K.; Matsuzaki, N. Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **1998**, *75* (9), 1091-1094.
7. Scrimgeour, C. M. Measurement and applications of stable isotopes in fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2002**, *104* (1), 57-59.
8. Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Rivera Del Álamo, R. M.; Salvador, M. D.; Fregapane, G. Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chemistry* **2004**, *86* (4), 485-492.
9. Mannina, L.; Segre, A. High resolution nuclear magnetic resonance: From chemical structure to food authenticity. *Grasas y Aceites* **2002**, *53* (1), 22-33.
10. Rallo, L.; Barranco, D.; Caballero, J. M.; Del Río, C.; Martín, A.; Tous, J.; Trujillo, I. *Las variedades de olivo cultivadas en España*. Mundi-Prensa: Madrid, 2005; p 360.

ANEXO 4.1. RESULTADOS DE RMN

1. RESULTADOS ¹H RMN

Tabla 5.6. Contenido de ácidos grasos calculados por RMN de ¹H para muestras de la serie G1, procedentes del banco de Germoplasma de Córdoba, en la campaña 2004-2005.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinsat /poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
G1	1	0,7	4,3	80,4	14,7	5,8	16,2	14,7	80,4	5,0
G1	2	0,6	6,6	76,8	16,0	5,3	10,6	16,0	76,8	7,2
G1	3	0,6	7,1	76,8	15,6	5,4	10,0	15,6	76,8	7,7
G1	4	0,7	10,9	71,8	16,6	5,0	6,2	16,6	71,8	11,6
G1	5	0,6	11,8	70,0	17,6	4,7	5,7	17,6	70,0	12,4
G1	6	0,6	11,5	69,3	18,5	4,4	5,7	18,5	69,3	12,1
G1	9	0,8	12,7	66,5	20,0	4,0	4,9	20,0	66,5	13,5
G1	10	0,7	6,6	77,7	15,0	5,7	10,6	15,0	77,7	7,3
G1	11	0,7	6,9	77,4	14,9	5,7	10,1	14,9	77,4	7,7
G1	12	0,8	8,9	74,6	15,7	5,4	7,7	15,7	74,6	9,7
G1	14	0,7	7,4	76,5	15,4	5,5	9,4	15,4	76,5	8,1
G1	15	0,8	8,4	74,4	16,4	5,1	8,1	16,4	74,4	9,2
G1	16	0,8	16,9	66,3	16,0	5,3	3,8	16,0	66,3	17,7
G1	17	0,7	20,1	62,7	16,5	5,1	3,0	16,5	62,7	20,8
G1	18	0,8	20,3	62,1	16,8	4,9	2,9	16,8	62,1	21,1
G1	19	0,8	15,6	68,1	15,6	5,4	4,2	15,6	68,1	16,4
G1	20	0,7	18,0	65,0	16,3	5,1	3,5	16,3	65,0	18,7
G1	21	0,7	20,2	61,7	17,4	4,7	3,0	17,4	61,7	20,9
G1	22	0,6	6,3	78,9	14,3	6,0	11,5	14,3	78,9	6,9
G1	23	0,3	8,9	76,2	14,6	5,8	8,3	14,6	76,2	9,1
G1	24	0,6	8,5	76,5	14,4	5,9	8,4	14,4	76,5	9,1
G1	25	0,6	10,3	72,7	16,4	5,1	6,7	16,4	72,7	10,9
G1	26	0,5	11,6	70,9	17,0	4,9	5,9	17,0	70,9	12,1
G1	27	0,6	11,2	70,9	17,3	4,8	6,0	17,3	70,9	11,8
G1	28	0,8	10,0	72,7	16,6	5,0	6,7	16,6	72,7	10,8
G1	29	0,7	10,6	71,9	16,9	4,9	6,4	16,9	71,9	11,3
G1	30	0,7	12,6	68,7	18,1	4,5	5,2	18,1	68,7	13,2
G1	31	0,6	7,0	78,3	14,2	6,0	10,4	14,2	78,3	7,5
G1	32	0,7	8,1	76,5	14,7	5,8	8,7	14,7	76,5	8,8
G1	33	0,8	9,4	74,3	15,5	5,5	7,3	15,5	74,3	10,2
G1	35	0,8	7,0	77,9	14,3	6,0	10,0	14,3	77,9	7,8

Capítulo 5

G1	36	0,7	8,7	75,2	15,4	5,5	8,0	15,4	75,2	9,4
G1	37	0,9	17,8	65,0	16,3	5,1	3,5	16,3	65,0	18,7
G1	38	0,9	18,2	64,2	16,7	5,0	3,4	16,7	64,2	19,1
G1	39	0,9	21,1	59,9	18,1	4,5	2,7	18,1	59,9	22,0
G1	40	0,8	12,6	69,5	17,2	4,8	5,2	17,2	69,5	13,4
G1	41	0,9	22,3	58,9	18,0	4,6	2,5	18,0	58,9	23,2
G1	42	0,9	18,3	64,1	16,7	5,0	3,3	16,7	64,1	19,2
G1	44	0,8	6,8	78,1	14,4	6,0	10,3	14,4	78,1	7,6
G1	45	0,8	7,8	77,2	14,2	6,1	9,0	14,2	77,2	8,6
G1	46	0,7	10,5	72,6	16,2	5,2	6,5	16,2	72,6	11,2
G1	47	0,7	10,4	72,6	16,4	5,1	6,6	16,4	72,6	11,0
G1	48	0,7	10,9	71,5	16,9	4,9	6,2	16,9	71,5	11,6
G1	49	0,7	11,6	69,8	17,9	4,6	5,7	17,9	69,8	12,3
G1	50	0,7	9,3	75,1	14,9	5,7	7,5	14,9	75,1	10,0
G1	51	0,7	7,5	78,1	13,7	6,3	9,6	13,7	78,1	8,2
G1	52	0,7	11,0	72,7	15,5	5,4	6,2	15,5	72,7	11,8
G1	53	0,9	6,0	79,7	13,4	6,5	11,6	13,4	79,7	6,9
G1	54	0,7	8,1	77,2	14,1	6,1	8,9	14,1	77,2	8,7
G1	55	0,7	9,4	74,5	15,4	5,5	7,4	15,4	74,5	10,1
G1	56	0,9	16,3	66,7	16,1	5,2	3,9	16,1	66,7	17,2
G1	57	0,9	17,7	64,8	16,6	5,0	3,5	16,6	64,8	18,6
G1	58	0,9	20,6	60,3	18,2	4,5	2,8	18,2	60,3	21,6
G1	59	0,8	16,1	66,9	16,3	5,2	4,0	16,3	66,8	16,9
G1	60	0,9	17,8	64,6	16,8	5,0	3,5	16,8	64,6	18,7
G1	61	0,8	21,2	59,9	18,1	4,5	2,7	18,1	59,9	22,0
G1	62	0,7	2,7	83,3	13,2	6,6	24,2	13,2	83,3	3,4
E1	63	0,8	8,9	79,6	10,7	8,3	8,2	10,7	79,6	9,7
E1	64	0,9	11,4	78,7	9,0	10,1	6,4	9,0	78,7	12,3
E1	65	0,7	11,7	68,7	18,9	4,3	5,6	18,9	68,7	12,4
S1	66	1,1	6,9	73,4	18,6	4,4	9,2	18,6	73,4	8,0
S1	67	0,5	8,5	73,0	18,0	4,6	8,1	18,0	73,0	9,0
S1	68	0,5	10,2	71,3	18,0	4,6	6,7	18,0	71,4	10,6
S1	69	0,7	11,1	70,0	18,2	4,5	5,9	18,2	70,0	11,8
S1	70	0,6	12,2	69,3	17,8	4,6	5,4	17,8	69,3	12,9
S1	71	0,7	11,3	70,2	17,9	4,6	5,9	17,9	70,2	11,9
G1	72	0,6	10,8	73,6	15,0	5,7	6,5	15,0	73,6	11,4
G1	73	67,3	58,4	74,0	17,1	4,9	8,3	17,1	74,0	8,9
G1	74	0,7	20,1	64,3	15,0	5,7	3,1	15,0	64,3	20,8
G1	75	0,9	14,0	69,6	15,6	5,4	4,7	15,6	69,6	14,8
V1	76	1,0	9,0	81,0	9,1	10,1	8,1	9,1	81,0	10,0
V1	77	0,8	53,0	32,5	13,7	6,3	0,6	13,7	32,5	53,8

V1	78	1,3	40,1	45,7	12,8	6,8	1,1	12,8	45,7	41,5
V1	79	0,1	56,2	31,2	12,5	7,0	0,6	11,5	32,2	56,3
G1	80	0,8	11,8	69,9	17,5	4,7	5,6	17,5	69,9	12,5

Tabla 5.7. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie H2, campaña 2005-2006.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinst/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
H2	1	1,0	4,0	79,4	15,7	5,4	15,9	15,7	79,4	5,0
H2	2	0,5	3,2	83,1	13,3	6,5	22,8	13,3	83,1	3,7
H2	3	0,6	9,7	75,3	14,4	5,9	7,3	14,4	75,3	10,3
H2	4	0,8	3,3	82,9	13,0	6,7	20,0	13,0	82,9	4,1
H2	5	0,9	6,5	78,4	14,2	6,0	10,6	14,2	78,4	7,4
H2	6	0,7	7,1	78,0	14,2	6,0	9,9	14,2	78,0	7,8
H2	7	0,5	3,3	81,9	14,3	6,0	21,6	14,3	81,9	3,8
H2	8	0,9	2,7	82,9	13,5	6,4	23,3	13,5	82,9	3,6
H2	9	0,8	3,5	81,4	14,3	6,0	18,9	14,3	81,4	4,3
H2	10	0,9	2,3	80,9	16,0	5,3	25,7	16,0	80,9	3,2
H2	11	0,7	3,1	82,3	13,9	6,2	21,8	13,9	82,3	3,8
H2	12	0,7	7,9	77,8	13,6	6,4	9,1	13,6	77,8	8,6
H2	13	0,8	6,5	79,7	13,1	6,7	11,1	13,1	79,7	7,3
H2	14	0,7	2,9	82,6	13,8	6,2	22,9	13,8	82,6	3,6
H2	15	0,6	6,5	79,1	13,8	6,2	11,1	13,8	79,1	7,1
H2	16	0,7	3,6	81,3	14,4	5,9	18,9	14,4	81,3	4,3
H2	17	0,8	2,7	82,8	13,7	6,3	23,9	13,7	82,8	3,5
H2	18	0,9	7,3	78,5	13,3	6,5	9,6	13,3	78,5	8,2
H2	19	0,8	5,1	80,6	13,6	6,4	13,8	13,6	80,6	5,9
H2	20	0,8	3,9	83,1	12,2	7,2	17,6	12,2	83,1	4,7
H2	21	0,8	3,9	80,7	14,7	5,8	17,4	14,7	80,7	4,7
H2	22	0,8	4,2	82,6	12,4	7,1	16,5	12,4	82,6	5,0
H2	23	0,8	4,5	81,4	13,4	6,5	15,4	13,4	81,4	5,3
H2	24	0,7	4,5	83,0	11,8	7,5	15,9	11,8	83,0	5,2
H2	25	0,9	4,1	82,9	12,1	7,3	16,6	12,1	82,9	5,0
H2	26	0,9	3,8	80,6	14,8	5,8	17,2	14,8	80,6	4,7
H2	27	1,0	4,0	83,4	11,7	7,6	16,9	11,7	83,4	5,0
H2	28	0,9	4,2	83,3	11,6	7,6	16,3	11,6	83,3	5,1
H2	29	0,9	5,0	82,5	11,5	7,7	13,9	11,5	82,5	5,9
H2	30	0,6	5,9	82,7	10,9	8,2	12,8	10,9	82,7	6,5
H2	31	0,7	5,3	81,6	12,4	7,0	13,6	12,4	81,6	6,0
H2	32	0,7	3,7	84,5	11,2	8,0	19,2	11,2	84,5	4,4
H2	33	0,6	4,7	83,0	11,7	7,5	15,6	11,7	83,0	5,3
H2	34	0,7	4,8	83,5	11,0	8,1	15,2	11,0	83,5	5,5

H2	35	0,6	6,9	82,0	10,5	8,5	10,9	10,5	82,1	7,5
H2	36	0,4	6,0	82,4	11,2	7,9	12,9	11,2	82,4	6,4
H2	37	0,6	4,9	82,9	11,6	7,6	15,2	11,6	82,9	5,5
H2	38	0,4	6,2	82,7	10,6	8,4	12,5	10,6	82,7	6,6
H2	39	0,4	6,1	82,7	10,8	8,2	12,8	10,8	82,7	6,5
H2	40	0,5	6,6	82,4	10,6	8,5	11,7	10,6	82,4	7,1
H2	41	0,7	5,5	83,5	10,3	8,7	13,5	10,3	83,5	6,2
H2	42	0,5	3,3	79,8	16,4	5,1	21,0	16,4	79,8	3,8

Tabla 5.8. Contenido de ácidos grasos calculados por RMN de ^1H para muestras de la serie A2 'Picual'.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinsat/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
A2	48	0,9	8,7	76,2	14,2	6,0	7,9	14,2	76,2	9,6
A2	43	1,0	1,0	85,5	12,5	7,0	42,8	12,5	85,5	2,0
A2	46	0,7	2,1	84,2	13,0	6,7	30,1	13,0	84,2	2,8
A2	45	0,9	2,0	84,0	13,0	6,7	29,0	13,0	84,0	2,9
A2	44	1,1	1,3	84,6	13,0	6,7	35,3	13,0	84,6	2,4
A2	47	0,7	2,7	83,9	12,7	6,9	24,7	12,7	83,9	3,4

Tabla 5.9. Contenido de ácidos grasos calculados por RMN de ^1H para muestras de la serie G2, procedentes del banco de Germoplasma de Córdoba, y B2 en la campaña 2005-2006.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinsat/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
G2	49	0,8	1,7	84,3	13,2	6,6	33,7	13,2	84,3	2,5
G2	50	0,5	5,4	77,0	17,2	4,8	13,1	17,2	77,0	5,9
G2	51	0,4	6,0	77,0	16,6	5,0	12,0	16,6	77,0	6,4
G2	52	0,4	9,7	72,0	17,9	4,6	7,2	17,9	72,0	10,1
G2	53	0,5	11,1	69,0	19,4	4,2	5,9	16,9	73,6	9,5
G2	54	0,5	8,2	74,6	16,7	5,0	8,6	16,7	74,6	8,7
G2	55	0,9	7,6	76,1	15,4	5,5	9,0	15,4	76,2	8,4
G2	56	0,8	7,8	77,3	14,1	6,1	9,0	14,1	77,3	8,6
G2	57	0,8	4,4	81,1	13,8	6,3	15,9	13,8	81,1	5,1
G2	58	0,8	8,5	74,6	16,0	5,2	8,0	16,0	74,6	9,3
G2	59	0,7	4,6	79,3	15,4	5,5	15,1	15,4	79,3	5,3
G2	60	0,8	6,5	78,8	13,9	6,2	10,8	13,9	78,9	7,2
B2	*61	1,2	24,4	56,2	18,3	4,5	2,2	18,3	56,2	25,6
G2	63	1,0	1,0	84,0	13,5	6,4	43,3	13,6	84,5	1,9

*Aceite ecológico

Tabla 5.10. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ¹H, para muestras de la serie H3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinsat/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
H3	1	0,5	5,2	80,1	14,0	6,1	14,2	14,0	80,3	5,7
H3	2	0,5	3,4	82,4	13,5	6,4	21,2	13,5	82,6	3,9
H3	3	0,6	7,4	78,1	13,7	6,3	9,8	13,8	78,3	8,0
H3	4	0,5	3,5	83,0	12,8	6,8	20,7	12,8	83,2	4,0
H3	5	0,5	5,9	79,4	13,9	6,2	12,4	14,0	79,6	6,4
H3	6	0,4	7,5	77,7	14,1	6,1	9,8	14,2	77,9	8,0
H3	7	0,6	3,8	81,5	13,9	6,2	18,8	14,0	81,7	4,3
H3	8	0,5	3,4	82,3	13,6	6,3	21,3	13,7	82,5	3,9
H3	9	0,4	3,7	82,5	13,2	6,6	20,2	13,2	82,7	4,1
H3	10	0,5	3,3	86,0	14,0	6,1	21,7	13,5	82,9	3,6
H3	11	0,5	3,1	82,4	13,9	6,2	23,3	13,9	82,6	3,5
H3	12	0,7	7,9	81,1	9,9	9,1	9,4	9,9	81,5	8,6
H3	13	0,7	4,4	82,0	12,6	6,9	16,1	12,6	82,3	5,1
H3	14	0,6	2,8	82,8	13,5	6,4	24,3	13,5	83,1	3,4
H3	15	0,6	5,4	79,8	13,9	6,2	13,3	14,0	80,0	6,0
H3	16	0,6	3,4	81,1	14,5	5,9	20,1	14,6	81,4	4,1
H3	17	0,5	2,9	82,9	13,5	6,4	24,5	13,6	83,1	3,4
H3	18	0,6	7,2	78,9	13,0	6,7	10,1	13,1	79,1	7,8
H3	19	0,6	5,9	82,4	10,7	8,3	12,6	10,8	82,7	6,6
H3	20	0,5	6,8	81,6	10,9	8,2	11,3	10,9	81,8	7,3
H3	21	0,6	3,6	81,7	13,8	6,2	13,7	13,9	82,0	4,2
H3	22	0,6	5,7	82,2	11,2	7,9	13,0	11,3	82,4	6,3
H3	23	0,6	6,6	81,5	11,0	8,1	11,3	11,0	81,8	7,2
H3	24	0,6	5,8	80,2	13,2	6,6	12,6	13,2	80,4	6,4
H3	25	0,5	5,2	81,5	12,6	6,9	14,3	12,7	81,7	5,7
H3	26	0,6	5,8	81,0	12,3	7,1	12,8	12,4	81,3	6,4
H3	27	0,6	6,8	81,0	11,2	7,9	10,8	11,3	81,2	7,5
H3	28	0,5	6,1	81,6	11,6	7,6	12,4	11,6	81,8	6,6
H3	29	0,6	7,3	80,2	11,6	7,6	10,2	11,6	80,5	7,9
H3	30	0,6	5,9	83,2	10,1	8,9	12,8	10,1	83,4	6,5
H3	31	0,5	6,2	80,2	12,9	6,7	12,1	13,0	80,4	6,6
H3	32	0,6	5,5	82,0	11,6	7,6	13,5	11,6	82,3	6,1
H3	33	0,6	6,5	82,5	10,1	8,8	11,6	10,2	82,7	7,1
H3	34	0,7	6,2	81,5	11,3	7,3	11,9	11,3	81,8	6,9
H3	35	0,6	6,4	81,8	11,0	8,1	11,7	11,0	82,0	7,0
H3	36	0,6	6,6	79,7	12,8	6,8	11,1	12,9	79,9	7,2

H3	37	0,7	5,9	82,3	10,8	8,3	12,5	10,8	82,6	6,6
H3	38	0,6	6,0	83,2	9,9	9,1	12,6	9,9	83,5	6,6
H3	39	0,7	6,8	82,2	10,0	9,0	11,0	10,0	82,5	7,5
H3	40	0,6	6,3	81,5	11,3	7,8	11,9	11,3	81,8	6,9
H3	41	0,7	6,5	81,6	10,9	8,2	11,4	10,9	81,9	7,2
H3	42	0,4	3,4	82,8	13,1	6,6	21,7	13,2	83,0	3,8
H3	43	0,6	6,5	81,0	11,6	7,6	11,5	11,6	81,3	7,1
H3	44	0,6	6,7	81,1	11,3	7,8	11,1	11,3	81,4	7,3
H3	45	0,5	4,7	82,0	12,5	7,0	15,6	12,5	82,2	5,3
H3	46	0,7	9,9	72,5	16,6	5,0	6,8	16,6	72,7	10,7

Tabla 5.11. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie A3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinsat/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
A3	48	0,6	4,9	78,3	15,9	5,3	14,2	15,9	78,5	5,5
A3	50	0,5	4,4	79,6	15,4	5,5	16,5	15,4	79,8	4,8
A3	51	0,5	6,2	76,2	16,7	4,9	11,3	16,8	76,5	6,8
A3	52	0,6	4,2	81,1	13,8	6,2	17,0	13,8	81,4	4,8
A3	53	0,6	8,2	73,0	17,9	4,6	8,2	17,9	73,2	8,9
A3	47	0,5	2,6	83,8	12,9	6,7	27,5	12,9	84,0	3,1

Tabla 5.12. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie G3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinsat/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
GT3	56	0,5	8,8	74,4	16,1	5,2	8,0	16,2	74,6	9,3
GT3-S	57	0,7	8,0	78,4	12,5	7,0	9,0	12,6	78,6	8,8
GT3-R	58	0,8	8,7	77,6	12,6	6,9	8,2	12,6	77,9	9,5
GT3-S	59	0,6	4,2	80,5	14,4	5,9	16,8	14,5	80,8	4,8
GT3-R	60	0,5	2,8	82,8	13,7	6,3	25,3	13,8	83,0	3,3
G3	61	0,7	9,7	70,6	18,6	4,4	6,8	18,7	70,9	10,5
G3	62	0,8	2,2	83,6	12,9	6,7	27,3	13,0	83,9	3,1

S= Secano; R= Regadío

Tabla 5.13. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie H4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinst/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
H4	1	0,3	4,7	79,6	15,4	5,5	16,1	15,4	79,7	5,0
H4	3	0,5	7,1	78,8	13,4	6,5	10,4	13,4	79,0	7,6
H4	5	0,6	4,6	81,5	13,0	6,7	15,6	13,0	81,7	5,2
H4	10	0,4	4,1	81,0	14,4	5,9	18,3	14,4	81,1	4,4
H4	12	0,9	8,1	78,2	12,4	7,1	8,7	12,4	78,5	9,1
H4	13	0,4	6,0	80,2	13,3	6,2	12,7	13,3	80,4	6,3
H4	14	0,3	3,0	82,8	13,8	6,2	25,2	13,8	82,9	3,3
H4	15	0,4	4,1	82,6	12,6	6,9	18,1	12,7	82,8	4,6
H4	19	0,3	5,8	83,0	10,9	8,2	13,7	10,9	83,1	6,0
H4	21	0,3	4,8	81,0	13,9	6,2	16,0	13,9	81,1	5,1
H4	22	0,2	7,8	82,4	9,5	9,5	10,3	9,5	82,4	8,0
H4	23	0,6	5,7	83,6	9,8	9,2	13,3	9,8	83,9	6,3
H4	24	0,5	6,3	83,3	9,7	9,3	12,4	9,7	83,5	6,8
H4	25	0,2	6,4	82,9	10,3	8,7	12,4	10,3	83,0	6,7
H4	26	0,1	6,4	83,2	10,2	8,8	12,8	10,2	83,3	6,5
H4	30	0,4	5,6	84,3	9,5	9,6	14,0	9,5	84,5	6,0
H4	31	0,4	4,6	83,0	11,7	7,5	16,4	7,6	8,7	78,1
H4	32	0,4	3,0	85,3	11,2	7,9	25,6	11,2	85,4	3,3
H4	36	0,2	5,8	79,3	14,5	5,9	13,0	14,5	79,4	6,1
H4	42	0,3	6,8	80,9	11,9	7,4	11,5	11,9	81,0	7,0
H4	44	0,2	6,4	81,3	12,1	7,3	12,4	12,1	81,4	6,6

Tabla 5.14. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie G4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinst/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
G4	1	0,5	8,1	72,7	18,4	4,4	8,4	18,4	72,9	8,7
G4	2	0,7	4,7	78,1	16,2	5,2	14,4	16,2	78,4	5,4
G4	3	0,6	11,9	68,9	18,3	4,4	5,5	18,4	69,2	12,5
G4	4	0,4	10,0	70,5	18,9	4,3	6,7	18,9	70,6	10,5
G4	5	1,0	10,3	72,3	15,9	5,3	6,4	16,0	72,7	11,4
G4	6	0,9	13,4	65,0	20,4	2,9	4,6	20,5	65,2	14,3
G4	7	0,6	5,1	79,1	14,8	5,7	13,8	14,9	79,4	5,8
G4	8	0,5	7,6	74,7	16,9	4,9	9,2	16,9	75,0	8,1
GT4-S	9	0,9	6,9	83,1	8,7	10,5	10,7	8,7	83,5	7,8
GT4-R	10	0,8	10,9	72,9	15,0	5,7	6,2	15,0	73,2	11,8
GT4-R	11	0,7	3,2	82,1	13,6	6,3	20,9	13,7	82,4	3,9

GT4-S	12	0,7	9,9	71,6	17,5	4,7	6,8	17,5	71,8	10,7
GT4-S	13	0,6	3,8	80,8	14,4	5,9	18,1	14,4	81,1	4,5

Tabla 5.15. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ¹H, para muestras de la serie DO4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinst/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
DO4	1	0,8	8,3	74,1	16,5	5,0	8,2	16,6	74,3	9,1
DO4	2	0,9	6,9	77,6	14,1	6,1	9,9	14,2	78,0	7,9
DO4	3	0,8	7,0	76,5	15,2	5,6	9,8	15,3	76,9	7,9
DO4	4	0,8	11,2	68,8	18,7	4,3	5,7	18,8	69,1	12,1
DO4	14	0,9	4,7	83,4	10,6	8,4	15,0	10,7	83,8	5,6
DO4	15	0,8	3,1	81,2	14,6	5,8	21,1	14,6	81,5	3,9
DO4	16	0,8	5,0	82,2	11,7	7,5	14,3	11,7	82,5	5,8
DO4	17	0,8	8,7	76,1	14,1	6,1	8,0	14,1	76,4	9,5
DO4	18	0,8	5,9	79,8	13,1	6,6	11,9	13,2	80,1	6,7
DO4	19	0,9	10,7	74,9	13,0	6,6	6,4	13,1	75,2	11,7
DO4	20	0,9	9,8	75,1	13,8	6,2	7,1	13,9	75,5	10,7
DO4	21	0,6	5,5	79,8	13,7	6,3	13,0	13,8	80,1	6,1
DO4	22	0,9	8,9	75,5	14,3	6,0	7,7	14,3	75,9	9,8
DO4	23	0,9	8,7	77,1	12,9	6,7	8,1	13,0	77,5	9,6
DO4	24	0,8	3,7	82,9	12,3	7,1	18,8	12,4	83,2	4,4
DO4	25	0,7	5,0	78,2	15,7	5,3	13,6	15,8	78,5	5,7
DO4	26	0,5	5,5	78,4	15,3	5,5	13,0	15,3	78,6	6,0

Tabla 5.16. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ¹H, para muestras de la serie H5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinst/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
H5	1	0,5	4,9	81,3	13,0	6,7	15,0	13,1	81,5	5,4
H5	3	0,3	5,7	80,3	13,6	6,4	13,4	13,6	80,4	6,0
H5	5	0,4	4,5	82,5	12,4	7,0	17,0	12,4	82,7	4,9
H5	10	0,4	2,6	83,2	13,6	6,3	27,8	13,6	83,4	3,0
H5	12	0,4	5,9	83,2	10,3	8,7	13,2	10,3	83,4	6,3
H5	13	0,2	4,5	82,5	12,7	6,9	17,3	12,7	82,6	4,8
H5	14	0,3	2,2	83,5	13,8	6,2	33,1	13,8	83,7	2,5
H5	15	0,4	3,3	83,5	12,6	6,9	22,8	12,7	83,7	3,7
H5	19	0,5	4,5	83,2	11,6	7,6	16,6	11,6	83,4	5,0
H5	21	0,4	2,4	83,3	13,8	6,2	30,1	13,8	83,4	2,8
H5	22	0,4	2,9	83,5	13,1	6,6	25,9	13,2	83,6	3,2

H5	23	0,3	4,7	82,6	12,3	7,1	16,7	12,3	82,7	5,0
H5	24	0,2	3,7	83,4	12,5	7,0	21,1	12,5	83,5	3,9
H5	25	0,2	4,8	82,7	12,2	7,2	16,7	12,2	82,8	4,9
H5	26	0,3	4,4	83,7	11,4	7,7	17,6	11,4	83,8	4,8
H5	30	0,6	3,6	85,5	10,0	9,0	20,4	10,0	85,8	4,2
H5	31	0,4	4,2	81,6	13,7	6,3	17,9	13,7	81,7	4,8
H5	32	0,3	2,6	85,4	11,6	7,6	29,5	11,6	85,5	2,9
H5	36	0,4	4,7	82,5	12,1	7,2	15,9	12,1	82,7	5,2
H5	42	0,6	5,1	80,5	13,6	6,4	14,3	13,6	80,8	5,6
H5	44	0,7	6,2	80,9	11,8	7,5	11,7	11,8	81,2	7,0

Tabla 5.17. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie G5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinsat/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
G5	2	0,4	2,4	82,5	14,6	5,9	30,0	14,6	82,6	2,8
G5	3	0,5	11,9	68,4	18,9	4,3	5,5	19,0	68,6	12,4
G5	5	1,0	12,5	69,0	17,0	4,8	5,1	17,1	69,3	13,6
G5	6	0,4	13,9	65,3	20,2	3,9	4,6	20,2	65,4	14,3
G5	8	0,7	7,0	75,3	16,6	5,0	9,7	16,6	75,6	7,8

Tabla 5.18. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie DO5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinsat/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
DO5	1	0,4	7,5	76,3	15,8	5,3	10,0	15,8	76,3	7,9
DO5	2	0,4	4,7	81,0	13,8	6,2	16,0	13,8	81,1	5,1
DO5	3	0,5	7,1	78,8	13,4	6,5	10,4	13,4	79,0	7,6
DO5	4	0,5	9,0	71,7	18,5	4,4	7,5	18,6	71,9	9,5
DO5	14	0,7	2,0	86,7	10,3	8,7	32,8	10,4	87,0	2,6
DO5	15	0,7	1,7	85,9	11,4	7,8	36,6	11,4	86,2	2,3
DO5	16	0,5	3,6	84,3	11,4	7,8	20,7	11,4	84,5	4,1
DO5	17	0,4	7,9	77,9	13,6	6,3	9,4	13,6	78,0	8,3
DO5	18	0,7	5,4	80,7	12,9	6,7	13,3	13,0	80,9	6,1
DO5	19	0,7	9,0	77,5	12,4	7,0	8,0	12,5	77,8	9,7
DO5	20	1,0	7,4	79,6	11,6	7,6	9,5	11,6	80,0	8,4
DO5	21	0,7	2,2	85,0	11,8	7,5	29,4	11,8	85,3	2,9
DO5	23	1,0	6,7	82,2	9,6	9,4	10,7	9,7	82,6	7,7
DO5	24	0,5	3,0	84,0	12,2	7,2	24,1	12,3	84,2	3,5
DO5	27	0,3	4,0	82,8	12,8	6,8	19,3	12,8	82,9	4,3

DO5	28	0,7	3,2	83,8	12,1	7,3	21,7	12,1	84,0	3,9
DO5	29	0,1	4,7	83,0	12,2	7,2	17,4	12,2	83,0	4,8
DO5	30	0,8	5,1	81,3	12,4	7,0	13,6	12,4	81,6	5,9
DO5	31	0,5	3,8	83,0	12,5	7,0	19,3	12,5	83,2	4,3
DO5	32	0,7	2,4	84,7	11,9	7,4	27,0	11,9	85,0	3,1

Tabla 5.19. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie H6, campaña 2009-2010.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinst/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
H6	1	1,8	3,2	80,0	14,2	6,0	16,0	14,4	80,2	5,4
H6	3	0,9	8,7	75,2	14,8	5,7	7,8	14,6	82,0	3,5
H6	10	0,9	4,5	79,8	14,4	5,9	14,9	14,2	79,8	6,0
H6	14	0,9	2,5	81,6	14,5	5,9	23,7	13,6	84,2	2,2
H6	15	0,4	5,6	79,7	14,1	6,1	13,3	15,0	80,4	4,6
H6	19	0,2	2,0	84,1	13,6	6,3	37,9	13,2	81,0	5,8
H6	21	0,9	3,8	80,0	14,9	5,7	17,3	12,5	80,5	7,0
H6	22	0,8	5,0	80,7	13,1	6,6	14,0	13,2	80,7	6,1
H6	23	0,8	6,2	80,2	12,5	7,0	11,5	12,6	81,4	6,0
H6	24	0,7	5,4	80,4	13,2	6,6	13,2	11,7	81,6	6,7
H6	25	0,9	5,1	81,0	12,5	6,9	13,5	14,4	80,2	5,4
H6	26	0,8	5,9	81,2	11,7	7,5	12,1	14,6	82,0	3,5

Tabla 5.20. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie DO6, campaña 2009-2010.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinst/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
DO6	1	0,7	4,8	80,9	13,2	6,5	14,7	13,3	81,2	5,5
DO6	2	0,7	7,0	78,6	13,4	6,4	10,2	13,5	78,8	7,7
DO6	3	0,7	8,5	75,5	15,0	5,6	8,2	15,1	75,7	9,2
DO6	4	0,7	11,8	67,5	19,6	4,1	5,4	19,7	67,8	12,6
DO6	5	0,9	5,7	79,3	13,6	6,3	11,9	13,6	79,7	6,7
DO6	10	0,8	3,3	81,0	14,5	5,9	19,7	14,5	81,4	4,1
DO6	11	0,7	3,6	81,6	13,8	6,2	18,9	13,8	81,9	4,3
DO6	12	0,9	3,6	79,8	15,2	5,5	17,6	15,3	80,2	4,5
DO6	13	0,2	1,6	85,8	12,3	7,1	48,6	12,3	85,9	1,8
DO6	14	0,6	7,5	81,6	10,0	9,0	10,1	10,0	81,9	8,1
DO6	15	0,4	2,1	83,5	13,7	6,3	32,8	13,8	83,7	2,6
DO6	16	0,5	3,9	83,2	12,1	7,2	18,9	12,1	83,4	4,4
DO6	17	1,0	7,3	77,3	13,9	6,2	9,3	13,9	77,7	8,4
DO6	18	0,4	9,7	73,8	15,9	5,3	7,3	15,9	74,0	10,1

DO6	20	0,6	8,7	75,3	14,9	5,5	7,4	15,0	75,7	9,4
DO6	21	0,8	4,5	80,8	13,6	6,4	15,9	13,6	81,1	5,3
DO6	22	0,7	9,7	75,1	14,2	6,0	7,3	14,3	75,4	10,4
DO6	23	0,9	6,5	78,3	13,9	6,2	10,6	14,0	78,6	7,4
DO6	24	0,8	5,1	80,1	13,7	6,3	13,7	13,7	80,4	5,9
DO6	27	0,6	7,1	77,1	14,9	5,7	10,0	14,9	77,3	7,8
DO6	28	1,3	6,6	77,5	14,0	6,1	9,8	14,1	78,0	7,9
DO6	29	0,9	6,3	77,9	14,4	5,9	10,7	14,5	78,2	7,3
DO6	31	0,9	7,0	78,2	13,5	6,4	9,9	13,5	78,5	8,0
DO6	33	0,6	3,2	82,0	13,9	6,2	21,6	14,0	82,2	3,8
DO6	34	0,7	0,5	85,8	12,6	6,9	71,9	12,7	86,2	1,2
DO6	35	0,6	0,8	85,5	12,9	6,8	63,1	12,9	85,7	1,4
DO6	36	1,1	1,5	83,2	13,6	6,3	32,0	13,7	83,7	2,6
DO6	37	0,5	2,5	83,7	13,2	6,6	28,5	13,2	83,9	2,9
DO6	38	0,8	2,5	82,8	13,4	6,4	24,7	13,5	83,2	3,4

Tabla 5.21. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie H7, campaña 2010-2011.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinsat/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
H7	1	0,3	4,0	86,1	9,5	9,5	20,4	9,5	86,2	4,2
H7	3	0,2	6,6	81,4	11,7	7,6	11,9	11,7	81,5	6,8
H7	10	0,2	2,2	83,7	13,9	6,2	34,9	13,9	83,7	2,4
H7	14	0,2	1,5	85,1	13,1	6,6	48,4	13,1	85,2	1,8
H7	15	0,2	3,4	86,6	9,7	9,3	24,0	9,7	86,7	3,6
H7	19	0,1	3,9	86,0	9,9	9,1	21,4	9,9	86,0	4,0
H7	21	0,1	2,2	83,8	13,8	6,2	36,4	13,8	83,9	2,3
H7	22	0,3	5,1	84,9	9,7	9,3	16,0	9,7	85,0	5,3
H7	23	0,3	5,6	83,7	10,3	8,7	14,2	10,3	83,8	5,9
H7	24	0,4	84,8	84,8	9,8	9,2	16,4	9,8	84,8	5,4
H7	25	0,4	5,0	84,3	10,2	8,8	15,7	10,2	84,4	5,4
H7	26	0,3	4,6	85,1	9,8	9,2	17,1	9,8	85,2	5,0

Tabla 5.22. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^1H , para muestras de la serie DO7, campaña 2010-2011.

Serie	RI	% Ln	% L	% O	% Sat	Insat/sat	Monoinsat/ poliinsat	SAFA	MUFA	PUFA
DO7	1	0,6	7,8	74,7	16,5	5,0	8,9	16,6	75,0	8,4
DO7	2	0,5	5,1	81,9	12,2	7,2	14,4	12,2	82,1	5,7
DO7	3	0,8	6,7	77,7	14,5	5,9	10,4	14,5	78,0	7,5

DO7	4	0,8	8,3	72,8	17,7	4,6	8,0	17,7	73,1	9,2
DO7	14	0,4	3,6	89,8	6,0	15,7	22,3	6,0	90,0	4,0
DO7	15	0,3	0,6	91,6	8,3	11,0	98,0	8,3	90,8	0,9
DO7	16	0,4	3,4	85,4	10,7	8,4	22,8	10,7	85,6	3,7
DO7	17	0,3	6,3	81,6	11,7	7,5	12,4	11,7	81,7	6,6
DO7	18	0,2	2,8	85,8	11,1	8,0	28,3	11,1	85,9	3,0
DO7	20	1,4	4,0	87,3	6,6	14,1	16,3	6,6	87,9	5,4
DO7	21	0,1	2,3	89,6	8,0	11,6	37,8	8,0	89,7	2,4
DO7	22	0,2	7,4	79,0	13,3	6,5	10,3	13,3	79,1	7,7
DO7	23	0,3	7,4	78,7	13,5	6,4	10,2	13,5	78,8	7,7
DO7	24	0,0	2,3	87,9	9,8	9,2	38,7	9,8	87,9	2,3
DO7	25	0,4	4,9	85,5	9,0	10,1	16,1	9,0	85,7	5,3
DO7	26	0,3	4,9	85,4	9,3	9,8	16,4	9,3	85,5	5,2
DO7	27	0,1	3,5	87,3	9,0	10,1	24,0	9,0	87,4	3,6
DO7	29	0,5	3,7	81,6	13,9	6,2	19,2	13,9	81,9	4,3
DO7	31	0,8	4,9	80,1	13,8	6,2	14,1	13,8	80,4	5,7

2. RESULTADOS ¹³C RMN

Tabla 5.23. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ¹³C, en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie G1, campaña 2004-2005.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	SAFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
G1	1	16	69,4	14,7	20,9	72,8	6,3	18,3	75	6,7
G1	2	17,9	72,3	9,8	19,7	72	8,2	17,3	75,5	7,2
G1	3	16,6	68	15,5	19,7	72	8,3	15,6	76,8	7,6
G1	4	17,8	65,2	17	18,7	68,7	12,6	16,6	71,7	11,7
G1	5	17,9	64,3	17,8	19,4	67,7	12,9	16,3	71,1	12,6
G1	6	18,5	65,6	15,9	19,4	67,9	12,7	17,6	70,4	12
G1	9	20	63,3	16,7	21	64,4	14,6	18,7	66,9	14,4
G1	10	15,2	71,9	12,9	17,7	74,3	8	14,4	78,1	7,5
G1	11	15,1	70,7	14,1	17,7	74	8,3	12,8	79,8	7,4
G1	12	16,1	67,7	16,3	18,1	71,4	10,6	13,8	76,4	9,8
G1	14	16	67,1	16,9	22,8	69,5	7,8	14,5	78,1	7,4
G1	15	14,9	65,9	19,2	18,3	72,7	9	14	76,6	9,4
G1	16	16,2	56,5	27,4	21,6	61	17,5	19,3	63	17,7
G1	17	16,5	52,3	31,2	21,7	57,6	20,8	18,6	60	21,4
G1	18	17,3	54,5	28,3	20,9	58	21,1	19	59,2	21,8
G1	19	18,5	61,5	20,1	18,8	64,7	16,4	15,1	68,4	16,5

Resonancia Magnética Nuclear (RMN) aplicada al estudio de aceites de oliva.

G1	20	18,6	58,9	22,5	20,7	60,6	18,7	16,7	64,1	19,2
G1	21	16,9	52,2	30,9	21,6	57,7	20,7	19,9	59,1	21
G1	22	17,3	68,5	14,2	19,6	72,7	7,7	15,8	77	7,2
G1	23	16,7	66	17,3	18,7	72,2	9,1	15,2	76,3	8,5
G1	24	18,3	71,3	10,4	17,1	73	9,9	13,6	77	9,4
G1	25	19,4	71,9	8,7	19	71,6	9,4	15,3	73,5	11,2
G1	26	20,6	55,8	23,7	20,9	55,1	24	14,9	71,1	14
G1	27	17,5	67,9	14,6	18,8	68,5	12,7	16,7	70,4	12,9
G1	28	17,3	68,8	13,9	18,8	70,4	10,8	16,1	71,9	12
G1	29	19,4	71,9	8,7	20,4	69,9	9,7	19,1	70,4	10,5
G1	30	14,7	66,8	18,5	16,3	73,6	10,1	15,9	69,3	14,8
G1	31	14,8	71,2	14	16,1	76,2	7,6	12,1	79,7	8,2
G1	32	14,8	66,4	18,8	16,3	74,7	9	14	76,5	9,5
G1	33	15,7	64,9	19,4	18,1	71,2	10,8	14,5	73,8	11,7
G1	35	14,8	69,2	16	17,1	74,8	8,1	14,2	77,4	8,4
G1	36	15,1	67,5	17,4	15,3	74,5	10,2	14	75,7	10,3
G1	37	18,6	58,9	22,5	19,5	61,7	18,8	16,3	63,2	20,5
G1	38	19,2	59,3	21,5	20,4	61	18,7	14,8	63,3	21,9
G1	39	20,2	54,3	25,6	20,3	56,6	23,2	15,3	59,9	24,8
G1	40	18	64	18	19,5	66,7	13,8	16,2	68,2	15,6
G1	41	16,4	66,3	17,4	18,3	69	12,7	16	58	26
G1	42	19,3	58,8	21,9	20,3	60,2	19,5	17,6	61,3	21,1
G1	44	16,1	68	15,9	18,3	73,3	8,4	16	74,3	9,7
G1	45	17	72,3	10,7	18,7	71,8	9,5	14,9	74,3	10,8
G1	46	18,7	70,1	11,2	19,3	69,5	11,2	16,4	71,2	12,4
G1	47	17,3	67,8	14,9	17,8	70,6	11,6	15,3	72,8	11,9
G1	48	17,8	68,5	13,7	18,8	69,9	11,4	14,1	73,1	12,8
G1	49	16,9	63,1	20,1	19,1	67,7	13,3	15,3	71,8	12,9
G1	50	14,8	71,2	14	16,1	76,2	7,6	13,1	78,8	8,1
G1	51	19,2	68,5	12,3	19,7	67,2	13,1	11,4	78,1	10,5
G1	52	19,5	56,7	23,8	20,1	56,9	23,1	13,8	73,8	12,4
G1	53	13,4	68,9	17,6	15,7	77	7,4	14,3	78	7,7
G1	54	13,7	66,2	20,1	17,4	74,3	8,4	13,5	77,2	9,3
G1	55	15,2	66,5	18,3	17,3	72,6	10	15,3	73,9	10,8
G1	56	18	62,4	19,6	18,6	63,2	18,2	18,1	63,1	18,8
G1	57	18,6	59,9	21,5	20,1	60	19,9	13,7	63,7	22,6
G1	58	19	56,6	24,5	21,3	57,4	21,3	12,9	63	24,1
G1	59	18,6	61,5	19,9	19,5	62,7	17,8	19,4	61,8	18,8
G1	60	19,3	60,9	19,7	20,1	61,1	18,8	15,7	62,8	21,5
G1	61	18,8	54,7	26,5	20,5	56,6	22,9	16	61,2	22,8
G1	62	15,3	78,7	6	17,3	78,9	3,8	16	80,3	3,7
E1	63	12,6	69,9	17,6	14,7	74,8	10,5	11,8	76,4	11,8
E1	64	12,9	71,2	15,8	14,7	72	13,3	10,1	76	13,9

E1	65	16,8	60,5	22,7	20,4	66,7	12,9	16,8	69,3	13,9
S1	66	18,6	61,6	19,9	22,3	67,6	10,2	19,6	68,9	11,5
S1	67	20,1	64	15,9	22	68,3	9,7	20,6	69	10,4
S1	68	18,5	60,4	21,2	21,2	66,9	11,9	16,8	70,3	12,9
S1	69	18,3	58,7	22,9	21,7	66	12,3	20,5	66,1	13,4
S1	70	19,5	62,8	17,7	21,2	64,5	14,3	18	66,7	15,3
S1	71	19,9	65	15,1	20,8	66,4	12,8	17,5	69	13,5
G1	72	15	65,2	19,8	18,1	70,5	11,4	15,5	71,9	12,6
G1	73	19,4	69,1	11,5	21,3	69,4	9,4	18,6	71,8	9,6
G1	74	15,3	57,9	26,9	17,4	61,1	21,5	14,6	62,2	23,2
G1	75	15,5	63,8	20,7	16,5	66,7	16,8	11,9	72,9	15,2
V1	76	8,8	71,4	19,8	10,8	76,9	12,3	3,7	84,3	12
V1	77	13,5	33,9	52,6	15,1	28,5	56,4	12,4	32,2	55,4
V1	78	12	44	43,9	14,5	43,2	42,3	9,1	46,8	44,1
V1	79	11,6	32,2	56,2	12,3	29,5	58,2	9,7	34,2	56,1
G1	80	16,7	61,7	21,7	19,9	66,8	13,3	15	70,8	14,2

Tabla 5.24. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie H2, campaña 2005-2006.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H2	1	17,1	72,8	10,1	18,2	74,6	7,3	13,6	78,7	7,7
H2	2	15,8	77,2	7,1	16,6	78,7	4,8	13,9	81,4	4,7
H2	3	15,7	67,7	16,6	17,3	71,3	11,5	13,2	74,4	12,4
H2	4	14,2	76,4	9,4	16,6	77,7	5,8	14,4	79,8	5,8
H2	5	15,0	70,9	14,2	18,6	72,6	8,9	14,7	75,7	9,6
H2	6	14,5	70,9	14,6	18,0	73,0	9,0	17,2	75,0	7,8
H2	7	13,8	73,0	13,2	16,1	79,7	4,3	15,0	80,3	4,7
H2	8	14,7	75,4	9,9	16,7	78,8	4,6	16,9	79,0	4,1
H2	9	15,4	72,6	12,0	17,9	76,8	5,3	15,7	79,9	4,4
H2	10	17,2	74,2	8,7	19,5	76,0	4,5	18,1	77,5	4,4
H2	11	15,5	74,3	10,3	17,1	78,6	4,4	13,4	82,0	4,6
H2	12	14,9	72,2	13,0	15,3	74,9	9,8	12,3	78,8	8,9
H2	13	14,3	73,3	12,4	16,0	76,1	7,9	13,7	78,3	8,0
H2	14	14,5	74,8	10,7	16,4	79,1	4,5	13,4	82,1	4,5
H2	15	15,3	73,5	11,2	16,6	75,8	7,6	14,4	78,8	6,8
H2	16	16,0	74,4	9,7	16,2	78,5	5,3	12,1	82,9	5,0
H2	17	15,6	75,4	9,0	15,5	79,9	4,6	12,2	83,1	4,7
H2	18	14,0	74,7	11,3	14,4	75,6	10,1	11,5	78,1	10,4

H2	19	14,5	74,3	11,2	17,0	76,1	7,0	14,5	78,2	7,3
H2	20	13,7	73,7	12,5	15,1	78,9	6,0	13,9	79,3	6,8
H2	21	15,6	73,7	10,7	17,3	77,0	5,7	13,5	80,5	6,0
H2	22	13,8	73,0	13,1	15,2	78,3	6,5	11,7	82,8	5,5
H2	23	14,3	73,5	12,3	16,2	77,5	6,3	13,1	80,2	6,7
H2	24	14,4	75,7	10,0	16,8	77,0	6,2	15,0	78,3	6,7
H2	25	14,3	75,2	10,4	15,0	78,9	6,1	12,0	81,4	6,6
H2	26	16,0	71,9	12,1	16,6	77,3	6,2	12,7	80,8	6,5
H2	27	12,9	71,8	15,3	14,8	79,1	6,1	13,0	80,5	6,5
H2	28	12,5	70,7	16,8	14,4	79,0	6,6	14,0	79,8	6,2
H2	29	13,3	72,1	14,6	14,5	77,8	7,7	12,0	81,1	6,9
H2	30	11,9	75,6	12,5	13,5	79,2	7,3	9,7	82,5	7,8
H2	31	14,8	77,7	7,5	15,6	77,7	6,8	13,9	79,7	6,4
H2	32	12,6	74,3	13,1	15,4	78,3	6,3	10,3	83,1	6,6
H2	33	12,6	74,2	13,2	16,6	77,1	6,3	15,3	79,3	5,4
H2	34	12,3	74,7	13,0	14,3	79,0	6,7	12,5	79,7	7,8
H2	35	11,7	71,7	16,6	16,6	77,1	6,3	10,5	81,9	7,6
H2	36	13,6	76,3	10,1	15,1	78,1	6,8	11,1	81,6	7,3
H2	37	13,4	74,3	12,3	15,0	78,9	6,1	12,4	81,1	6,5
H2	38	12,3	76,0	11,6	12,8	79,7	7,6	10,9	81,8	7,3
H2	39	12,8	76,6	10,6	13,9	78,9	7,3	12,4	81,0	6,6
H2	40	12,2	73,1	14,7	13,4	78,8	7,9	11,6	80,4	8,0
H2	41	11,6	74,7	13,7	14,0	78,8	7,2	12,5	81,1	6,4
H2	42	17,9	73,5	8,7	19,2	76,4	4,3	14,7	79,5	5,8

Tabla 5.25. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie A2, campaña 2005-2006.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
A2	48	16,4	71,8	11,8	16,1	73,3	10,6	14,8	75,8	9,4
A2	43	15,8	80,6	3,7	16,0	81,0	3,0	14,9	81,8	3,3
A2	46	15,2	77,7	7,1	16,6	79,9	3,6	16,0	80,6	3,4
A2	45	15,9	79,9	4,2	16,0	80,1	3,9	15,9	80,4	3,7
A2	44	17,1	79,5	3,4	16,4	79,7	3,9	14,9	80,8	4,3
A2	47	14,5	74,6	10,98	16,8	78,8	4,4	16,3	79,2	4,5

Tabla 5.26. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie G2, campaña 2005-2006.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
G2	49	15,1	76,9	8,0	15,7	80,8	3,5	13,9	83,2	2,9
G2	50	20,8	72,1	7,1	20,3	72,3	7,5	18,6	73,1	8,3
G2	51	19,3	70,1	10,7	20,3	71,9	7,8	18,6	72,8	8,6
G2	52	18,4	68,3	13,3	19,4	69,1	11,6	19,0	70,0	11,0
G2	53	17,3	69,4	13,3	18,2	70,7	11,2	16,2	72,2	11,6
G2	54	17,4	70,7	11,9	18,2	72,0	9,8	16,3	72,9	10,8
G2	55	17,4	71,2	11,4	17,9	72,3	9,8	17,3	72,9	9,8
G2	56	15,1	68,9	16,1	16,7	74,1	9,3	15,0	75,4	9,6
G2	57	14,9	72,9	12,2	16,3	78,1	5,6	15,3	78,3	6,4
G2	58	17,4	69,7	13,0	18,4	71,0	10,6	16,8	72,8	10,4
G2	59	16,5	73,8	9,7	18,7	75,0	6,3	18,0	75,6	6,4
G2	60	16,2	72,6	11,1	16,4	74,7	8,9	13,6	77,7	8,7
G2	61	17,9	54,1	28,1	19,6	52,9	27,5	16,7	57,6	25,7
G2	63	13,7	72,2	14,1	16,0	80,1	3,9	14,7	80,6	4,7

Tabla 5.27. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie H3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H3	1	15,3	73,5	11,2	16,7	76,6	6,8	16,5	76,1	7,4
H3	2	15,8	76,7	7,5	16,4	78,8	4,8	14,3	79,9	5,8
H3	3	16,3	72,1	11,6	17,1	73,6	9,3	16,5	73,8	9,7
H3	4	14,5	74,9	10,6	15,1	79,4	5,5	14,3	80,1	5,6
H3	5	15,7	74,7	9,7	17,0	75,6	7,4	15,9	75,9	8,2
H3	6	15,7	73,0	11,3	17,0	74,3	8,8	16,0	74,4	9,6
H3	7	14,9	74,2	10,8	16,6	77,8	5,6	15,2	78,9	5,9
H3	8	14,7	75,3	10,0	16,0	79,1	4,9	14,2	80,5	5,3
H3	9	15,7	76,1	8,2	16,7	78,7	4,6	16,4	78,9	4,7
H3	10	14,2	74,6	11,1	16,0	79,4	4,6	11,9	83,2	4,9
H3	11	15,8	76,6	7,7	15,1	80,2	4,7	14,0	81,3	4,7
H3	12	13,1	75,7	11,2	13,7	76,3	10,1	13,7	75,9	10,4
H3	13	15,2	74,0	10,8	15,9	77,5	6,6	13,7	78,6	7,7
H3	14	15,5	76,2	8,4	16,8	78,7	4,6	14,3	80,8	4,9
H3	15	15,2	74,4	10,4	16,3	76,5	7,2	12,4	80,4	7,2

H3	16	15,1	74,0	10,9	17,0	77,5	5,5	14,2	79,6	6,2
H3	17	15,3	75,7	9,1	16,0	79,5	4,5	14,7	80,6	4,7
H3	18	13,9	73,0	13,1	15,0	75,7	9,3	13,9	76,1	10,0
H3	19	13,6	71,4	15,0	15,6	76,3	8,1	13,1	78,8	8,1
H3	20	13,9	77,8	8,4	15,3	70,1	8,6	12,3	77,9	9,8
H3	21	14,3	70,3	15,4	15,9	78,8	5,3	13,0	80,9	6,1
H3	22	12,4	72,0	15,7	14,0	78,4	7,6	12,7	79,4	7,9
H3	23	12,7	72,8	14,5	13,8	77,6	8,7	12,0	78,4	9,6
H3	24	13,0	71,9	15,1	14,5	77,9	7,7	12,6	79,2	8,2
H3	25	12,1	68,6	19,3	14,3	79,2	6,5	12,7	80,6	6,7
H3	26	12,2	69,8	18,1	14,4	77,6	8,1	14,5	77,4	8,1
H3	27	12,5	68,9	18,7	14,5	76,8	8,8	13,8	76,8	9,4
H3	28	13,0	72,0	15,0	14,0	78,3	7,6	13,4	78,9	7,7
H3	29	12,5	71,4	16,1	14,0	76,7	9,3	11,3	78,9	9,8
H3	30	11,6	73,5	14,8	13,2	80,0	7,8	12,0	79,2	8,8
H3	31	13,2	69,1	17,7	15,3	77,2	7,5	14,5	77,6	7,9
H3	32	13,6	74,8	11,6	14,6	78,2	7,2	13,0	79,9	7,1
H3	33	12,1	75,5	12,4	13,9	76,8	9,3	12,0	80,4	7,6
H3	34	12,8	76,2	11,0	14,7	76,9	8,5	13,4	77,6	9,0
H3	35	13,1	76,9	10,0	14,1	77,2	8,8	13,3	78,8	7,9
H3	36	14,9	74,3	10,8	15,2	76,7	8,1	14,8	76,9	8,3
H3	37	12,9	77,3	9,8	15,0	76,8	8,3	11,8	80,4	7,8
H3	38	12,6	75,8	11,6	13,5	77,9	8,5	11,3	80,0	8,7
H3	39	11,6	72,7	15,7	13,8	77,0	9,2	11,2	79,7	9,1
H3	40	12,8	74,5	12,7	14,0	77,6	8,4	12,8	78,3	8,9
H3	41	12,3	72,8	14,9	14,7	76,3	9,0	13,1	77,5	9,4
H3	42	15,4	78,4	6,2	16,3	78,7	4,9	14,4	80,3	5,3
H3	43	12,6	74,9	12,4	14,7	76,7	8,6	14,4	76,6	9,0
H3	44	13,1	74,2	12,7	13,7	77,2	9,1	13,1	78,7	8,2
H3	45	15,1	74,0	10,9	16,2	77,3	6,4	14,4	78,7	6,9
H3	46	16,8	68,7	14,5	17,3	70,7	12,1	14,5	72,4	13,1

Tabla 5.28. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie A3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
A3	48	17,3	73,3	9,4	18,1	74,3	7,6	13,3	82,3	4,4
A3	50	16,8	76,1	7,1	18,3	75,8	5,9	17,4	74,8	7,8
A3	51	18,7	72,9	8,4	19,2	73,0	7,8	15,6	77,6	6,8
A3	52	12,9	68,4	18,7	17,0	77,0	6,0	16,5	74,4	9,1

A3	53	18,5	66,3	15,2	20,6	69,3	10,2	15,7	77,8	6,5
A3	47	14,5	78,8	6,6	15,8	80,0	4,1	18,6	70,9	10,5

Tabla 5.29. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie G3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
GT3	56	16,7	65,6	17,7	17,4	71,2	11,4	15,7	72,3	12,0
GT3-S	57	15,9	72,7	11,4	16,7	73,1	10,3	15,3	75,1	9,6
GT3-R	58	16,4	70,7	12,9	17,0	71,0	12,0	15,6	72,6	11,8
GT3-S	59	17,4	75,9	6,7	18,4	75,4	6,2	15,5	78,2	6,3
GT3-R	60	16,7	76,1	7,2	17,6	78,9	3,5	16,2	79,2	4,6
G3	61	14,2	77,2	8,6	15,7	79,6	4,7	17,1	70,3	12,6
G3	62	13,7	72,2	14,1	16,0	80,1	3,9	15	80,3	4,7

Tabla 5.30. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie H4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H4	1	15,9	71,2	12,9	17,6	75,5	6,9	15,6	76,7	7,7
H4	3	15,3	72,3	12,4	17,5	72,6	10,0	11,7	76,3	12,0
H4	5	15,1	73,3	11,6	16,8	75,6	7,6	12,5	78,1	9,4
H4	10	15,7	73,0	11,3	18,0	75,7	6,3	12,6	80,1	7,3
H4	12	12,6	69,3	18,0	15,3	74,4	10,3	9,0	77,6	13,4
H4	13	14,8	73,6	11,6	16,3	75,9	7,8	10,0	81,0	9,0
H4	14	16,0	76,6	7,4	17,5	77,4	5,1	15,7	78,7	5,6
H4	15	14,0	74,3	11,8	15,7	78,2	6,1	10,0	82,4	7,6
H4	19	13,5	76,3	10,1	14,1	78,3	7,6	9,2	81,3	9,5
H4	21	15,0	74,1	10,9	16,4	76,6	7,0	12,9	79,6	7,5
H4	22	11,5	76,2	12,2	12,2	78,3	9,5	8,8	80,2	11,0
H4	23	12,2	76,9	10,9	12,9	77,9	9,2	7,6	81,3	11,1
H4	24	13,5	78,8	7,6	14,8	76,2	9,0	11,0	78,9	10,1
H4	25	13,4	78,8	7,8	14,8	77,4	7,9	8,5	81,7	9,8
H4	26	13,2	77,9	9,0	14,3	77,9	7,9	9,4	81,5	9,1
H4	30	13,3	79,7	7,0	15,4	76,3	8,4	12,3	77,8	9,9
H4	31	13,4	74,1	12,4	15,9	76,4	7,7			
H4	32	13,3	79,3	7,4	15,6	79,0	5,5	11,9	81,7	6,4
H4	36	15,2	73,9	10,9	16,4	75,2	8,4	14,1	76,1	9,8

H4	42	12,4	71,7	15,9	14,4	76,2	9,3	9,9	78,9	11,2
H4	44	13,1	75,1	11,8	14,9	76,1	8,9	11,3	78,4	10,3

Tabla 5.31. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie G4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
G4	1	20,5	68,9	10,6	21,2	69,5	9,3	20,2	69,6	10,2
G4	2	18,6	72,1	9,3	19,6	74,3	6,2	17,2	74,9	7,9
G4	3	18,9	65,6	15,5	18,6	67,5	13,9	16,6	68,5	14,9
G4	4	21,5	66,6	11,9	21,5	66,7	11,9	21,3	66,8	11,9
G4	5	14,7	62,5	22,8	17,4	69,2	13,3	16,1	69,7	14,2
G4	6	19,5	59,5	21,1	20,9	62,4	16,8	19,3	62,8	17,9
G4	7	15,2	73,7	11,1	15,9	76,7	7,4	15,6	76,9	7,5
G4	8	18,1	65,5	16,3	21,4	69,1	9,5	17,7	72,1	10,2
G4	9	11,3	78,1	10,6	12,7	78,8	8,5	12,8	78,5	8,7
G4	10	14,4	70,0	15,6	15,4	71,5	13,1	14,7	71,7	13,6
G4	11	15,0	75,9	9,0	16,6	79,0	4,4	15,0	79,5	5,5
G4	12	17,4	67,3	15,3	18,8	69,5	11,8	18,4	69,8	11,8
G4	13	14,6	75,2	10,2	16,3	78,2	5,5	15,8	78,5	5,7

Tabla 5.32. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie DO4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
DO4	1	17,1	69,3	13,6	19,1	70,6	10,3	17,6	73,5	8,9
DO4	2	16,1	72,1	11,8	17,0	74,1	8,9	15,7	76,3	8,0
DO4	3	15,4	66,4	18,2	17,6	73,8	8,6	16,8	74,4	8,8
DO4	4	17,5	62,8	19,7	19,4	67,2	13,4	15,7	69,7	14,6
DO4	14	12,7	77,1	10,2	13,6	80,0	6,4	11,7	82,9	5,4
DO4	15	14,3	77,1	8,5	15,2	80,2	4,6	11,0	85,1	3,8
DO4	16	13,9	73,3	12,8	14,8	78,8	6,4	15,0	78,9	6,0
DO4	17	16,1	68,4	40,0	16,7	73,2	10,1	15,2	75,5	9,4
DO4	18	15,4	74,6	10,1	16,3	76,7	7,0	10,1	83,5	6,3
DO4	19	14,3	71,7	14,1	14,8	72,0	13,2	10,4	77,0	12,6
DO4	20	15,1	70,6	14,3	16,1	72,0	11,9	15,7	73,8	10,5
DO4	21	14,8	76,2	9,1	16,5	76,9	6,6	13,7	80,2	6,1
DO4	22	15,9	70,3	13,8	16,7	72,2	11,1	14,4	76,0	9,6
DO4	23	14,0	72,9	13,1	15,0	74,0	11,0	12,3	78,2	9,5

DO4	24	12,7	78,6	8,7	13,8	81,2	5,0	10,9	84,5	4,6
DO4	25	16,2	74,4	9,5	17,4	76,1	6,5	15,7	78,0	6,3
DO4	26	16,5	76,6	8,9	17,0	76,1	7,0	16,3	77,5	6,2

Tabla 5.33. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie H5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H5	1	14,8	76,6	8,6	16,1	77,8	6,1	14,2	79,1	6,7
H5	3	14,8	74,2	10,9	16,3	75,6	8,1	15,5	76,4	8,1
H5	5	14,2	76,7	9,1	15,9	77,2	6,9	14,6	78,6	6,8
H5	10	15,3	78,3	6,4	15,9	79,3	4,8	13,4	81,9	4,7
H5	12	13,2	78,1	8,7	12,5	77,8	9,7	10,6	79,9	9,5
H5	13	14,2	76,3	9,5	15,4	78,2	6,4	13,4	79,9	6,7
H5	14	15,9	78,1	5,9	15,4	80,9	3,7	11,1	83,9	5,0
H5	15	15,1	78,1	6,8	14,8	79,1	6,1	11,5	82,1	6,4
H5	19	13,6	77,1	9,3	15,6	77,5	6,9	11,9	79,9	8,2
H5	21	15,8	78,0	6,2	15,4	79,9	4,6	12,7	80,1	7,2
H5	22	14,8	75,8	9,4	14,0	80,7	5,3	9,9	83,6	6,5
H5	23	14,5	77,5	7,9	15,2	78,3	6,5	14,7	76,7	8,6
H5	24	13,2	75,7	11,2	14,5	79,5	6,0	13,0	80,2	6,8
H5	25	14,8	78,7	6,4	15,2	80,6	4,1	10,2	80,9	8,9
H5	26	14,9	79,9	5,1	13,8	78,9	7,3	9,9	81,6	8,5
H5	30	14,2	80,6	5,2	13,1	80,4	6,5	9,8	83,1	7,1
H5	31	15,5	76,2	8,3	16,4	76,8	6,7	14,3	78,1	7,6
H5	32	14,2	82,0	3,8	15,2	79,7	5,0	15,7	78,1	6,2
H5	36	14,7	78,5	6,8	15,9	76,6	7,5	12,6	77,9	9,5
H5	42	15,4	78,5	6,1	16,6	77,1	6,3	15,2	77,0	7,8
H5	44	13,6	78,0	8,4	15,0	77,1	7,9	14,0	76,2	9,8

Tabla 5.34. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie G5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
G5	2	17,2	75,1	7,7	18,6	77,4	4,0	14,3	78,7	7,0
G5	3	18,7	65,6	15,7	19,5	66,4	14,1	16,3	69,2	14,5
G5	5	19,0	63,7	17,3	19,6	65,5	14,9	17,9	66,5	15,6
G5	6	20,2	63,2	16,6	20,2	63,8	16,0	18,9	64,7	16,4
G5	8	18,7	66,1	15,2	20,5	69,8	9,7	18,9	71,9	9,2

Tabla 5.35. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie DO5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
DO5	1	16,4	69,0	14,7	18,6	71,7	9,7	15,0	73,3	11,7
DO5	2	14,7	70,2	15,1	17,6	76,1	6,3	13,7	78,5	7,8
DO5	3	14,6	66,0	19,4	17,6	73,3	9,1	13,6	76,1	10,3
DO5	4	19,2	67,6	13,2	19,3	68,4	12,3	14,1	71,5	14,4
DO5	14	13,1	77,2	9,8	13,8	80,6	5,6	10,6	83,5	5,9
DO5	15	11,8	74,5	13,7	14,7	81,2	4,1	11,5	83,9	4,6
DO5	16	14,1	77,6	8,3	15,7	78,6	5,8	11,4	81,6	7,0
DO5	17	15,9	71,9	12,3	16,9	72,8	10,3	12,1	75,9	12,0
DO5	18	13,8	70,7	15,5	16,3	76,0	7,8	15,1	76,7	8,2
DO5	19	12,1	68,1	19,8	14,1	74,2	11,7	9,9	77,4	12,7
DO5	20	14,2	72,7	13,2	14,8	74,7	10,5	13,2	76,2	10,6
DO5	21	14,0	77,6	8,4	15,4	80,4	4,3	13,6	82,3	4,1
DO5	23	12,1	75,7	12,3	13,7	77,4	8,9	7,9	82,1	10,0
DO5	24	13,5	77,3	9,2	14,4	80,5	5,1	12,3	82,6	5,1
DO5	27	13,4	75,6	11,1	14,6	79,4	6,0	10,9	81,8	7,3
DO5	28	12,8	77,6	9,6	13,8	82,2	3,9	12,0	83,4	4,6
DO5	29	13,1	74,3	12,6	15,0	78,7	6,2	12,0	81,2	6,8
DO5	30	13,0	72,2	14,8	14,9	78,4	6,7	10,5	81,5	8,0
DO5	31	14,1	72,2	13,7	15,8	77,4	6,8	15,3	77,4	7,3
DO5	32	13,5	75,9	10,6	16,3	76,8	6,9	11,4	79,9	8,7

Tabla 5.36. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie H6, campaña 2009-2010.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H6	1	15,1	71,6	13,4	18,3	74,1	7,6	15,1	74,2	10,7
H6	3	15,8	70,2	14,0	18,6	70,7	10,7	15,0	71,4	13,6
H6	10	14,4	69,1	16,4	17,3	76,9	5,8	13,4	79,8	6,9
H6	14	15,0	72,9	12,1	17,1	78,4	4,5	12,4	78,5	9,1
H6	19	15,2	77,0	7,9	17,7	77,7	4,6	16,6	78,7	4,7
H6	21	16,8	76,4	6,8	18,6	75,4	6,0	15,9	76,7	7,5
H6	22	14,4	73,8	11,8	15,9	77,2	6,9	14,6	79,1	6,3
H6	23	13,8	77,2	9,0	15,3	77,1	7,6	15,8	77,8	6,4
H6	24	14,7	75,6	9,7	15,9	77,6	6,5	10,9	78,7	10,4
H6	25	14,3	71,8	13,9	16,7	76,7	6,6	12,8	79,9	7,3
H6	26	15,1	83,1	1,7	18,4	74,6	7,0	15,5	76,8	7,7

Tabla 5.37. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie DO6, campaña 2009-2010.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
DO6	1	15,1	75,7	9,2	16,8	77,1	6,1	18,1	75,2	6,7
DO6	2	15,0	74,2	10,8	16,4	75,1	8,6	10,3	78,8	10,8
DO6	3	16,5	70,5	13,0	17,2	73,2	9,5	12,4	77,2	10,5
DO6	4	18,8	66,3	14,9	19,7	66,0	14,3	17,3	69,1	13,6
DO6	5	14,5	73,4	12,1	16,2	76,0	7,8	17,7	73,5	8,8
DO6	10	14,8	74,2	11,0	16,2	79,0	4,8	14,4	79,8	5,9
DO6	11	15,5	74,6	9,9	16,5	78,5	5,0	14,0	79,0	7,0
DO6	12	16,3	74,1	9,5	17,1	77,3	5,7	13,9	80,0	6,2
DO6	13	13,3	75,6	11,1	15,4	80,0	4,5	14,3	80,8	4,9
DO6	14	11,9	72,6	15,5	12,3	76,9	10,8	8,4	78,9	12,7
DO6	15	14,8	76,0	9,2	16,5	78,9	4,6	17,7	77,7	4,6
DO6	16	14,7	76,5	8,8	16,6	76,3	7,2	17,1	77,0	6,0
DO6	17	16,0	72,8	11,3	16,5	73,5	10,0	14,9	74,6	10,5
DO6	18	18,2	68,6	13,2	18,1	69,1	12,8	18,5	66,4	15,2
DO6	20	18,0	67,5	14,5	17,4	69,3	13,3	16,6	68,7	14,7
DO6	21	14,7	75,4	9,9	15,3	78,9	5,8	16,0	76,4	7,6
DO6	22	15,6	71,5	12,9	15,9	72,6	11,6	14,5	73,7	11,8
DO6	23	14,1	74,4	11,5	15,5	75,4	9,0	12,8	77,5	9,7
DO6	24	14,9	75,6	9,6	15,8	77,0	7,3	13,3	79,2	7,5
DO6	27	15,5	72,0	12,5	16,9	74,9	8,2	15,2	75,3	9,5
DO6	28	15,0	71,6	13,3	16,0	74,0	9,9	12,5	75,7	11,7
DO6	29	15,6	74,3	10,1	16,4	75,0	8,6	16,9	72,4	10,7
DO6	31	14,8	75,1	10,1	16,2	74,8	9,0	14,8	74,2	11,0
DO6	33	14,1	75,3	10,6	16,8	78,9	4,3	17,6	78,7	3,8
DO6	34	14,4	76,8	8,8	16,5	79,5	4,3	10,4	85,9	3,8
DO6	35	15,4	76,4	8,2	15,9	79,9	4,2	15,9	79,0	5,1
DO6	26	15,2	76,9	7,9	16,2	79,6	4,2	16,6	78,2	5,2
DO6	37	15,3	77,3	7,4	16,9	78,1	5,0	16,2	78,9	4,9
DO6	38	14,8	77,2	7,9	16,2	79,7	4,1	12,1	85,7	2,2

Tabla 5.38. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie H7, campaña 2010-2011.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
H7	1	13,6	77,0	9,4	19,5	74,2	6,3	9,5	84,4	6,1
H7	3	14,3	76,2	9,6	15,3	75,3	9,4	8,6	82,2	9,2
H7	10	15,7	77,5	6,8	17,5	78,7	3,8	14,0	83,1	2,9
H7	14	16,2	80,6	3,2	20,6	76,6	2,8	14,2	83,3	2,5
H7	15	12,4	80,9	6,7	14,0	80,5	5,5	8,2	84,3	7,5

H7	19	15,6	81,8	2,6	20,4	73,2	6,4	11,9	80,4	7,7
H7	21	21,7	76,1	2,3	20,3	67,7	2,9	13,5	79,9	6,6
H7	22	15,7	81,9	2,3	19,9	73,5	6,6	13,3	76,9	9,8
H7	23	21,3	77,1	1,6	23,8	68,9	7,3	14,2	75,9	9,9
H7	24	14,4	83,9	1,7	16,9	75,0	8,1	11,2	77,6	11,2
H7	25	14,1	82,7	3,2	17,5	75,0	7,5	14,3	76,5	9,2
H7	26	15,0	83,4	1,7	18,0	75,3	6,7	14,4	78,4	7,2

Tabla 5.39. Contenido en ácidos grasos, determinados por RMN de ^{13}C , en la zona Carbonílica, de los C-16 y de los carbonos alifáticos, para muestras de la serie DO7, campaña 2010-2011.

Serie	RI	Zona Carbonílica			Zona C-16			Zona Carbonos alifáticos		
		SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
DO7	1	18,3	66,8	14,9	19,8	69,3	10,9	16,7	72,7	10,6
DO7	2	15,4	78,6	6,0	17,6	74,9	7,5	11,8	83,0	5,2
DO7	3	12,6	64,4	23,0	17,5	74,1	8,5	17,5	74,0	8,5
DO7	4	18,0	68,4	13,5	19,0	69,0	12,1	9,9	80,8	9,3
DO7	14	10,6	80,8	8,7	11,2	82,3	6,5	2,3	91,9	5,8
DO7	15	11,8	82,9	5,3	13,1	83,3	3,6	8,1	88,6	3,3
DO7	16	13,5	75,8	10,7	15,4	78,4	6,2	13,7	81,7	4,6
DO7	17	15,3	76,1	8,6	15,7	75,3	9,1	9,5	80,8	9,7
DO7	18	14,4	78,9	6,7	15,1	79,2	5,7	8,5	87,4	4,1
DO7	20	12,5	72,0	15,5	13,5	74,4	12,1	16,4	71,0	12,6
DO7	21	10,6	77,4	12,0	11,8	84,0	4,3	14,8	81,1	4,1
DO7	22	15,8	72,1	12,1	16,4	73,0	10,6	15,5	73,6	10,9
DO7	23	16,2	71,6	12,2	16,8	73,0	10,2	14,3	76,1	9,6
DO7	24	12,7	78,6	8,8	13,7	82,2	4,1	11,6	85,2	3,2
DO7	25	14,5	83,5	2,0	17,7	73,8	8,5	15,5	75,4	9,1
DO7	26	14,9	82,9	2,2	15,6	76,2	8,2	12,5	80,0	7,5
DO7	27	12,7	77,4	9,9	13,5	79,7	6,8	9,7	83,7	6,6
DO7	29	15,8	71,7	12,5	17,7	74,5	7,8	13,3	78,9	7,8
DO7	31	17,3	82,7	0,0	19,4	74,7	5,9	15,5	77,4	7,1

Tabla 5.40. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie G1, campaña 2004-2005.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+ Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁ *	r ₂ **
G1	1	16,0	6,7	37,4	8,1	25,3	6,6	1,5	1,2
G1	2	17,9	4,9	40,4	4,8	27,0	5,0	1,5	1,0
G1	3	16,6	5,8	37,2	8,1	25,0	7,4	1,5	1,1

Capítulo 5

G1	4	17,8	6,0	35,4	8,9	23,8	8,1	1,5	1,1
G1	5	17,9	6,9	34,2	9,6	23,2	8,1	1,5	1,2
G1	6	18,5	6,0	35,4	8,5	24,2	7,5	1,5	1,1
G1	9	20,0	7,4	32,0	8,6	23,9	8,1	1,3	1,1
G1	10	15,2	5,7	40,3	6,7	25,9	6,2	1,6	1,1
G1	11	15,1	5,2	39,8	7,2	25,8	6,9	1,5	1,0
G1	12	16,1	5,9	37,4	10,1	24,4	6,2	1,5	1,6
G1	14	16,0	6,1	36,8	9,7	24,2	7,2	1,5	1,3
G1	15	14,9	6,9	35,7	10,1	23,3	9,1	1,5	1,1
G1	16	16,2	7,1	29,3	16,3	20,0	11,1	1,5	1,5
G1	17	16,5	5,0	28,4	18,7	18,9	12,6	1,5	1,5
G1	18	17,3	6,2	29,2	15,7	19,1	12,6	1,5	1,3
G1	19	19,6	4,1	32,7	10,2	23,9	9,5	1,4	1,1
G1	20	18,6	5,9	31,7	11,4	21,4	11,1	1,5	1,0
G1	21	16,9	6,8	27,4	16,8	18,0	14,1	1,5	1,2
G1	22	17,3	1,6	40,4	5,4	26,4	8,8	1,5	0,6
G1	23	16,4	2,0	39,3	8,4	25,4	8,6	1,6	1,0
G1	24	18,3	4,8	39,8	5,0	26,8	5,4	1,5	0,9
G1	25	19,4	4,1	40,2	4,5	27,6	4,1	1,5	1,1
G1	26	20,6	4,5	30,6	12,0	20,6	11,7	1,5	1,0
G1	27	17,5	5,3	36,4	7,8	26,2	6,8	1,5	1,1
G1	28	17,3	5,1	38,0	7,1	25,7	6,8	1,5	1,0
G1	29	19,4	5,9	39,1	5,3	26,9	3,3	1,5	1,6
G1	30	14,7	4,7	37,6	10,9	24,5	7,6	1,5	1,4
G1	31	14,8	5,3	40,2	8,9	25,7	5,1	1,6	1,7
G1	32	14,8	3,5	37,7	9,9	25,1	8,9	1,5	1,1
G1	33	15,7	4,9	36,1	10,7	24,0	8,7	1,5	1,2
G1	35	14,8	4,5	39,7	8,4	25,0	7,6	1,6	1,1
G1	36	15,1	4,0	38,0	11,1	25,6	6,3	1,5	1,8
G1	37	18,6	4,3	33,1	11,9	21,5	10,6	1,4	1,0
G1	38	19,2	4,2	32,7	11,0	22,4	10,5	1,5	1,0
G1	39	20,2	1,4	31,7	13,1	21,2	12,4	1,4	1,1
G1	40	18,0	6,0	34,6	9,1	23,4	8,9	1,5	1,0
G1	41	16,4	4,0	37,5	8,9	24,8	8,5	1,5	1,1
G1	42	19,3	4,6	32,3	11,1	22,0	10,8	1,5	0,9
G1	44	16,1	3,3	38,7	9,2	26,0	6,6	1,5	1,4
G1	45	17,0	4,2	41,1	5,3	27,0	5,4	1,5	1,0
G1	46	18,7	5,5	38,9	5,4	25,6	5,8	1,5	0,9
G1	47	17,3	4,5	37,9	7,4	25,4	7,5	1,5	1,0
G1	48	17,8	5,1	38,0	6,4	25,3	7,3	1,5	0,9
G1	49	16,9	4,9	34,8	11,8	23,3	8,3	1,5	1,4
G1	50	14,8	5,3	40,2	8,9	25,7	5,1	1,6	1,7
G1	51	19,2	5,9	36,1	8,2	26,4	4,0	1,4	1,7
G1	52	19,5	4,2	31,0	12,2	21,5	11,6	1,5	1,1
G1	53	13,4	3,7	39,6	9,6	25,6	8,1	1,6	1,2
G1	54	13,7	6,6	36,8	10,6	22,8	9,5	1,6	1,1
G1	55	15,2	4,2	37,3	10,8	25,0	7,6	1,5	1,4

G1	56	18,0	4,0	35,1	10,0	23,4	9,7	1,5	1,0
G1	57	18,6	4,3	33,4	11,5	22,2	10,1	1,5	1,1
G1	58	19,0	5,5	30,2	12,7	20,9	11,8	1,4	1,1
G1	59	18,6	3,7	34,4	10,3	23,4	9,6	1,5	1,1
G1	60	19,3	3,7	33,6	9,4	23,6	10,4	1,4	0,9
G1	61	18,8	4,0	30,2	14,2	20,5	12,4	1,5	1,2
G1	62	15,0	6,8	42,0	4,1	28,0	4,2	1,5	1,0
E1	63	12,6	5,8	39,7	9,9	24,4	7,7	1,6	1,3
E1	64	12,9	2,9	42,4	8,8	26,0	7,1	1,6	1,2
E1	65	16,8	8,4	31,2	10,6	21,0	12,1	1,5	0,9
S1	66	18,6	3,6	33,4	10,7	24,6	9,2	1,4	1,2
S1	67	20,1	1,9	36,5	7,9	25,6	8,0	1,4	1,0
S1	68	18,5	3,2	33,6	12,3	23,5	8,9	1,4	1,4
S1	69	18,3	4,2	31,4	12,0	23,1	11,0	1,4	1,1
S1	70	19,5	3,4	34,8	9,5	24,6	8,2	1,4	1,2
S1	71	19,9	4,1	35,8	8,0	25,1	7,1	1,4	1,1
G1	72	15,0	2,2	39,0	11,1	24,0	8,7	1,6	0,7
G1	73	19,4	4,7	37,4	5,9	27,0	5,6	1,4	1,1
G1	74	15,3	3,7	32,9	15,2	21,3	11,7	1,6	1,3
G1	75	15,5	3,2	36,3	12,4	24,4	8,3	1,5	1,5
V1	76	8,8	0,0	44,8	12,6	26,6	7,2	1,7	1,8
V1	77	13,5	0,0	19,9	31,3	14,0	21,3	1,4	1,5
V1	78	12,0	0,0	28,0	25,8	16,1	18,2	1,7	1,4
V1	79	11,6	0,0	21,1	33,3	11,1	22,8	1,9	1,5
G1	80	16,7	6,6	33,0	9,6	22,1	12,0	1,5	0,8

Tabla 5.41. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie H2, campaña 2005-2006.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
H2	1	17,1	3,3	41,7	4,9	27,9	5,2	1,5	0,9
H2	2	15,8	4,2	43,8	3,0	29,1	4,0	1,5	0,8
H2	3	15,7	2,4	39,8	9,0	25,4	7,7	1,6	1,2
H2	4	14,2	3,1	44,3	4,9	29,0	4,5	1,5	1,1
H2	5	15,0	2,8	41,3	7,4	26,8	6,8	1,5	1,1
H2	6	14,5	2,9	42,0	8,0	26,1	6,6	1,6	1,2
H2	7	13,8	2,9	42,2	6,9	28,0	6,3	1,5	1,1
H2	8	14,7	3,0	43,5	5,1	28,9	4,8	1,5	1,1
H2	9	15,4	3,2	41,3	6,1	28,1	5,8	1,5	1,1
H2	10	17,2	2,9	41,7	4,9	29,5	3,8	1,4	1,3
H2	11	15,5	3,6	42,2	5,2	28,4	5,1	1,5	1,0
H2	12	14,9	2,5	42,7	6,2	26,9	6,8	1,6	0,9
H2	13	14,3	2,7	43,3	5,8	27,3	6,7	1,6	0,9
H2	14	14,5	3,5	43,1	6,7	28,3	4,0	1,5	1,7
H2	15	15,3	2,7	43,5	6,7	27,3	4,4	1,6	1,5
H2	16	16,0	2,2	43,6	5,8	28,6	3,9	1,5	1,5

H2	17	15,6	3,8	43,2	4,5	28,4	4,5	1,5	1,0
H2	21	15,6	4,0	41,5	6,7	28,2	4,0	1,5	1,7
H2	42	17,9	2,4	41,6	4,0	29,5	4,7	1,4	0,9
H2	18	14,0	4,1	42,9	6,3	27,7	5,1	1,6	1,2
H2	19	14,5	3,5	43,1	5,9	27,7	5,2	1,6	1,1
H2	20	13,7	2,8	43,4	7,1	27,5	5,4	1,6	1,3
H2	22	13,8	2,5	43,4	8,8	27,1	4,3	1,6	2,1
H2	23	14,3	2,8	42,8	6,6	27,9	5,6	1,5	1,2
H2	24	14,4	2,6	45,1	5,5	28,0	4,5	1,6	1,2
H2	25	14,3	2,0	45,0	4,9	28,2	5,5	1,6	0,9
H2	26	16,0	1,8	42,0	6,9	28,1	5,2	1,5	1,3
H2	27	12,9	2,5	42,0	7,9	27,2	7,4	1,5	1,1
H2	28	12,5	2,1	42,3	8,7	26,3	8,2	1,6	1,1
H2	29	13,3	1,2	43,7	8,9	27,2	5,7	1,6	1,6
H2	30	11,9	3,1	45,0	7,2	27,5	5,3	1,6	1,4
H2	31	14,8	3,7	44,5	3,2	29,5	4,3	1,5	0,7
H2	32	12,6	2,7	43,6	7,6	28,0	5,5	1,6	1,4
H2	33	12,6	2,9	43,9	7,3	27,4	5,9	1,6	1,3
H2	34	12,3	2,8	44,3	8,1	27,6	4,9	1,6	1,7
H2	35	11,7	2,4	43,3	10,4	26,0	6,3	1,7	1,7
H2	36	13,6	2,6	45,7	5,1	28,0	5,0	1,6	1,0
H2	37	13,4	2,9	43,9	7,4	27,5	4,9	1,6	1,5
H2	38	12,3	2,1	46,2	7,1	27,7	4,5	1,7	1,6
H2	39	12,8	2,2	46,4	6,2	28,0	4,4	1,7	1,4
H2	40	12,2	1,8	44,6	8,7	26,6	6,0	1,7	1,5
H2	41	11,6	2,4	45,3	7,3	27,0	6,4	1,7	1,2

Tabla 5.42. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie A2, campaña 2005-2006.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
A2	48	16,4	4,4	40,6	6,2	26,8	5,6	1,5	1,1
A2	43	15,8	3,8	46,3	1,1	30,5	2,6	1,5	0,4
A2	46	15,2	3,9	43,7	4,3	30,1	2,8	1,5	1,6
A2	45	15,9	2,9	46,8	2,7	30,1	1,5	1,6	1,8
A2	44	17,1	4,6	44,5	2,1	30,4	1,3	1,5	1,6
A2	47	14,5	2,9	43,2	5,9	28,5	5,1	1,5	1,2

Tabla 5.43. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie G2, campaña 2005-2006.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
G2	49	15,1	3,0	43,8	3,9	30,0	4,1	1,5	1,0
G2	50	20,8	2,5	40,0	3,4	29,6	3,8	1,4	0,9
G2	51	19,3	2,3	39,6	6,5	28,2	4,2	1,4	1,5
G2	52	18,4	4,2	38,6	6,7	25,4	6,7	1,5	1,0
G2	53	17,3	4,5	39,0	6,8	25,9	6,6	1,5	1,0
G2	54	17,4	3,9	39,7	6,2	27,1	5,8	1,5	1,1
G2	55	17,4	3,4	40,2	5,7	27,6	5,7	1,5	1,0
G2	56	15,1	4,0	38,4	9,6	26,5	6,5	1,5	1,5
G2	57	14,9	2,6	42,0	8,1	28,3	4,1	1,5	2,0
G2	58	17,4	3,8	39,0	6,7	26,8	6,3	1,5	1,1
G2	59	16,5	2,8	42,4	4,8	28,6	4,9	1,5	1,0
G2	60	16,2	2,3	43,1	5,5	27,2	5,7	1,6	1,0
G2	61	17,9	2,9	31,6	14,5	19,6	13,6	1,6	1,1
G2	63	13,7	2,3	42,2	9,0	27,7	5,1	1,5	1,8

Tabla 5.44. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie H3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
H3	1	15,3	2,7	42,5	5,1	28,4	6,0	1,5	0,9
H3	2	15,8	2,7	45,0	4,5	29,0	3,0	1,6	1,5
H3	3	16,3	4,0	41,2	5,6	26,9	6,0	1,5	1,0
H3	4	14,5	2,7	43,9	6,0	28,3	4,6	1,6	1,3
H3	5	15,7	3,6	42,6	4,7	28,5	5,0	1,5	0,9
H3	6	15,7	3,3	42,4	5,9	27,3	5,4	1,6	1,1
H3	7	14,9	4,2	42,3	6,3	27,7	4,6	1,5	1,4
H3	8	14,7	5,1	42,0	6,0	28,1	4,0	1,5	1,5
H3	9	15,7	3,2	44,3	3,3	28,6	4,9	1,6	0,7
H3	10	14,2	4,5	42,8	5,8	27,3	5,3	1,6	1,1
H3	11	15,8	3,7	44,1	3,4	28,8	4,2	1,5	0,8
H3	12	13,1	3,0	45,2	4,9	27,6	6,2	1,6	0,8
H3	13	15,2	2,9	43,2	7,0	28,0	3,8	1,5	1,8
H3	14	15,5	3,3	43,9	4,5	29,0	3,8	1,5	1,2
H3	15	15,2	2,8	43,1	6,1	28,5	4,3	1,5	1,4
H3	16	15,1	3,2	42,4	5,9	28,4	5,0	1,5	1,2

H3	17	15,3	3,1	43,5	5,6	29,1	3,5	1,5	1,6
H3	18	13,9	3,9	42,3	7,6	26,7	5,5	1,6	1,4
H3	19	13,6	3,2	41,9	8,2	26,2	6,8	1,6	1,2
H3	20	13,9	4,6	45,1	4,1	28,0	4,3	1,6	1,0
H3	21	14,3	2,3	40,9	8,1	21,2	7,3	1,5	1,1
H3	22	12,4	2,2	43,2	9,1	26,6	6,6	1,6	1,4
H3	23	12,7	2,7	43,7	7,4	26,4	7,1	1,7	1,0
H3	24	13,0	2,5	42,6	10,0	26,9	5,1	1,6	2,0
H3	25	12,1	1,7	40,7	10,3	26,2	9,1	1,6	1,1
H3	26	12,2	2,0	41,5	10,1	26,3	7,9	1,6	1,3
H3	27	12,5	2,2	41,1	11,3	25,6	7,4	1,6	1,5
H3	28	13,0	1,9	43,5	8,8	26,7	6,2	1,6	1,4
H3	29	12,5	2,6	42,6	9,9	26,2	6,2	1,6	1,6
H3	30	11,6	1,7	44,6	8,4	27,3	6,4	1,6	1,3
H3	31	13,2	2,1	40,8	10,7	26,3	6,9	1,6	1,6
H3	32	13,6	2,8	44,7	6,6	27,3	4,9	1,6	1,3
H3	33	12,1	3,3	45,4	6,8	26,8	5,6	1,7	1,2
H3	34	12,8	2,8	45,4	5,8	27,9	5,2	1,6	1,1
H3	35	13,1	1,9	46,4	5,1	28,6	4,9	1,6	1,0
H3	36	14,9	2,6	44,1	6,0	27,6	4,9	1,6	1,2
H3	37	12,9	3,1	46,2	4,7	27,9	5,1	1,7	0,9
H3	38	12,6	2,5	45,9	6,2	27,5	5,3	1,7	1,2
H3	39	11,6	1,7	44,6	8,5	26,4	7,2	1,7	1,2
H3	40	12,8	2,6	44,3	6,8	27,5	5,9	1,6	1,2
H3	41	12,3	2,6	44,3	8,9	25,9	6,0	1,7	1,5
H3	42	15,4	3,9	44,8	3,5	29,7	2,7	1,5	1,3
H3	43	12,6	3,4	44,5	6,2	27,1	6,2	1,6	1,0
H3	44	13,1	2,7	44,8	7,3	26,7	5,4	1,7	1,4
H3	45	15,1	4,6	42,5	5,9	26,9	5,0	1,6	1,2
H3	46	16,8	3,9	38,5	8,3	26,4	6,2	1,5	1,3

Tabla 5.45. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie A3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
A3	48	17,3	3,8	41,2	5,1	28,3	4,3	1,5	1,2
A3	50	16,8	4,9	42,5	3,7	28,6	3,4	1,5	1,1
A3	51	18,7	4,3	40,2	4,9	28,4	3,6	1,4	1,4
A3	52	12,9	2,4	40,3	9,4	25,7	9,3	1,6	1,0
A3	53	18,5	4,8	36,3	9,4	25,1	5,8	1,4	1,6
A3	47	14,5	3,1	41,8	3,7	29,9	2,9	1,5	1,3

Tabla 5.46. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie G3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
GT3	56	16,7	3,4	37,9	8,9	24,3	8,8	1,7	1,0
GT3-S	57	15,9	4,4	41,3	5,8	27,0	5,6	1,5	1,0
GT3-R	58	16,4	3,3	40,8	6,6	26,7	6,3	1,5	1,0
GT3-S	59	17,4	4,1	42,1	3,5	29,8	3,2	1,4	1,1
GT3-R	60	16,5	4,1	41,7	4,5	28,9	4,3	1,4	1,0
G3	61	16,6	3,7	33,6	14,2	22,6	9,4	1,5	1,5
G3	62	14,2	4,2	43,6	4,7	29,4	3,9	1,5	1,2

Tabla 5.47. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie H4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
H4	1	15,9	2,8	40,9	8,3	27,6	4,6	1,5	1,8
H4	3	15,3	2,6	42,7	6,0	27,0	6,4	1,6	0,9
H4	5	15,1	2,4	42,5	5,9	28,4	5,7	1,5	1,0
H4	10	15,7	2,6	42,2	5,7	28,3	5,5	1,5	1,0
H4	12	12,6	2,5	42,0	11,1	24,9	6,9	1,7	1,6
H4	13	14,8	2,2	43,3	6,1	28,1	5,5	1,5	1,1
H4	14	16,1	3,0	44,0	3,0	29,6	4,4	1,5	0,7
H4	15	14,0	2,9	43,2	6,7	28,1	5,1	1,5	1,3
H4	19	13,5	2,1	46,0	4,1	28,3	6,0	1,6	0,7
H4	21	15,0	3,0	43,2	5,2	27,9	5,7	1,5	0,9
H4	22	11,5	1,4	47,4	6,2	27,5	6,0	1,7	1,0
H4	23	12,2	3,1	46,6	5,5	27,2	5,4	1,7	1,0
H4	24	13,5	4,1	46,7	3,8	28,1	3,9	1,7	1,0
H4	25	13,4	2,9	47,0	3,6	28,9	4,2	1,6	0,9
H4	26	13,2	3,6	46,7	4,7	27,6	4,3	1,7	1,1
H4	30	13,3	2,6	48,8	3,0	28,4	4,0	1,7	0,7
H4	31	13,4	3,2	44,0	6,9	26,9	5,5	1,6	1,3
H4	32	13,3	4,9	45,8	4,0	28,6	3,4	1,6	1,2
H4	36	15,3	4,5	42,2	6,2	27,2	4,7	1,6	1,3
H4	42	12,4	2,1	42,9	9,3	26,8	6,6	1,6	1,4
H4	44	13,1	2,2	45,5	6,1	27,5	5,7	1,7	1,1

Tabla 5.48. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie G4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
G4	1	20,5	5,0	36,6	5,2	27,3	5,4	1,3	1,0
G4	2	18,6	5,3	38,5	3,7	28,3	5,5	1,4	0,7
G4	3	18,9	5,1	35,6	7,9	25,0	7,6	1,4	1,0
G4	4	21,5	3,1	36,7	5,7	26,8	6,2	1,4	0,9
G4	5	14,7	2,1	36,3	14,3	24,1	8,6	1,5	1,7
G4	6	19,5	6,1	31,2	10,8	22,2	10,3	1,4	1,1
G4	7	15,2	4,3	41,7	5,1	27,7	6,0	1,5	0,9
G4	8	18,1	2,6	37,0	8,9	25,9	7,4	1,4	1,2
GT4-S	9	11,3	2,6	47,2	5,5	28,2	5,1	1,7	1,1
GT4-R	10	14,4	5,5	39,8	7,9	24,1	7,7	1,6	1,0
GT4-R	11	15,1	3,4	43,9	3,8	28,5	5,2	1,5	0,7
GT4-S	12	17,4	3,7	38,1	7,6	25,5	7,7	1,5	1,0
GT4-S	13	14,6	3,6	42,8	5,8	28,8	4,4	1,5	1,3

Tabla 5.49. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie DO4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
DO4	1	17,1	6,2	37,6	6,0	25,5	7,6	1,5	0,8
DO4	2	16,1	2,7	42,1	6,2	27,2	5,6	1,6	1,1
DO4	3	15,4	2,6	37,7	11,6	26,1	6,6	1,4	1,7
DO4	4	17,5	5,1	34,3	11,7	23,4	8,0	1,5	1,5
DO4	14	13,8	2,4	42,9	6,2	27,4	7,3	1,6	0,9
DO4	15	12,7	3,6	45,0	4,9	28,4	5,3	1,6	0,9
DO4	16	14,3	3,4	44,2	4,3	29,5	4,2	1,5	1,0
DO4	17	13,9	2,1	44,0	8,2	27,2	4,6	1,6	1,8
DO4	18	16,1	3,2	40,0	8,8	25,2	6,7	1,6	1,3
DO4	19	15,4	3,1	43,1	5,2	28,4	4,8	1,5	1,1
DO4	20	14,3	2,8	43,0	8,0	25,9	6,0	1,7	1,3
DO4	21	15,1	3,2	41,2	7,3	26,2	7,0	1,6	1,0
DO4	22	14,8	2,5	44,7	3,9	29,0	5,2	1,5	0,7
DO4	23	15,9	2,8	40,5	7,1	27,0	6,7	1,5	1,1
DO4	24	14,0	2,7	43,5	6,5	26,7	6,7	1,6	1,0
DO4	25	12,7	2,4	46,6	3,5	29,6	5,2	1,6	0,7
DO4	26	16,2	3,6	42,0	4,8	28,7	4,7	1,5	1,0

Tabla 5.50. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie H5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
H5	1	14,8	2,9	45,0	4,5	28,7	4,1	1,6	1,1
H5	3	14,8	4,1	42,9	5,6	27,2	5,4	1,6	1,0
H5	5	14,2	3,0	44,6	4,2	29,2	4,9	1,5	0,9
H5	10	15,3	3,5	45,0	2,9	29,8	3,5	1,5	0,8
H5	12	12,5	3,8	46,3	4,6	27,7	5,1	1,7	0,9
H5	13	14,2	3,6	44,3	4,7	28,5	4,82	1,6	1,0
H5	14	15,9	3,5	45,2	3,3	29,5	2,7	1,5	1,2
H5	15	15,2	3,3	45,8	3,5	28,9	3,3	1,6	1,0
H5	19	13,6	2,2	46,3	4,6	28,7	4,7	1,6	1,0
H5	21	15,8	3,5	44,1	3,3	30,4	2,9	1,5	1,1
H5	22	14,8	2,0	44,6	5,4	29,3	4,0	1,5	1,3
H5	23	14,5	3,2	45,0	4,5	29,3	3,4	1,5	1,3
H5	24	13,2	4,2	44,0	6,6	27,5	4,5	1,6	1,5
H5	25	15,2	3,5	46,7	1,7	30,5	2,5	1,5	0,7
H5	26	15,0	4,1	46,7	1,9	29,1	3,3	1,6	0,6
H5	30	14,2	2,3	48,6	2,0	29,6	3,3	1,6	0,6
H5	31	15,5	3,6	44,1	4,5	28,6	3,8	1,5	1,8
H5	32	14,2	4,7	47,1	1,7	30,2	2,2	1,6	0,8
H5	36	14,7	5,1	45,2	3,1	28,3	3,7	1,6	0,8
H5	42	15,4	3,9	44,9	2,8	29,7	3,3	1,5	0,9
H5	44	13,6	4,6	45,3	3,8	28,2	4,6	1,6	0,8

Tabla 5.51. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie G5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
G5	2	17,2	3,5	41,6	4,3	30,1	3,4	1,4	1,3
G5	3	18,7	4,6	36,2	7,7	24,8	8,1	1,5	1,0
G5	5	19,0	3,4	34,8	10,1	25,5	7,2	1,4	1,4
G5	6	20,2	4,5	34,4	6,8	24,3	9,9	1,4	0,7
G5	8	18,7	3,8	36,8	7,6	25,4	7,7	1,5	1,0

Tabla 5.52. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie DO5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
DO5	1	16,4	2,9	39,4	7,7	26,7	7,0	1,5	1,1
DO5	2	14,7	3,2	40,1	7,4	27,0	7,7	1,5	1,0
DO5	3	14,6	2,8	37,6	11,8	25,6	7,6	1,5	1,6
DO5	4	19,2	4,0	37,5	6,1	26,1	7,1	1,4	0,9
DO5	6	13,9	2,9	43,3	7,0	27,8	5,1	1,6	1,4
DO5	7	15,0	2,7	42,2	7,5	28,2	4,5	1,5	1,7
DO5	8	14,6	2,3	45,0	4,7	29,9	3,5	1,5	1,4
DO5	9	13,5	3,4	44,6	5,9	28,5	4,1	1,6	1,4
DO5	10	13,7	2,5	41,3	8,5	27,4	6,7	1,5	1,3
DO5	11	14,7	3,8	44,1	4,6	29,0	3,9	1,5	1,2
DO5	14	13,1	2,7	45,9	4,9	28,6	4,9	1,6	1,0
DO5	15	11,8	3,1	43,6	7,7	27,8	6,0	1,6	1,3
DO5	16	14,1	3,9	45,1	4,1	28,6	4,2	1,6	1,0
DO5	17	15,9	3,6	40,7	6,7	27,6	5,6	1,5	1,2
DO5	18	13,8	3,2	41,3	9,7	26,3	5,8	1,6	1,7
DO5	19	12,1	1,7	41,7	11,9	24,6	7,9	1,7	1,5
DO5	20	14,2	3,1	43,1	7,0	26,4	6,2	1,6	1,1
DO5	21	14,0	3,1	45,5	4,9	29,0	3,5	1,6	1,4
DO5	23	12,1	2,9	45,5	6,5	27,3	5,8	1,7	1,1
DO5	24	13,5	3,5	45,2	5,3	28,7	3,9	1,6	1,4
DO5	27	13,4	3,2	44,1	6,3	28,3	4,8	1,6	1,3
DO5	28	12,8	2,3	46,0	4,8	29,3	4,8	1,6	1,0
DO5	29	13,1	2,6	43,5	7,6	28,2	5,0	1,5	1,5
DO5	30	13,0	2,3	42,9	7,9	27,1	6,9	1,6	1,1
DO5	31	14,2	3,2	42,1	8,6	26,9	5,1	1,6	1,7
DO5	32	13,5	4,5	43,1	6,5	28,3	4,1	1,5	1,6

Tabla 5.53. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie H6, campaña 2009-2010.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
H6	1	15,1	3,5	41,1	7,4	27,0	6,0	1,5	1,2
H6	3	15,8	2,9	40,9	6,9	26,4	7,1	1,6	1,0
H6	10	14,4	3,7	38,9	8,8	26,6	7,7	1,5	1,1
H6	14	15,0	3,5	40,9	7,1	28,5	5,0	1,4	1,4
H6	15	14,9	3,9	42,3	5,7	29,8	3,4	1,4	1,7

H6	19	15,2	4,9	42,5	5,1	29,7	2,8	1,4	1,8
H6	21	16,8	3,7	43,1	4,0	29,6	2,8	1,5	1,4
H6	22	14,4	2,3	43,2	5,4	28,3	6,4	1,5	0,8
H6	23	13,8	4,9	44,6	5,1	27,7	3,9	1,6	1,3
H6	24	14,7	3,0	43,7	4,6	28,9	5,1	1,5	0,9
H6	25	14,3	3,1	42,0	8,5	26,7	5,5	1,6	1,6
H6	26	15,1	5,4	48,1	1,2	29,6	0,7	1,6	1,8

Tabla 5.54. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie DO6, campaña 2009-2010.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
DO6	1	15,1	3,5	43,9	4,7	28,3	4,5	1,6	1,1
DO6	2	15,0	2,8	42,5	5,2	28,6	5,7	1,5	0,9
DO6	3	16,5	2,8	41,0	7,1	26,7	5,9	1,5	1,2
DO6	4	18,8	4,4	36,8	7,1	25,0	7,9	1,5	0,9
DO6	5	14,5	2,8	42,8	6,2	27,8	5,8	1,5	1,1
DO6	10	14,8	2,9	42,2	6,0	29,1	5,0	1,5	1,2
DO6	11	15,5	3,1	43,0	5,7	28,5	4,2	1,5	1,4
DO6	12	16,3	3,4	42,1	4,4	28,7	5,2	1,5	0,8
DO6	13	13,3	2,9	44,4	7,5	28,3	3,6	1,6	2,1
DO6	14	11,9	2,3	43,8	8,3	26,5	7,2	1,7	1,2
DO6	15	14,8	2,9	44,4	3,9	28,7	5,3	1,5	0,7
DO6	16	14,7	4,0	43,5	4,4	29,0	4,5	1,5	1,0
DO6	17	16,0	3,7	41,5	5,9	27,6	5,4	1,5	1,1
DO6	18	18,2	4,6	38,1	7,0	25,9	6,2	1,5	1,1
DO6	20	18,0	3,7	38,0	7,0	25,7	7,5	1,5	1,0
DO6	21	14,7	2,3	44,8	4,7	28,3	5,2	1,6	0,9
DO6	22	15,6	3,6	41,2	6,8	29,7	6,1	1,5	1,1
DO6	23	14,1	3,9	42,6	5,8	28,0	5,7	1,5	1,0
DO6	24	14,9	2,3	45,2	6,1	28,1	3,5	1,6	1,7
DO6	27	15,5	3,6	40,7	6,8	27,7	5,7	1,5	1,2
DO6	28	15,0	3,1	41,1	7,7	27,4	5,6	1,5	1,4
DO6	29	15,6	3,1	43,1	5,1	28,1	5,0	1,5	1,0
DO6	31	14,7	4,3	44,2	5,6	26,6	4,5	1,7	1,2
DO6	33	14,1	4,2	42,3	5,4	28,8	5,2	1,5	1,0
DO6	34	14,4	3,8	43,8	5,6	29,2	3,2	1,5	1,8
DO6	35	15,4	3,9	44,2	4,8	28,3	3,5	1,6	1,4
DO6	36	15,2	3,5	44,2	5,5	29,2	2,4	1,5	2,3
DO6	37	15,3	3,3	45,1	3,9	28,8	3,6	1,6	1,1
DO6	38	14,8	2,6	44,9	3,6	29,8	4,3	1,5	0,8

Tabla 5.55. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie H7, campaña 2010-2011.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
H7	1	13,6	6,0	44,5	5,2	26,5	4,1	1,7	1,3
H7	3	14,3	3,4	45,4	4,9	27,4	4,7	1,7	1,0
H7	10	15,7	3,2	44,1	4,4	30,2	2,5	1,5	1,8
H7	14	16,2	4,0	46,6	0,5	30,0	2,7	1,6	0,2
H7	15	12,4	2,3	49,3	0,8	29,4	6,0	1,7	0,1
H7	19	15,6	0,0	50,4	1,7	31,4	0,9	1,6	1,9
H7	21	21,7	0,0	45,9	1,2	30,2	1,0	1,5	1,2
H7	22	15,7	0,0	51,5	1,2	30,5	1,1	1,7	1,1
H7	23	21,3	0,0	47,6	0,0	29,5	1,6	1,6	0,0
H7	24	14,4	7,4	47,5	1,7	29,0	0,0	1,6	-
H7	25	14,1	5,8	47,8	1,4	29,0	1,8	1,7	0,8
H7	26	15,0	5,3	47,9	1,7	30,2	0,0	1,6	-

Tabla 5.56. Distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol calculados por RMN de ^{13}C , en la zona carbonílica, para las muestras de la serie DO7, campaña 2010-2011.

Serie	RI	Saturados 1,3	Vaccénico+Gadoleico 1,3	Oleico 1,3	Linoleico 1,3	Oleico 2	Linoleico 2	r ₁	r ₂
DO7	1	18,3	3,4	37,8	7,5	25,6	7,4	1,5	1,0
DO7	2	15,4	4,9	44,8	2,9	28,9	3,2	1,6	0,9
DO7	3	12,6	1,8	37,9	15,8	24,6	7,2	1,5	2,2
DO7	4	18,0	4,4	38,2	6,5	25,8	7,0	1,5	0,9
DO7	14	10,6	4,3	48,1	5,0	28,3	3,7	1,7	1,4
DO7	15	11,8	3,8	48,8	2,9	30,3	2,4	1,6	1,2
DO7	16	13,5	4,0	43,2	5,9	28,6	4,8	1,5	1,2
DO7	17	15,3	3,7	44,3	4,4	28,1	4,2	1,6	1,1
DO7	18	14,4	3,8	45,1	3,1	30,0	3,6	1,5	0,9
DO7	20	12,5	3,9	42,5	8,1	25,6	7,4	1,7	1,1
DO7	21	10,6	2,8	46,5	7,2	28,1	4,8	1,7	1,5
DO7	22	15,8	4,7	40,5	6,4	26,9	5,7	1,5	1,1
DO7	23	16,2	4,4	41,1	5,0	26,1	7,2	1,6	0,7
DO7	24	12,7	2,7	46,9	5,1	29,0	3,7	1,6	1,4

DO7	25	14,5	6,8	48,0	0,0	28,7	2,0	1,7	0,0
DO7	26	14,9	7,0	47,4	0,0	25,5	2,2	1,7	0,0
DO7	27	12,7	1,1	48,0	6,0	28,3	3,3	1,7	1,5
DO7	29	15,8	3,0	41,5	7,2	27,2	5,3	1,5	1,4
DO7	31	17,3	7,8	45,2	0,0	29,7	0,0	1,5	-

Tabla 5.57. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie G1, campaña 2004-2005.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
G1	1	1,5	1,2	1,4	0,7
G1	2	1,5	1,0	1,5	1,0
G1	3	1,5	1,1	1,5	0,9
G1	4	1,5	1,1	1,4	0,8
G1	5	1,5	1,2	1,4	0,8
G1	6	1,5	1,1	1,4	0,9
G1	9	1,3	1,1	1,4	0,8
G1	10	1,6	1,1	1,5	0,7
G1	11	1,5	1,0	1,5	0,9
G1	12	1,5	1,6	1,5	0,7
G1	14	1,5	1,3	1,4	0,9
G1	15	1,5	1,1	1,4	0,7
G1	16	1,5	1,5	1,3	0,7
G1	17	1,5	1,5	1,4	0,7
G1	18	1,5	1,2	1,4	0,8
G1	19	1,4	1,1	1,4	1,1
G1	20	1,5	1,0	1,3	0,7
G1	21	1,5	1,2	1,3	0,5
G1	22	1,5	0,6	1,4	0,7
G1	23	1,5	1,0	1,4	0,7
G1	24	1,5	0,9	1,5	1,2
G1	25	1,5	1,1	1,5	0,7
G1	26	1,5	1,0	1,4	1,0
G1	27	1,4	1,1	1,5	1,1
G1	28	1,5	1,0	1,5	0,8
G1	29	1,5	1,6	1,5	0,9
G1	30	1,5	1,4	1,5	0,8
G1	31	1,6	1,7	1,5	0,8
G1	32	1,5	1,1	1,5	0,7
G1	33	1,5	1,2	1,5	0,7
G1	35	1,6	1,1	1,5	0,8
G1	36	1,5	1,8	1,4	0,8
G1	37	1,5	1,1	1,4	1,0
G1	38	1,5	1,0	1,5	1,0
G1	39	1,5	1,1	1,4	1,1

Capítulo 5

G1	40	1,5	1,0	1,5	0,8
G1	41	1,5	1,0	1,4	0,9
G1	42	1,5	1,0	1,5	0,9
G1	44	1,5	1,4	1,5	0,9
G1	45	1,5	1,0	1,6	0,9
G1	46	1,5	0,9	1,6	0,8
G1	47	1,5	1,0	1,5	0,8
G1	48	1,5	0,9	1,5	0,7
G1	49	1,5	1,4	1,5	0,9
G1	50	1,6	1,7	1,5	0,8
G1	51	1,4	2,1	1,4	0,9
G1	52	1,4	1,1	1,5	1,0
G1	53	1,5	1,2	1,6	0,8
G1	54	1,6	1,1	1,6	0,8
G1	55	1,5	1,4	1,5	0,9
G1	56	1,5	1,0	1,6	1,0
G1	57	1,5	1,1	1,6	0,9
G1	58	1,4	1,1	1,5	0,8
G1	59	1,5	1,1	1,5	1,0
G1	60	1,4	0,9	1,5	0,9
G1	61	1,5	1,1	1,5	0,9
G1	62	1,5	1,0	1,5	0,9
E1	63	1,6	1,3	1,7	0,9
E1	64	1,6	1,2	1,6	1,2
E1	65	1,5	0,9	1,5	0,8
S1	66	1,4	1,2	1,3	1,0
S1	67	1,4	1,0	1,4	0,8
S1	68	1,4	1,4	1,3	1,2
S1	69	1,4	1,1	1,4	1,0
S1	70	1,4	1,2	1,4	1,2
S1	71	1,4	1,1	1,4	1,0
G1	72	1,6	1,3	1,6	0,7
G1	73	1,4	1,1	1,4	1,0
G1	74	1,5	1,3	1,5	1,2
G1	75	1,5	1,5	1,4	1,4
V1	76	1,7	1,8	1,6	1,1
V1	77	1,4	1,5	1,4	1,2
V1	78	1,7	1,4	1,6	1,0
V1	79	1,9	1,5	1,8	1,2
G1	80	1,5	0,8	1,4	1,2

Tabla 5.58. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie H2, campaña 2005-2006.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
H2	1	1,5	0,9	1,5	1,0
H2	2	1,5	0,8	1,5	1,2
H2	3	1,6	1,2	1,5	1,0
H2	4	1,5	1,1	1,5	1,0
H2	5	1,5	1,1	1,5	0,9
H2	6	1,6	1,2	1,5	0,8
H2	7	1,5	1,1	1,4	0,9
H2	8	1,5	1,1	1,5	0,6
H2	9	1,5	1,1	1,5	0,9
H2	10	1,4	1,3	1,5	0,7
H2	11	1,5	1	1,5	0,7
H2	12	1,6	0,9	1,6	0,8
H2	13	1,6	0,9	1,6	0,8
H2	14	1,5	1,7	1,5	0,9
H2	15	1,6	1,5	1,6	0,9
H2	16	1,5	1,5	1,5	1,1
H2	17	1,5	1	1,5	1,0
H2	18	1,6	1,2	1,5	1,2
H2	19	1,6	1,1	1,5	0,8
H2	20	1,6	1,3	1,5	1,0
H2	21	1,5	1,7	1,5	1,2
H2	22	1,6	2	1,6	1,0
H2	23	1,5	1,2	1,5	0,9
H2	24	1,6	1,2	1,6	0,9
H2	25	1,6	0,9	1,6	1,0
H2	26	1,5	1,3	1,5	1,1
H2	27	1,5	1,1	1,6	0,9
H2	28	1,6	1,1	1,6	1,2
H2	29	1,6	1,6	1,6	1,0
H2	30	1,6	1,4	1,6	1,1
H2	31	1,5	0,7	1,6	0,9
H2	32	1,6	1,4	1,6	0,9
H2	33	1,6	1,2	1,6	1,1
H2	34	1,6	1,7	1,6	0,9
H2	35	1,7	1,7	1,6	0,7
H2	36	1,6	1	1,6	0,6

H2	37	1,6	1,5	1,6	0,9
H2	38	1,7	1,6	1,7	0,9
H2	39	1,7	1,4	1,7	0,9
H2	40	1,7	1,5	1,7	1,0
H2	41	1,7	1,1	1,7	0,9
H2	42	1,4	0,9	1,5	0,9

Tabla 5.59. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie A2, campaña 2005-2006.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
A2	48	1,5	1,1	1,5	1,1
A2	43	1,5	0,4	1,5	0,6
A2	46	1,5	1,5	1,5	1,1
A2	45	1,6	1,8	1,6	0,6
A2	44	1,5	1,6	1,5	0,7
A2	47	1,5	1,2	1,5	0,9

Tabla 5.60. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie G2, campaña 2005-2006.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
G2	49	1,5	1	1,5	1,0
G2	50	1,4	0,9	1,4	1,1
G2	51	1,4	1,5	1,4	1,0
G2	52	1,5	1	1,5	0,8
G2	53	1,5	1	1,5	0,7
G2	54	1,5	1,1	1,4	1,0
G2	55	1,5	1	1,5	1,2
G2	56	1,4	1,5	1,4	1,0
G2	57	1,5	2	1,5	0,9
G2	58	1,5	1,1	1,4	0,8
G2	59	1,5	1	1,5	1,2
G2	60	1,6	1	1,5	0,9
G2	61	1,6	1,1	1,5	1,0
G2	63	1,5	1,8	1,5	1,3

Tabla 5.61. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie H3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
H3	1	1,5	0,9	1,6	1,1
H3	2	1,6	1,5	1,5	0,9
H3	3	1,5	1	1,5	0,9
H3	4	1,6	1,3	1,5	1,0
H3	5	1,5	0,9	1,5	0,9
H3	6	1,6	1,1	1,6	0,9
H3	7	1,5	1,4	1,5	0,7
H3	8	1,5	1,5	1,5	1,1
H3	9	1,5	0,7	1,6	1,0
H3	10	1,6	1,1	1,5	1,2
H3	11	1,5	0,8	1,5	1,0
H3	12	1,6	0,8	1,7	0,9
H3	13	1,5	1,8	1,6	0,9
H3	14	1,5	1,2	1,5	0,8
H3	15	1,5	1,4	1,5	0,7
H3	16	1,5	1,2	1,5	1,3
H3	17	1,5	1,6	1,5	0,9
H3	18	1,6	1,4	1,6	1,0
H3	19	1,6	1,2	1,6	0,9
H3	20	1,6	1	1,7	0,9
H3	21	1,9	1,1	1,5	1,4
H3	22	1,6	1,4	1,6	0,9
H3	23	1,7	1	1,7	1,0
H3	24	1,6	2	1,5	1,0
H3	25	1,6	1,1	1,6	0,8
H3	26	1,6	1,3	1,6	1,3
H3	27	1,6	1,5	1,6	1,0
H3	28	1,6	1,4	1,6	1,0
H3	29	1,6	1,6	1,6	1,1
H3	30	1,6	1,3	1,6	0,6
H3	31	1,6	1,6	1,5	0,9
H3	32	1,6	1,3	1,6	1,0
H3	33	1,7	1,2	1,7	0,8
H3	34	1,6	1,1	1,7	1,0
H3	35	1,6	1	1,6	1,0
H3	36	1,6	1,2	1,6	1,0

H3	37	1,7	0,9	1,7	1,1
H3	38	1,7	1,2	1,7	1,0
H3	39	1,7	1,2	1,7	0,9
H3	40	1,6	1,2	1,6	1,0
H3	41	1,7	1,5	1,6	0,9
H3	42	1,5	1,3	1,6	1,1
H3	43	1,6	1	1,7	1,3
H3	44	1,7	1,4	1,6	1,1
H3	45	1,6	1,2	1,5	1,0
H3	46	1,5	1,3	1,5	1,1

Tabla 5.62. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie A3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
A3	48	1,5	1,2	1,5	1,1
A3	50	1,5	1,1	1,5	0,8
A3	51	1,4	1,4	1,5	0,9
A3	52	1,6	1	1,5	1,0
A3	53	1,4	1,6	1,4	0,8
A3	47	1,5	1,3	1,6	1,0

Tabla 5.63. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie G3, campaña 2006-2007.

Serie	RI	Carbonílica		C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
GT3	56	1,6	1	1,5	0,9
GT3-S	57	1,5	1	1,5	1,1
GT3-R	58	1,5	1	1,6	1,2
GT3-S	59	1,4	1,1	1,4	0,7
GT3-R	60	1,4	1	1,6	0,8
G3	61	1,5	1,5	1,4	0,9
G3	62	1,5	1,2	1,5	0,7

Tabla 5.64. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie H4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
H4	1	1,5	1,8	1,5	0,8
H4	3	1,6	0,9	1,5	0,9

H4	5	1,5	1	1,6	0,9
H4	10	1,5	1	1,5	0,9
H4	12	1,7	1,6	1,7	0,9
H4	13	1,5	1,1	1,5	1,2
H4	14	1,5	0,7	1,5	0,8
H4	15	1,5	1,3	1,5	1,3
H4	19	1,6	0,7	1,6	0,9
H4	21	1,5	0,9	1,5	0,9
H4	22	1,7	1	1,7	1,0
H4	23	1,7	1	1,6	1,1
H4	24	1,7	1	1,7	0,8
H4	25	1,6	0,9	1,8	0,9
H4	26	1,7	1,1	1,7	0,8
H4	30	1,7	0,8	1,7	0,8
H4	31	1,6	1,3	1,7	0,8
H4	32	1,6	1,2	1,6	1,1
H4	36	1,6	1,3	1,6	0,8
H4	42	1,6	1,4	1,6	0,8
H4	44	1,7	1,1	1,7	0,9

Tabla 5.65. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie DO4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
DO4	1	1,5	0,8	1,5	1,0
DO4	2	1,5	1,1	1,5	0,9
DO4	3	1,4	1,8	1,5	0,8
DO4	4	1,5	1,5	1,4	0,8
DO4	14	1,6	0,8	1,6	1,1
DO4	15	1,6	0,9	1,5	0,9
DO4	16	1,5	1	1,6	0,8
DO4	17	1,6	1,8	1,5	1,1
DO4	18	1,6	1,3	1,5	0,7
DO4	19	1,5	1,1	1,6	1,1
DO4	20	1,7	1,3	1,6	0,8
DO4	21	1,6	1	1,6	0,8
DO4	22	1,5	0,8	1,6	0,9
DO4	23	1,5	1,1	1,6	0,8
DO4	24	1,6	1	1,6	0,7
DO4	25	1,6	0,7	1,5	1,0

DO4	26	1,5	1	1,5	0,8
-----	----	-----	---	-----	-----

Tabla 5.66. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie G4, campaña 2007-2008.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
G4	1	1,3	1	1,4	0,9
G4	2	1,4	0,7	1,3	1,0
G4	3	1,4	1	1,4	1,0
G4	4	1,4	0,9	1,3	1,0
G4	5	1,5	1,7	1,4	1,2
G4	6	1,4	1	1,3	0,9
G4	7	1,5	0,9	1,5	1,0
G4	8	1,4	1,2	1,3	1,0
GT4-S	9	1,7	1,1	1,7	1,2
GT4-R	10	1,7	1	1,6	1,0
GT4-R	11	1,5	0,7	1,5	0,8
GT4-S	12	1,5	1	1,5	0,9
GT4-S	13	1,5	1,3	1,5	0,9

Tabla 5.67. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie H5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
H5	1	1,6	1,1	1,6	0,9
H5	3	1,6	1	1,6	0,7
H5	5	1,5	0,9	1,6	1,2
H5	10	1,5	0,8	1,6	1,0
H5	12	1,7	0,9	1,7	1,2
H5	13	1,6	1	1,6	0,9
H5	14	1,5	1,2	1,5	0,8
H5	15	1,6	1,1	1,6	0,8
H5	19	1,6	1	1,6	0,9
H5	21	1,5	1,1	1,5	0,9
H5	22	1,5	1,4	1,5	0,7
H5	23	1,5	1,3	1,6	0,9
H5	24	1,6	1,5	1,6	0,8
H5	25	1,5	0,7	1,7	0,8
H5	26	1,6	0,6	1,7	0,7
H5	30	1,6	0,6	1,6	0,6

H5	31	1,5	1,2	1,6	1,0
H5	32	1,6	0,8	1,7	0,9
H5	36	1,6	0,8	1,7	0,8
H5	42	1,5	0,8	1,7	0,8
H5	44	1,6	0,8	1,6	0,8

Tabla 5.68. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie G5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
G5	2	1,4	1,3	1,4	1,1
G5	3	1,5	1	1,4	1,1
G5	5	1,4	1,4	1,4	1,2
G5	6	1,4	0,7	1,4	0,8
G5	8	1,4	1	1,4	1,0

Tabla 5.69. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie DO5, campaña 2008-2009.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
DO5	1	1,5	1,1	1,5	0,8
DO5	2	1,5	1	1,5	0,8
DO5	3	1,5	1,6	1,5	0,9
DO5	4	1,4	0,9	1,4	0,9
DO5	6	1,6	1,4	1,5	0,8
DO5	7	1,5	1,7	1,5	1,0
DO5	8	1,5	1,3	1,5	0,7
DO5	9	1,6	1,4	1,5	1,2
DO5	10	1,5	1,3	1,5	0,9
DO5	11	1,5	1,2	1,5	0,9
DO5	14	1,6	1	1,6	0,6
DO5	15	1,6	1,3	1,5	0,5
DO5	16	1,6	1	1,5	0,8
DO5	17	1,5	1,2	1,5	1,1
DO5	18	1,6	1,7	1,5	0,8
DO5	19	1,7	1,5	1,6	1,0
DO5	20	1,6	1,1	1,7	0,8
DO5	21	1,6	1,4	1,6	0,8
DO5	23	1,7	1,1	1,7	0,8
DO5	24	1,6	1,4	1,7	0,8

DO5	27	1,6	1,3	1,5	1,0
DO5	28	1,6	1	1,6	0,8
DO5	29	1,5	1,5	1,5	1,5
DO5	30	1,6	1,1	1,6	1,3
DO5	31	1,6	1,7	1,7	0,8
DO5	32	1,5	1,6	1,5	1,4

Tabla 5.70. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie H6, campaña 2009-2010.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
H6	1	1,5	1,2	1,5	0,8
H6	3	1,5	1	1,5	1,0
H6	10	1,5	1,1	1,5	1,3
H6	14	1,4	1,4	1,5	1,0
H6	15	1,4	1,7	1,4	0,8
H6	19	1,4	1,8	1,5	0,7
H6	21	1,5	1,4	1,5	1,0
H6	22	1,5	0,8	1,6	0,7
H6	23	1,6	1,3	1,6	1,3
H6	24	1,5	0,9	1,5	0,8
H6	25	1,6	1,5	1,6	0,9
H6	26	1,6	1,7	1,6	1,3

Tabla 5.71. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie DO6, campaña 2009-2010.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
DO6	1	1,6	1	1,5	1,1
DO6	2	1,5	0,9	1,6	0,9
DO6	3	1,5	1,2	1,5	0,9
DO6	4	1,5	0,9	1,5	0,9
DO6	5	1,5	1,1	1,6	0,8
DO6	10	1,5	1,2	1,5	1,3
DO6	11	1,5	1,4	1,5	0,8
DO6	12	1,5	0,8	1,5	0,9
DO6	13	1,6	2,1	1,6	1,4
DO6	14	1,7	1,2	1,6	1,1
DO6	15	1,5	0,7	1,5	1,0

DO6	16	1,5	1	1,6	1,0
DO6	17	1,5	1,1	1,5	0,9
DO6	18	1,5	1,1	1,4	0,9
DO6	20	1,5	0,9	1,4	1,2
DO6	21	1,6	0,9	1,6	1,0
DO6	22	1,5	1,1	1,5	1,0
DO6	23	1,5	1	1,6	0,8
DO6	24	1,6	1,7	1,6	1,1
DO6	27	1,5	1,2	1,5	1,3
DO6	28	1,5	1,4	1,5	1,2
DO6	29	1,5	1	1,5	1,1
DO6	31	1,7	1,2	1,5	1,0
DO6	33	1,5	1	1,5	1,1
DO6	34	1,5	1,8	1,5	1,6
DO6	35	1,6	1,4	1,6	1,3
DO6	36	1,5	2,3	1,5	1,0
DO6	37	1,6	1,1	1,6	0,6
DO6	38	1,5	0,8	1,5	1,0

Tabla 5.72. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie H7, campaña 2010-2011.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
H7	1	1,7	1,3	1,7	0,8
H7	3	1,7	1	1,6	0,7
H7	10	1,5	1,8	1,5	0,7
H7	14	1,6	0,2	1,6	1,0
H7	15	1,7	0,1	1,7	0,7
H7	19	1,6	1,9	1,6	0,7
H7	21	1,5	1,2	1,5	0,8
H7	22	1,7	1,1	1,5	0,6
H7	23	1,6	0	1,5	0,9
H7	24	1,6	-	1,6	0,8
H7	25	1,6	0,8	1,6	1,0
H7	26	1,6	-	1,5	0,8

Tabla 5.73. Comparación de los valores r_1 y r_2 calculados en la zona carbonílica y en la zona C9, para muestras de la serie DO7, campaña 2010-2011.

Serie	RI	Zona Carbonílica		Zona C9	
		r_1	r_2	r_1	r_2
DO7	1	1,5	1	1,5	0,8
DO7	2	1,6	0,9	1,6	0,8
DO7	3	1,5	2,2	1,4	0,6
DO7	4	1,5	0,9	1,5	0,7
DO7	14	1,7	1,4	1,7	0,7
DO7	15	1,6	1,2	1,7	0,7
DO7	16	1,5	1,2	1,6	0,7
DO7	17	1,6	1	1,6	0,7
DO7	18	1,5	0,9	1,6	0,8
DO7	20	1,7	1,1	1,7	0,7
DO7	21	1,7	1,5	1,6	0,7
DO7	22	1,5	1,1	1,5	0,7
DO7	23	1,6	0,7	1,5	0,7
DO7	24	1,6	1,4	1,6	0,7
DO7	25	1,7	0	1,6	0,8
DO7	26	1,9	0	1,7	0,8
DO7	27	1,7	1,8	1,7	0,7
DO7	29	1,5	1,4	1,5	0,7
DO7	31	1,5	-	1,5	0,8

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los distintos estudios han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1) En lo que respecta a los estudios mediante la técnica IRMS:

- Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los aceites estudiados oscilan entre -31,5 y -26,4‰. Los de $\delta^{18}\text{O}$ se encuentran entre 20,9 y 27,9‰ y los de $\delta^2\text{H}$ entre -153 y -130‰. Se observa, por tanto, que el intervalo de variación es menor para el carbono que para los otros dos isótopos.
- Los valores de desviación estándar fueron de 0,1, 0,3 y 3‰, para carbono, oxígeno e hidrógeno, respectivamente. Estos valores mejoran los aconsejados para la técnica.
- La *variedad* es un factor muy importante en los valores de distribuciones isotópicas, principalmente, en los de carbono y oxígeno. Si fijamos el entorno geográfico y el año de cosecha (2004-2005), en muestras de Córdoba se presentan las siguientes tendencias:

$$\delta^{13}\text{C Arbecuina} < \delta^{13}\text{C Picual} < \delta^{13}\text{C Hojiblanca}$$

Dicha tendencia también se cumple en muestras de Tarragona, para un mismo año de cosecha.

$$\delta^{18}\text{O Arbecuina} < \delta^{18}\text{O Picual} < \delta^{18}\text{O Hojiblanca}$$

- Estudios de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ para aceites vegetales y aceites de oliva, mostraron, en general, un mayor poder de discriminación entre especies según el contenido en oxígeno, a excepción del caso del aceite de maíz que, dado a su diferente vía

biosintética (ciclo C4 frente a la ruta C3 seguida por el resto de especies vegetales estudiadas), se diferencia muy bien mediante análisis isotópico de carbono.

- El análisis mediante $\delta^{13}\text{C}$ de muestras correspondientes a *diferentes campañas*, puso de manifiesto la influencia de factores climáticos en el contenido isotópico.
- El *aporte del riego* también parece influir en el contenido de $\delta^{13}\text{C}$, ya que las plantas sometidas a estrés hídrico cerrarán sus estomas, enriqueciéndose en $\delta^{13}\text{C}$.
- No existe una relación entre el contenido en ácidos grasos (determinado mediante cromatografía gaseosa) y el contenido isotópico en carbono, lo que pone de manifiesto la complementariedad de las técnicas.
- Una comparación de los valores isotópicos de hidrógeno, oxígeno y carbono para muestras de aceites andaluces e italianos de cuatro zonas diferentes, correspondientes a la campaña 2005-2006 puso de manifiesto la posibilidad de distinguir entre ambos tipos de aceites, lo cual resulta interesante con vistas a proteger denominaciones de origen.

2) En lo que se refiere a las técnicas de infrarrojo (NIR y MIR):

- Se han desarrollado métodos estadísticos de regresión PLS para determinar el perfil de ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA, utilizando cromatografía de gases como técnica de referencia. Para ello se han analizado matrices de datos NIR, MIR y NIR-MIR concatenadas. Como conclusión, se ha de decir que la mejor estimación de la calibración o ajuste y validación o predicción se obtiene a partir de los datos NIR para un menor número de factores PLS y de los datos MIR para un número de factores mayor. Esto es importante a tener en cuenta, ya

que los programas quimiométricos tienen un criterio de parada implementado para determinar el número de factores PLS.

- Se han llevado a cabo estudios mediante espectroscopia NIR de aceite de la DOP Estepa mezclado con otros aceites vegetales (avellana, lino, girasol o maíz) en diferentes proporciones. Se han desarrollado modelos de regresión PLS para predecir el contenido en ácidos grasos de las diferentes mezclas, con coeficientes de determinación, R^2 , muy próximos a 1.

3) Para el caso de espectroscopia Raman:

- Se ha empleado regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) para determinar la información cualitativa (campaña de recogida, variedad de aceituna empleada, procedencia del aceite o DOP) y cuantitativa (contenido en ácidos grasos) que proporcionan los espectros Raman. Para las variables cuantitativas se han propuesto modelos de regresión para predecir, de manera independiente, el contenido en ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA, mientras que para las variables cualitativas se empleó análisis discriminante. En el caso de la variable *campaña*, todos los casos de las campañas 1 y 6 fueron clasificados correctamente, siendo los porcentajes de clasificación para las campañas 2, 3, 4 y 5 de 86,6; 98,4; 91,3 y 93,4%, respectivamente. Para la variable *variedad*, los porcentajes de clasificación correcta fueron del 84,2; 100; 80,8 y 85%, para las variedades Frantoio, Gordal, Hojiblanca y Picual, respectivamente. Para la variable *procedencia*, los casos de Málaga, Jaén y Sevilla fueron clasificados correctamente en un 95,3; 90 y 70%. Por último, *con respecto a la DOP*, los aceites de Lucena, Montoro-Adamuz y Priego de Córdoba fueron clasificados correctamente en 84,2; 89,5 y 80% de los casos. En

el caso de la variable cuantitativa, se obtiene el menor error, tanto en ajuste como en predicción, en el caso de ácidos grasos MUFA, seguidos de SAFA y PUFA, estando los errores muy próximos a 0 en todos los casos.

4) En lo que respecta a la espectroscopia RMN:

- En el estudio de ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA, mediante ^1H RMN, se ha aplicado análisis de la varianza multivariante, estudiándose cómo influyen las variables categóricas Campaña y DOP sobre ellos, poniéndose de manifiesto que el factor *campaña* afecta al contenido de ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA, pero el factor *DOP* influye únicamente en el contenido de ácidos SAFA y MUFA, pero no en PUFA. Las campañas de recogida de la aceituna 2007/08 y 2008/09 son las más diferentes con respecto al contenido en ácidos MUFA y PUFA, puesto que el contenido en ácidos SAFA no muestra diferencias significativas por campañas, mientras que las denominaciones de origen de Antequera y Estepa son las que más difieren en el contenido en ácidos SAFA, Estepa y Sierra de Cazorla son las más diferentes en el contenido en ácidos MUFA, y el contenido en ácidos PUFA distingue fundamentalmente a la denominaciones de Estepa y Poniente de Granada.
- Se ha evidenciado la complementariedad de los espectros de carbono e hidrógeno. Así, la RMN de ^{13}C no detecta el ácido linolénico, por tener un contenido inferior al 1%, mientras que en RMN de ^1H , aparece como un triplete perfectamente diferenciado. Sin embargo, la distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1,3 y 2 del glicerol sólo es posible por RMN ^{13}C y los ácidos

grasos vaccénico y gadoleico se pueden cuantificar muy bien en distintas zonas del espectro de Carbono.

- Si se observan las relaciones entre los ácidos grasos oleico y linoleico en las posiciones 1,3 y 2 del glicerol en las zonas carbonílica y zona C9, los valores son muy similares para el oleico pero difieren para el linoleico.
- Un estudio de la zona carbonílica de aceites de distinta procedencia vegetal, permite apreciar diferencias con respecto a los de oliva.
- Se ha estudiado el perfil de ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA mediante el espectro de protón y de carbono de diferentes aceites de DOPs andaluzas, analizándose en este último tres zonas diferentes (carbonílica, C16 y carbonos alifáticos), determinándose los errores cuadráticos medios y realizándose cuatro estimaciones diferentes. Se ha puesto de manifiesto que la zona carbonílica es la más importante en la determinación de ácidos grasos SAFA, siendo la de C16 fundamental en la determinación de ácidos grasos PUFA. Sin embargo, en la determinación de ácidos MUFA existen diferencias por DOP: en Estepa, Sierra de Cazorla, Priego de Córdoba o Montoro-Adamuz tiene un peso superior la zona C16 mientras que en Poniente de Granada o Antequera es la zona correspondiente a los carbonos alifáticos la que tiene asociado un peso superior en la estimación de ácidos MUFA. Estos resultados se generalizan mediante validación cruzada, confirmándose las conclusiones anteriores.

5) Los resultados encontrados han puesto de manifiesto la complementariedad de la información proporcionada por las diferentes técnicas, especialmente de IRMS frente a las otras (RMN, IR y Raman). No obstante, tal y como se apunta al final del capítulo 1, no existe una técnica absoluta que nos proporcione toda la información acerca del

Capítulo 6

aceite. En este sentido, la tendencia actual es la aplicación de diferentes técnicas instrumentales por lo que esta base de datos puede contribuir a aportar su granito de arena con vistas a proteger denominaciones de origen y evitar fraudes en un producto como el aceite de oliva, clave en España en general y Andalucía en particular.

CAPÍTULO 7: PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

ÍNDICE

Comunicación 1. <i>Aplicaciones de las técnicas de espectrometría de masas de isótopos estables a la diferenciación de denominaciones de origen de aceites andaluces.....</i>	369
Comunicación 2. <i>Modelos de regresión lineal múltiple para predecir el contenido en diversos ácidos del aceite usando los datos del espectro NIR.....</i>	381
Comunicación 3. <i>Aplicación de técnicas de análisis multivariante a los espectros RMN del 1H del aceite de oliva.....</i>	385
Comunicación 4. <i>Aplicación de la técnica IRMS a la trazabilidad de aceites de oliva andaluces.....</i>	399
Comunicación 5. <i>Trazabilidad de aceites de oliva andaluces mediante la aplicación de la técnica IRMS.....</i>	405
Comunicación 6. <i>Estudio comparativo de ácidos grasos obtenidos por RMN (1H y ^{13}C) en aceites de oliva andaluces.....</i>	411
Comunicación 7. <i>Characterisation and classification of Andalusian extra-virgin olive oils by using NMR and IR spectral data.....</i>	423
Publicación 1. <i>A Nuclear Magnetic Resonance (1H and ^{13}C) and isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}C$, δ^2H and $\delta^{18}O$) study of Andalusian olive oils.....</i>	429
Publicación 2. <i>Química del aceite de oliva: trazabilidad y desarrollo sostenible.....</i>	441
Publicación 3. <i>New insights into evaluation of regression models through a decomposition of the prediction errors: application to near-infrared spectral data.....</i>	447
Publicación 4. <i>New approaches in the chemometric analysis of IR spectra of extra-virgin olive oils.....</i>	471

CAPÍTULO 7.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

A continuación se muestran los artículos y comunicaciones a congresos derivados de la presente Tesis Doctoral:

- Comunicación 1. *Aplicaciones de las técnicas de espectrometría de masas de isótopos estables a la diferenciación de denominaciones de origen de aceites andaluces*. Expoliva 2009. XIV Feria Internacional del Oliva e Industrias Afines. Jaén, 13-15 Mayo 2009.
- Comunicación 2. *Modelos de regresión lineal múltiple para predecir el contenido en diversos ácidos del aceite usando los datos del espectro NIR*. XII Conferencia Española de Biometría. Cádiz, 23 Septiembre 2009.
- Comunicación 3. *Aplicación de técnicas de análisis multivariante a los espectros RMN del ^1H del aceite de oliva*. Expoliva 2011 - XV Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines. Jaén, 11 Mayo de 2011.
- Comunicación 4. *Aplicación de la técnica IRMS a la trazabilidad de aceites de oliva andaluces*. I Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación. Córdoba, 8-9 mayo 2012.
- Comunicación 5. *Trazabilidad de aceites de oliva andaluces mediante la aplicación de la técnica IRMS*. XXIII Reunión Nacional de Espectroscopia. Córdoba, 20 septiembre 2012.
- Comunicación 6. *Estudio comparativo de ácidos grasos obtenidos por RMN (^1H y ^{13}C) en aceites de oliva andaluces*. XVI Simposium Científico-Técnico de Expoliva. Jaén, 9 mayo 2013.
- Comunicación 7. *Characterisation and classification of Andalusian extra-virgin olive oils by using NMR and IR spectral data*. XIV Conferencia Española de Biometría. Ciudad Real, 23 mayo 2013.
- Publicación 1. M. A. Aramendía, A. Marinas, J.M. Marinas, E. Sánchez, F.J. Urbano, C. Guillou, J.M. Moreno Rojas, M. Moalem y L. Rallo. *A Nuclear Magnetic Resonance (^1H and ^{13}C) and isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$,*

- δ^2H and $\delta^{18}O$) study of Andalusian olive oils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24 (2010) 1457–1466.
- Publicación 2. A. Marinas, E. Sánchez López, J. Hidalgo Carrillo, M.I. Sánchez, M.A. Aramendía, J.M. Marinas, F.J. Urbano. *Química del aceite de oliva: trazabilidad y desarrollo sostenible*. Alimentación, Equipos y Tecnología, Número 252, 2010, págs. 39-43.
 - Publicación 3. M.I. Sánchez-Rodríguez, E. Sánchez-López, J.M. Caridad, A. Marinas, J.M. Marinas, F.J. Urbano. *New insights into evaluation of regression models through a decomposition of the prediction errors: application to near-infrared spectral data*. *Statistics and Operations Research Transactions, SORT* 37 (1) January-June 2013, 57-78.
 - Publicación 4. M.I. Sánchez-Rodríguez, E. Sánchez-López, A. Marinas, J.M. Caridad, J.M. Marinas, F.J. Urbano. *New approaches in the chemometric analysis of IR spectra of extra-virgin olive oils*. *Statistics and Operations Research Transactions, SORT*, en prensa.

Comunicación 1

Aplicaciones de las técnicas de espectrometría de masas de isótopos estables a la diferenciación de denominaciones de origen de aceites andaluces.

XIV Feria Internacional del Oliva e Industrias Afines. Expoliva.

Jaén, 13-15 Mayo 2009.

Comunicación Oral/Póster

APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ISÓTOPOS ESTABLES A LA DIFERENCIACIÓN DE DENOMINACIONES DE ORIGEN DE ACEITES ANDALUCES.

M.A. Aramendía, V. Borau, J.M. Marinas, A. Marinas*, L. Rallo, E.M. Sánchez-Lopez, F. Urbano.

Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, 14014 Córdoba. España. (*): e-mail: qo2maara@uco.es

FORO DE LA INDUSTRIA OLEÍCOLA, TECNOLOGÍA Y CALIDAD.

RESUMEN:

En este trabajo se resumen los resultados de cuatro años de estudio sobre la aplicación de la técnica de Espectrometría de Masas de Isótopos Estables a muestras de aceites de oliva virgen extra andaluces de cuatro campañas. Se analiza la influencia que factores tales como variedad, índice de madurez, temperatura, altitud, latitud, distancia al mar, regadío o secano, tienen sobre las distribuciones isotópicas encontradas. Se discute la diferenciación mediante estas técnicas de aceites andaluces e italianos y se hace un análisis preliminar, que deberá comprobarse en campañas sucesivas, sobre la aplicación de estas técnicas para diferenciar Denominaciones de Origen de aceites andaluces.

Palabras clave: *Espectrometría de masas de isótopos estables. Aceite de oliva virgen.*

APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ISÓTOPOS ESTABLES A LA DIFERENCIACIÓN DE DENOMINACIONES DE ORIGEN DE ACEITES ANDALUCES.

M. A. Aramendía, V. Borau, J. M. Marinas, A. Marinas*, L. Rallo, E. M. Sánchez-López, F. Urbano.

Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, 14014 Córdoba. España. (*): e-mail: qo2maara@uco.es

1. INTRODUCCIÓN.

La técnica "SIRMS" (en ocasiones conocida como IRMS) constituye una variante de la Espectrometría de Masas que tiene por objeto la medida, con una alta exactitud y precisión, de las variaciones en la abundancia isotópica natural de los isótopos estables ligeros de C, O, H, N, S en muy diversos tipos de muestras. Dichas variaciones son atribuibles al llamado "fraccionamiento isotópico".

El fraccionamiento ocurre debido a que, aunque los isótopos de un mismo elemento tienen las mismas propiedades químicas, difieren en sus propiedades físicas y físico-químicas, al poseer diferente masa. De este modo, las moléculas que contengan el isótopo pesado de un determinado elemento, comparadas con las portadoras del isótopo ligero, tendrán diferente peso, volumen, punto de ebullición, velocidad de reacción, etc. En consecuencia, se habla de enriquecimiento o empobrecimiento isotópico, en procesos naturales de evaporación, precipitación, filtración, etc., así como en las reacciones catalizadas por diversas enzimas en las diferentes rutas fotosintéticas. Por ejemplo, analizando la composición en oxígeno de muestras acuosas procedentes de regiones de diferente climatología, se observará una mayor relación $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ en las muestras de las zonas más cálidas, debido a que se habrá producido una mayor evaporación del isótopo más ligero. Por otro lado, las plantas, según realicen la fijación del CO_2 por el llamado ciclo C3 (o de Calvin), ciclo C4 (o de Hatch-Slack) o CAM, presentarán diferente relación isotópica en carbono. Los valores isotópicos obtenidos mediante la técnica SIRMS se expresan mediante la llamada "notación en delta", expresada en tanto por mil.

$$\delta\text{‰} = \left(\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{patrón}}} - 1 \right) \bullet 1000$$

$$\text{A su vez, } R = \frac{\% \text{isótopo pesado}}{\% \text{isótopo ligero}}$$

Como patrón, se suele emplear el VSMOW (valor medio del oxígeno en agua oceánica) para el oxígeno y la VPDB (Belemnita de Pee Dee –un carbonato-) para el carbono. No obstante, existen diversos patrones secundarios referidos a esos patrones fundamentales. Dichos patrones son los que se utilizan para calibrar los gases utilizados como referencia en los experimentos, cuyos valores se han obtenido a partir de los estándares primarios o bien a partir de ejercicios de intercomparación ("ring tests"). El oxígeno vendrá determinada por el valor del agua de lluvia (y si el olivo es irrigado por el valor del agua de riego), así como por el valor del CO_2 fijado mediante el ciclo de Calvin. Por otro lado, a través de las hojas el olivo intercambia oxígeno, mediante el proceso de evotranspiración. En cuanto a la composición en carbono, esta vendrá determinada, fundamentalmente, por el valor del CO_2 fijado en el ciclo de Calvin para la generación de hidratos de carbono.

En resumen, y a igualdad de otros factores, es de esperar que cuanto mayor sea la altura sobre el nivel del mar del olivo, menor sea su contenido en oxígeno-18. Cuanto más desplazado hacia zonas del interior (lejos del mar) menor su contenido en oxígeno-18 y que la composición en oxígeno-18 del aceite sea mayor, cuanto más cálida sea la zona de donde procede.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

La medida de los valores $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ ha sido empleada para establecer la trazabilidad de alimentos tales como vinos, miel o zumos [1-5], pero al comenzar este estudio, rara vez de aceites. Los pocos ejemplos de este último tipo que existían en la bibliografía se refieren a la detección de fraudes por adición de otros aceites vegetales o mezcla con aceites de oliva de menor calidad. Sin embargo, la posibilidad de identificar el origen geográfico de aceites de oliva mediante medida de relaciones isotópicas está muy poco estudiada.

Mediante medidas de valores de $\delta^{13}\text{C}$ se pueden diferenciar grasas provenientes de plantas que siguen los ciclos fotosintéticos C3 de las C4 [6]. El estudio de la fracción de alcoholes alifáticos de los aceites de oliva permitió a Angerosa y col. [7] detectar la adulteración de los mismos con aceite de orujo aún cuando el contenido en éste era de sólo el 5%. Woodbury y col. [8] encontraron que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de diversos aceites vegetales y los de sus correspondientes ácidos grasos individuales eran muy parecidos. Además, aunque la esterificación en la posición 2 del glicerol sigue una ruta enzimática diferente a la de las posiciones 1 y 3, la composición isotópica de los ácidos grasos en cualquiera de las posiciones del glicerol es idéntica. Angerosa y col [9] identificaron el origen geográfico de varios aceites de oliva representando los valores $\delta^{18}\text{O}$ en función de los $\delta^{13}\text{C}$ tanto para los aceites globales como para sus fracciones de esteroides y alcoholes lineales. Las tendencias más recientes en la detección de la adulteración y del origen geográfico de los alimentos, se inclinan por el empleo simultáneo de la determinación de las relaciones isotópicas de carbono y oxígeno mediante la técnica SIRMS y de la composición isotópica de hidrógeno en diferentes partes de la molécula mediante la técnica SNIF-NMR (De este modo, en esta memoria nos planteamos desarrollar un método para la determinación de la abundancia isotópica $\delta^{18}\text{O}$ en aceites de oliva y explorar la posibilidad de aplicar la técnica SIRMS par discriminar entre las crecientes Denominaciones de Origen de aceite de oliva en Andalucía).

3.-TOMA DE MUESTRAS Y NOMENCLATURA DE LAS MISMAS PARA EL PRESENTE ESTUDIO.

Se pretende disponer de muestras representativas de aceites andaluces de varias campañas agrícolas con trazabilidad garantizada y aseguramiento de pureza varietal y el mismo entorno climático (bancos de Germoplasma de Córdoba -series G- y banco de Germoplasma de Tarragona -series GT-), multivarietales con una variedad predominante, 'Hojiblanca' o 'Picual' (muestras procedentes de la Cooperativa Hojiblanca -Series H- y de distintas Denominaciones de Origen -Series DO-) y muestras de la variedad 'Picual' cultivadas a distintas altitudes, entre 117m y 935m, (-Series A-). Las muestras de aceites vegetales distintos a los aceites de oliva son denominadas como Serie V. Dado que a todos los aceites se les realiza estudios de RMN de ^1H y ^{13}C , y de espectroscopias NIR y RAMAN, esperamos contar con una buena base de datos de aceites andaluces con vistas a la caracterización de Denominaciones de Origen protegidas.

Se han recogido muestras de las campañas 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007 2007-2008 y 2008-2009. A estas campañas les hemos asignado los números 1, 2, 3 4, y 5 respectivamente. Tal como se ha dicho anteriormente, a las variedades procedentes del banco de Germoplasma de Córdoba se les ha asignado la letra G, a las del banco de Germoplasma de Tarragona las letras GT, a las suministradas por el Grupo Hojiblanca la H, a las de variedad 'Picual' procedentes de altitudes entre 117m y 935m la A y a las de distintas Denominaciones de Origen le corresponde DO. Además, en la campaña 1 se estudiaron variedades procedentes de Siria (S) y de Estepa (Sevilla) (E), así como algunos aceites vegetales (V). De este modo, cada serie vendrá definida por la inicial correspondiente seguida del número de la campaña a la que pertenezca (Serie H2: corresponde a muestras del Grupo Hojiblanca y a la campaña 2005-2006).

En las campañas 2004-2005 y 2007-2008 contamos con una ayuda de Consejería. En las restantes campañas no se contó con ninguna ayuda económica de la Consejería. A pesar de lo dicho anteriormente, se tomaron muestras en las campañas 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007, 2007-2008, y 2008-2009.

4.-RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Como resultado de este estudio hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1.-Se han puesto a punto diversas técnicas para la determinación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ con precisiones, expresadas como desviaciones estándar, de 0.1, 0.3 y 3, en tanto por mil, para cada uno de los tres isótopos. Estos resultados mejoran los valores aconsejados en la técnica.

2.- En los estudios con la serie G1 y GT3, tanto para la distribución isotópica del carbono como del oxígeno, se observaron discriminaciones en función de la variedad y de la procedencia, pero no respecto al índice de madurez (Tablas 1 y 2). El análisis de los resultados del carbono puso también de manifiesto que, como corresponde a plantas que siguen el ciclo C3 (o de Calvin), los valores de carbono aparecen en el intervalo entre -27.7 y -30.2‰. En cambio, una muestra de aceite de maíz analizada, dio un valor de -16.6‰, propio de las plantas del ciclo C4. Los valores del oxígeno varían entre 21,4 y 25,3‰. Estudios de $\delta^{18}\text{O}$ de aceites vegetales, parecen poner de manifiesto que éstos poseen valores más bajos que los de los aceites de oliva (Tabla 3).

3.-Si comparamos los resultados para el carbono de las series H2, H3 y H4 se pone de manifiesto que hay diferencias según la climatología del año de la cosecha. Análogos resultados se ponen de manifiesto en el oxígeno para muestras del banco de Germoplasma de dos cosechas diferentes

4.-Si comparamos los valores de $\delta^{18}\text{O}$ de las muestras de la serie H2 [10], se observa un enriquecimiento en el isótopo más pesado con la latitud. No obstante dado que la variedad y el origen geográfico están correlacionados no pueden evaluarse estos factores por separado en la serie.

5.-Para las variedades 'Hojiblanca', 'Picual' y 'Arbequina', si fijamos el entorno geográfico de cultivo y el año de cosecha, en muestras de Córdoba se presentan las siguientes tendencias:

$\delta^{13}\text{C}$ 'Arbequina' < $\delta^{13}\text{C}$ 'Picual' < $\delta^{13}\text{C}$ 'Hojiblanca'.

La tendencia parece mantenerse para muestras de Tarragona de la serie GT3 (Tabla 2) si bien el número de muestras es reducido.

En cuanto al Oxígeno, solo hay datos para muestras de Córdoba, siendo la tendencia:

$\delta^{18}\text{O}$ 'Arbequina' < $\delta^{18}\text{O}$ 'Picual' < $\delta^{18}\text{O}$ 'Hojiblanca'

6.-No se han visto diferencias en cuanto a los valores de $\delta^{13}\text{C}$ para muestras de secano y regadío (Tabla 2). No tenemos aún los resultados del oxígeno.

7.-La influencia de la altitud, series A (Tabla 4), muestra los valores de $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^2\text{H}$ para aceites de muestras de aceitunas de variedad 'Picual' cultivadas en alturas entre 165 a 935 m, y similares latitudes y longitudes. La influencia de la altitud no es regular. En principio, un aumento en altitud conduciría a un aumento del isótopo más ligero en el agua de lluvia. Sin embargo, nuestros resultados muestran una tendencia irregular. Un aumento en altura de 165 a 550 m conduce a una disminución de $\delta^{18}\text{O}$, como se esperaba. Por encima de dicha altura (645 y 935 m), los $\delta^{18}\text{O}$ son más altos y similares entre sí. En cuanto a los otros isótopos los valores de $\delta^{13}\text{C}$ están comprendidos entre -27.9 y -29.5‰. no encontrándose variación regular con la altitud aunque las muestras de la serie A3, muestran exactamente la misma tendencia. Los valores de $\delta^2\text{H}$ oscilan entre -132 y -152‰. Un incremento en altura de 165 a 436 m conduce a una disminución de $\delta^2\text{H}$ como era de esperar. Por encima de dicha altitud, muestras de 550 y 645 m, los valores de $\delta^2\text{H}$ son mayores y similares entre sí, descendiendo nuevamente en la muestra a 935m. No es de extrañar el diferente comportamiento de los valores isotópicos $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$, puesto que la composición isotópica en carbono del aceite viene determinada por la del CO_2 fijado en la fotosíntesis, mientras que la del hidrógeno viene determinada por la del agua y la del oxígeno es función tanto de la del agua como de la del CO_2 .

8.-. No hay una relación simple entre distribución isotópica y composición de ácidos grasos. En este campo profundizaremos más en el futuro.

9- Los otros aceites vegetales estudiados, a excepción del de maíz que es del ciclo del C4 (Tabla 3), presentan valores de $\delta^{13}\text{C}$ similares a los de oliva, pero se pueden diferenciar en los de $\delta^{18}\text{O}$. Esto podría ser interesante para detectar mezclas de aceites vegetales y de oliva.

10.-Para las Denominaciones de Origen Montoro, Antequera y Lucena (Figura 1), contamos con los resultados de distribución isotópica de Carbono y Oxígeno. Puede verse una diferenciación clara entre Antequera y Montoro, pero no con Lucena. También puede diferenciarse representando SAFA / $\delta^{18}\text{O}$ o SAFA/ $\delta^{13}\text{C}$ siendo mejores los resultados para el oxígeno (Figuras 2 y 3).

11.- La comparación de $\delta^{13}\text{C}$ / SAFA para las Denominaciones de Origen de Antequera, Montoro Estepa, Campiñas de Jaén y Poniente de Granada aparece en la Figura 4. No disponemos aún de los datos de oxígeno aunque cabe esperar que mejoren los resultados representando $\delta^{13}\text{C}$ / $\delta^{18}\text{O}$.

12.- En la Figura 5, se comparan los valores medios de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ para las variedades más frecuentes en nuestra comunidad ('Hojiblanca' y 'Picual'), de la campaña 2005-2006, con los

encontrados por F. Camin y colaboradores [11], para aceites italianos de diferentes regiones de la misma campaña. Puede observarse que pueden diferenciarse los aceites de ambos países, siendo los aceites de la región Sur2 los que más se asemejan a los españoles. No obstante, con la ayuda de los tres isótopos, se pueden establecer diferencias entre los aceites españoles e italianos. Creemos pues, que la técnica IRMS puede ser una herramienta útil para diferenciar las Denominaciones de Origen de aceites andaluces.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía y de los Proyectos CTQ2005-04080/BQU (Ministerio de Educación y Ciencia) y FQM 191 (Proyecto de Excelencia de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía), ambos cofinanciados con Fondos FEDER.

5.-BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- J. T. Brenna, T. N. Corso, H. J. Tobias, R. J. Caimi. *Mass Spectrom. Rev.*, Vol: 16 (1997)227.
- 2.- C. M. Scrimgeour. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.*, Vol: 104 (2002)57
- 3.- H.W. Krueger, R.H. Reesman. *Mass Spectrom. Rev.*, Vol: 1 (1982)205.
- 4.- C. Guillou, M. Lipp, B. Radovic, F. Reniero, M. Schmidt, E. Anklam. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, Vol: 49(1999)329.
- 5.- G. Houerou, S.D. Kelly, M.J. Dennis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, Vol: 13 (1999)1257.
- 6.- G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli, F. Reniero, C. Guillou, O. Breas, E. Sada, A. Rossmann, A. Hermann. *J. Agr. Food Chem.*, Vol: 46 (1998)477.
- 7.- F. Angerosa, L. Camera, S. Cumitini, G. Gleixner, F. Reniero. *J. Agr. Food Chem.*, Vol: 45 (1997)3044.
- 8.- S.E. Woodbury, R.P. Evershed, J.B. Rossell. *J. Chromatogr. A*, Vol: 805 (1998)249.
- 9.- F. Angerosa, O. Bréas, S. Contento, C. Guillou, F. Reniero, E. Sada. *J. Agr. Food Chem.*, Vol: 47 (1999)1013.
- 10.- M.A. Aramendía, A. Marinas, J.M. Marinas, J.M. Moreno, M. Moalem, L. Rallo, F.J. Urbano. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (4), pp. 487-496.
- 11.- F. Camin, R. Larcher, M. Perini, L. Bomtempo, D. Bertoldi, G. Gagliano, G. Nicolini, G. Versini. *Food Chemistry* (2008). En prensa, Disponible on-line 1 Mayo 2008.

TABLA 1. Estudio comparativo de $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^2\text{H}$ de muestras del banco de Germoplasma de Córdoba correspondientes a la campaña 2004-2005.

Serie	RI	Variedad	Índice de Madurez	Lugar	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$
G1	25	'Arbequina.'	2	Córdoba	21.6	-30.2	-147
G1	26	'Arbequina'	3	Córdoba	21.4	-29.9	-145
G1	27	'Arbequina'	4	Córdoba	21.8	-29.9	-144
G1	37	'Gordal Vélez Rubio'	2	Córdoba	25.3	-29.8	-135
G1	38	'Gordal Vélez Rubio'	3	Córdoba	24.9	-30.2	-139
G1	39	'Gordal Vélez Rubio'	4	Córdoba	25.2	-29.4	-137
**	68	'Sorani' (Siria)	3	Edleb	23.6	-28.7	-136
**	72	'Sorani'	3.3	Cabra*	23.5	-28.3	-130

**Muestras de la campaña 2003-2004 procedentes de España y Siria de la misma variedad.

*Finca experimental en la provincia de Córdoba.

TABLA 2. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de muestras procedentes del Banco de Germoplasma de Tarragona de la campaña 2006-2007

Serie	RI	Variedad	Origen	$\delta^{13}\text{C}$
GT3	56	'Arbequina'	Mora Ebro	-29.3
GT3-S	57	'Hojiblanca'	Mora Ebro	-27.7
GT3-R	58	'Hojiblanca'	Mora Ebro	-27.8
GT3-S	59	'Picual'	Mora Ebro	-28.2
GT3-R	60	'Picual'	Mora Ebro	-28.1

S=Secano; R=Regadío

TABLA 3. Resultados de $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$ para algunos aceites vegetales comerciales de la campaña 2004-2005.

Serie	RI	Variedad	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{18}\text{O}$
V1	76	Aceite de soja y girasol alto Oleico(Soy Plus- La Española)	-28.5	20.0
V1	77	Aceite de Maíz (Asuna- Koipe)	-16.6	18.0
V1	78	Aceite de Girasol y soja (Sojasol- Koipesol-Koipe)	-28.7	17.9
V1	79	Aceite refinado de Girasol(Fuensol- Mueloliva)	-28.4	19.8

TABLA 4. Estudio comparativo de $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^1\text{H}$ de muestras de la variedad 'Picual' obtenidas a distinta altura, correspondientes a la campaña 2005-2006.

Serie	RI	Variedad	Localización	Latitud	Longitud	Altitud (m)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^2\text{H}$
A2	48	'Picual'	El Carpio(Córdoba)	37°35 N	4°06 O	165	-28.9	26.0	-132
A2	43	'Picual'	Baena(Córdoba)	37°52 N	4°46 O	334	-28.9	25.1	-136
A2	46	'Picual'	Mancha Real(Jaén)	37°47 N	3°36 O	436	-29.5	22.9	-152
A2	45	'Picual'	Martos(Jaén)	37°37 N	4°19 O	550	-27.9	22.5	-139
A2	44	'Picual'	Alcaudete(Jaén)	37°56 N	4°30 O	645	-28.3	24.0	-139
A2	47	'Picual'	Iznalloz(Granada)	37°43 N	3°58 O	935	-28.5	24.2	-145

FIGURA 1. Comparación de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ para algunas Denominaciones de Origen, Campaña 2005-2006

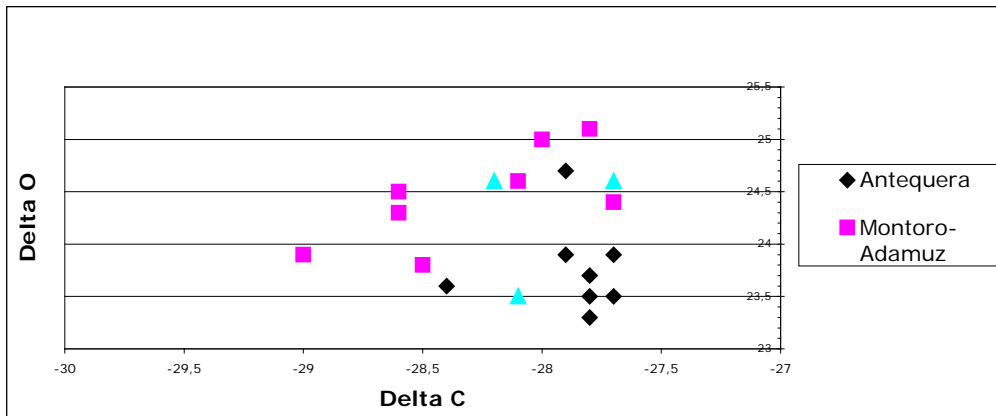


FIGURA 2. Comparación de $\delta^{18}\text{O}$ y SAFA para algunas Denominaciones de Origen, Campaña 2005-2006

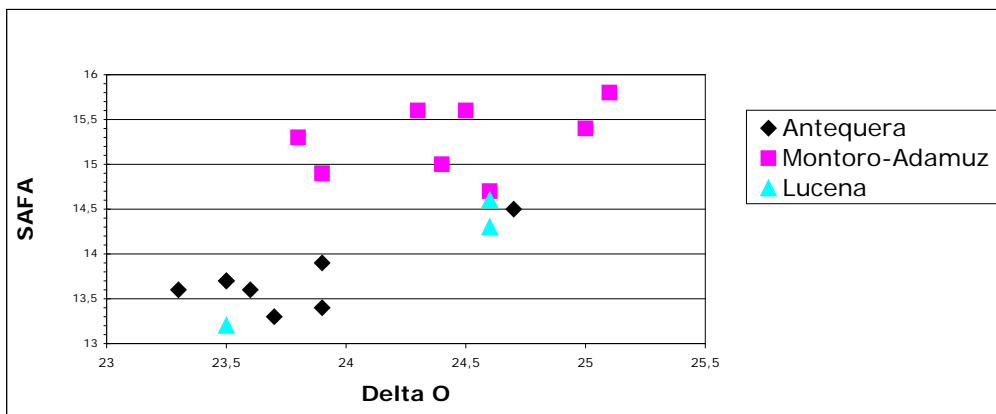


FIGURA 3. Comparación de $\delta^{13}\text{C}$ y SAFA para algunas Denominaciones de Origen, Campaña 2005-2006

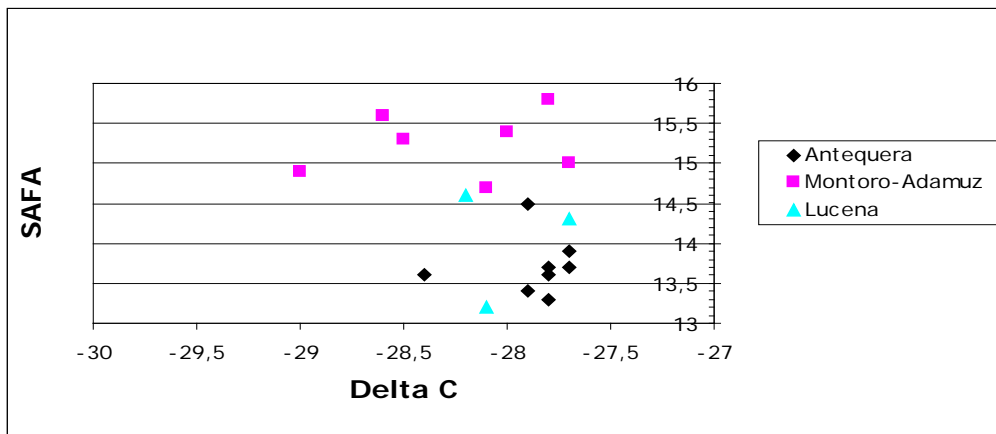


FIGURA 4. Comparación de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ para algunas Denominaciones de Origen, Campaña 2005-2006

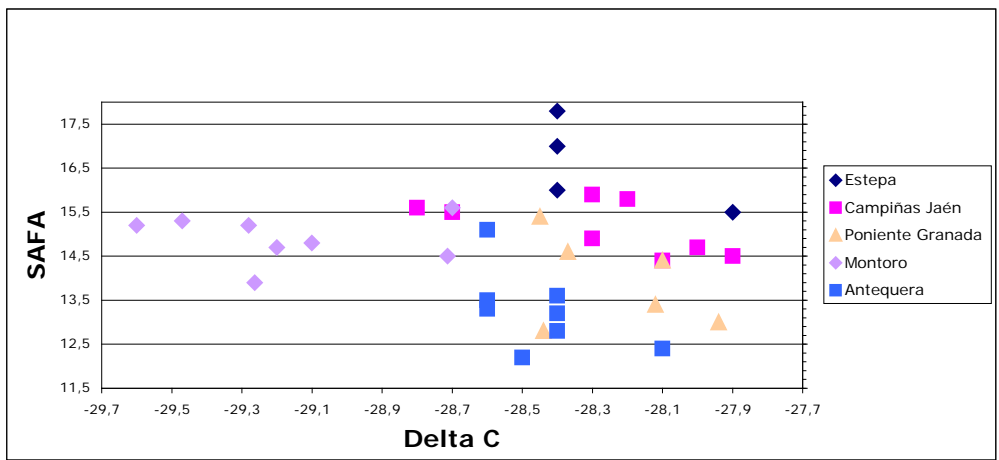
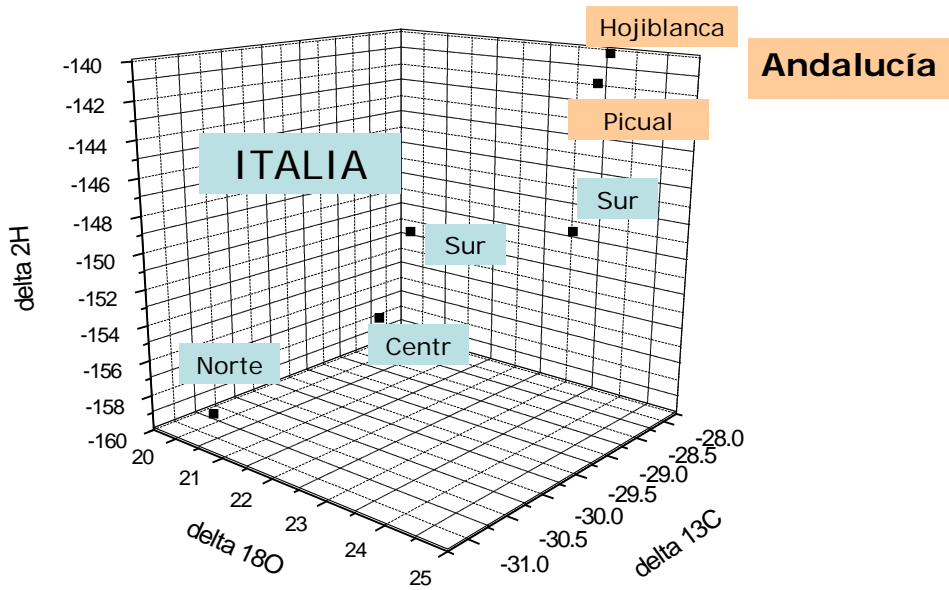


FIGURA 5. Comparación de aceites andaluces e italianos de la misma campaña.

**COMPARACIÓN MEDIA ACEITES
CAMPAÑA 2005/2006**



APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ISÓTOPOS ESTABLES A LA DIFERENCIACIÓN DE DENOMINACIONES DE ORIGEN DE ACEITES ANDALUCES.

M.A. Aramendía, V. Borau, J.M. Marinas, A. Marinas*, L. Rallo, E.M. Sánchez-Lopez, F. Urbano.

Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, 14014 Córdoba. España. (*): e-mail: qo2maara@uco.es



EXPOLINA 2009.
13-15 Mayo, JAÉN.

RESUMEN

En este trabajo se resumen los resultados de cuatro años de estudio sobre la aplicación de la técnica de Espectrometría de Masas de Isótopos Estables a muestras de aceites de oliva virgen extra andaluces de cuatro campañas. Se analiza la influencia que factores tales como variedad, índice de madurez, temperatura, altitud, latitud, distancia al mar, regadío o secano, tienen sobre las distribuciones isotópicas encontradas. Se discute la diferenciación mediante estas técnicas de aceites andaluces e italianos y se hace un análisis preliminar, que deberá comprobarse en campañas sucesivas, sobre la aplicación de estas técnicas para diferenciar Denominaciones de Origen de aceites andaluces.

PARTE EXPERIMENTAL

1.- TOMA DE MUESTRAS.

Se dispone de muestras representativas de aceites andaluces de varias campañas agrícolas con trazabilidad garantizada y aseguramiento de pureza varietal y el mismo entorno climático (banco de Germoplasma de Córdoba -series G- y banco de Germoplasma de Tarragona -series GT-), multivarietales con una variedad predominante, 'Hojiblanca' o 'Picual' (muestras procedentes de la Cooperativa Hojiblanca -Series H- y de distintas Denominaciones de Origen -Series DO-) y muestras de la variedad 'Picual' cultivadas a distintas altitudes, entre 117m y 935m. (-Series A-). Las muestras de aceites vegetales distintos a los aceites de oliva son denominadas como Serie V. Se han recogido muestras de las campañas 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007, 2007-2008 y 2008-2009. A estas campañas les hemos asignado los números 1, 2, 3, 4, y 5 respectivamente. De este modo, cada serie vendrá definida por la inicial correspondiente seguida del número de la campaña a la que pertenece (Serie H2: corresponde a muestras del Grupo Hojiblanca y a la campaña 2005-2006).

2.- RESULTADOS DE RMN DE ¹H DE LAS MUESTRAS DE ACEITE.

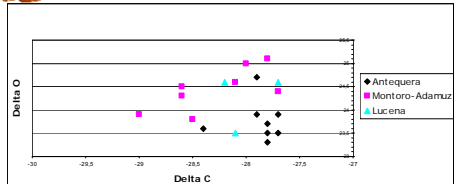
Como resultado de este estudio hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- Se han puesto a punto diversas técnicas para la determinación de los valores de $\delta^{13}C$, $\delta^{18}O$ y δ^2H con precisiones, expresadas como desviaciones estándar, de 0.1, 0.3 y 3, en tanto por mil, para cada uno de los tres isótopos.
- 2.- En los estudios con la serie G1 y GT3, tanto para la distribución isotópica del carbono como del oxígeno, se observaron discriminaciones en función de la variedad y de la procedencia, pero no respecto al índice de madurez (Tablas 1 y 2). El análisis de los resultados del carbono puso también de manifiesto que en plantas que siguen el ciclo C3 (o de Calvin) los valores de carbono aparecen en el intervalo entre -27.7 y -30.2‰. En cambio, una muestra de aceite de maíz analizada, dio un valor de -16.6‰, propio de las plantas del ciclo C4. Los valores del oxígeno varían entre 21.4 y 25.3‰. Estudios de $\delta^{18}O$ de aceites vegetales, parecen poner de manifiesto que éstos poseen valores más bajos que los de los aceites de oliva (Tabla 3).
- 3.- Si comparamos los resultados para el carbono de las series H2, H3 y H4 se pone de manifiesto que hay diferencias según la climatología del año de la cosecha. Análogos resultados se ponen de manifiesto en el oxígeno para muestras del banco de Germoplasma de dos cosechas diferentes
- 4.- Si comparamos los valores de $\delta^{18}O$ de las muestras de la serie H2, se observa un enriquecimiento en el isótopo más pesado con la latitud. No obstante dado que la variedad y el origen geográfico están correlacionados no pueden evaluarse estos factores por separado en la serie.
- 5.- Para las variedades 'Hojiblanca', 'Picual' y 'Arbequina', si fijamos el entorno geográfico de cultivo y el año de cosecha, en muestras de Córdoba se presentan las siguientes tendencias: $\delta^{13}C$ 'Arbequina' < $\delta^{13}C$ 'Picual' < $\delta^{13}C$ 'Hojiblanca'.

La tendencia parece mantenerse para muestras de Tarragona de la serie GT3 (Tabla 2) si bien el número de muestras es reducido. En cuanto al Oxígeno, solo hay datos para muestras de Córdoba, siendo la tendencia: $\delta^{18}O$ 'Arbequina' < $\delta^{18}O$ 'Picual' < $\delta^{18}O$ 'Hojiblanca'

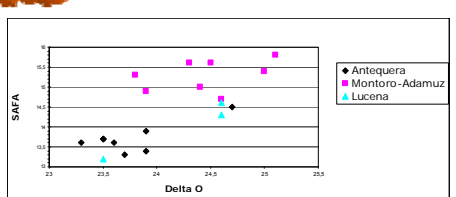
- 6.- No se han visto diferencias en cuanto a los valores de $\delta^{13}C$ para muestras de secano y regadío (Tabla 2).
- 7.- La influencia de la altitud, series A (Tabla 4), muestra los valores de $\delta^{18}O$, $\delta^{13}C$ y δ^2H para aceites de muestras de aceitunas de variedad 'Picual' cultivadas en alturas entre 165 a 935 m, y similares latitudes y longitudes, muestra una tendencia irregular. Un aumento en altura de 165 a 550 m conduce a una disminución de $\delta^{18}O$, como se esperaba. Por encima de dicha altura (645 y 935 m), los $\delta^{18}O$ son más altos y similares entre sí. En cuanto a los otros isótopos los valores de $\delta^{13}C$ están comprendidos entre -27.9 y -29.5‰. no encontrándose variación regular con la altitud aunque las muestras de la serie A3, muestran exactamente la misma tendencia. Los valores de δ^2H oscilan entre -132 y -152‰. Un incremento en altura de 165 a 436 m conduce a una disminución de δ^2H como era de esperar. Por encima de dicha altitud, muestras de 550 y 645 m, los valores de δ^2H son mayores y similares entre sí, descendiendo nuevamente en la muestra a 935m. No es de extrañar el diferente comportamiento de los valores isotópicos δ^2H , $\delta^{18}O$ y $\delta^{13}C$, puesto que la composición isotópica en carbono del aceite viene determinada por la del CO₂, fijado en la fotosíntesis, mientras que la del hidrógeno viene determinada por la del agua y la del oxígeno es función tanto de la del agua como de la del CO₂.
- 8.- No hay una relación simple entre distribución isotópica y composición de ácidos grasos.
- 9.- Los otros aceites vegetales estudiados, a excepción del de maíz que es del ciclo del C4 (Tabla 3), presentan valores de $\delta^{13}C$ similares a los de oliva, pero se pueden diferenciar en los de $\delta^{18}O$. Esto podría ser interesante para detectar mezclas de aceites vegetales y de oliva.
- 10.- Para las Denominaciones de Origen Montoro, Antequera y Lucena (Figura 1), contamos con los resultados de distribución isotópica de Carbono y Oxígeno. Puede verse una diferenciación clara entre Antequera y Montoro, pero no con Lucena. También puede diferenciarse representando SAFA / $\delta^{18}O$ o SAFA/ $\delta^{13}C$ siendo mejores los resultados para el oxígeno (Figuras 2 y 3).
- 11.- La comparación de $\delta^{13}C$ / SAFA para las Denominaciones de Origen de Antequera, Montoro Estepa, Campiñas de Jaén y Poniente de Granada aparece en la Figura 4.
- 12.- En la Figura 5, se comparan los valores medios de $\delta^{13}C$, $\delta^{18}O$ y δ^2H para las variedades más frecuentes en nuestra comunidad ('Hojiblanca' y 'Picual'), de la campaña 2005-2006, con los encontrados por F. Camín y colaboradores, para aceites italianos de diferentes regiones de la misma campaña. Puede observarse que pueden diferenciarse los aceites de ambos países, siendo los aceites de la región Sur2 los que más se asemejan a los españoles. No obstante, con la ayuda de los tres isótopos, se pueden establecer diferencias entre los aceites españoles e italianos. Creemos pues, que la técnica IRMS puede ser una herramienta útil para diferenciar las Denominaciones de Origen de aceites andaluces.

FIGURA 1



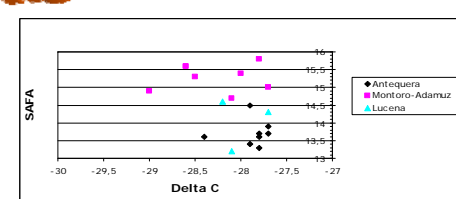
Comparación de $\delta^{13}C$ y $\delta^{18}O$ para algunas Denominaciones de Origen, Campaña 2005-2006

FIGURA 2



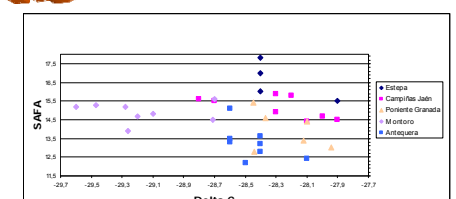
Comparación de $\delta^{18}O$ y SAFA para algunas Denominaciones de Origen, Campaña 2005-2006

FIGURA 3



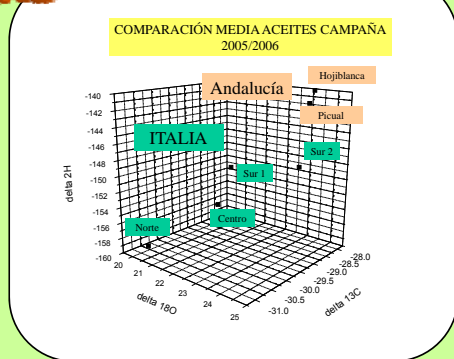
Comparación de $\delta^{13}C$ y SAFA para algunas Denominaciones de Origen, Campaña 2005-2006

FIGURA 4



Comparación de $\delta^{13}C$ y $\delta^{18}O$ para algunas Denominaciones de Origen, Campaña 2005-2006

FIGURA 5



COMPARACIÓN MEDIA ACEITES CAMPAÑA 2005/2006

Tabla 1

Serie	RI	Varietal	Índice de Madurez	Lugar	$\delta^{18}O$	$\delta^{13}C$	δ^2H
G1	25	'Arbequina'	2	Córdoba	22.6	-28.2	-147
G2	26	'Arbequina'	3	Córdoba	21.4	-29.9	-145
G1	27	'Arbequina'	4	Córdoba	21.8	-29.9	-144
G1	37	'Gordal Vélez Rubio'	2	Córdoba	25.3	-29.8	-135
G1	38	'Gordal Vélez Rubio'	3	Córdoba	24.9	-30.2	-139
G1	39	'Gordal Vélez Rubio'	4	Córdoba	25.2	-29.4	-137
**	46	'Senar'	3	Edul	23.6	-28.2	-136
**	72	'Senar'	3.3	Cabañ	23.5	-28.3	-139

Estudio comparativo de $\delta^{18}O$, $\delta^{13}C$ y δ^2H de muestras del banco de Germoplasma de Córdoba correspondientes a la campaña 2004-2005.

Tabla 2

Serie	RI	Varietal	Origen	$\delta^{13}C$
GT3	56	'Arbequina'	Monto Illes	29.3
GT3-S	57	'Hojiblanca'	Monto Illes	27.7
GT3-R	58	'Hojiblanca'	Monto Illes	27.8
GT3-S	59	'Picual'	Monto Illes	28.2
GT3-R	60	'Picual'	Monto Illes	28.1

Valores de $\delta^{13}C$ de muestras procedentes del Banco de Germoplasma de Tarragona de la campaña 2006-2007.

Tabla 3

Serie	RI	Varietal	Origen	$\delta^{18}O$	$\delta^{13}C$
V1	76	Acacia de soja y girasol alto(Oleaceae/Ses. Plana La Española)		-28.5	20.0
V1	77	Acacia de Maíz (Asteraceae-Knappe)		-26.6	18.0
V1	78	Acacia de Girasol y soja (Euphorbia-Raposa/Raposa)		-28.7	17.9
V1	79	Acacia (ortiga de Cava) (Gramineae-Milium)		-28.4	18.9

Resultados de $\delta^{18}O$ y $\delta^{13}C$ para algunos aceites vegetales comerciales de la campaña 2004-2005.

Tabla 4

Serie	RI	Varietal	Localización	Latitud	Longitud	Altura d (m)	$\delta^{18}O$	$\delta^{13}C$	δ^2H
A2	40	'Picual'	El Campal(Córdoba)	37°35'N	6°48'W	165	-28.0	-32.2	-132
A2	43	'Picual'	Banica(Córdoba)	37°23'N	6°48'W	334	-28.9	-25.1	-136
A2	46	'Picual'	Mancha Real(Jaén)	37°42'N	3°40'W	636	-29.5	-22.9	-132
A2	45	'Picual'	Martos(Jaén)	37°32'N	6°19'W	550	-27.9	-22.5	-139
A2	44	'Picual'	Aleánder(Jaén)	37°36'N	6°30'W	645	-28.3	-24.0	-139
A2	47	'Picual'	Bradillo(Córdoba)	37°43'N	3°38'W	935	-28.5	-24.2	-143

Estudio comparativo de $\delta^{18}O$, $\delta^{13}C$ y δ^2H de muestras de la variedad 'Picual' obtenidas a distinta altura, correspondientes a la campaña 2005-2006.

Comunicación 2

*Modelos de regresión lineal múltiple para predecir el contenido en
diversos ácidos del aceite usando los datos del espectro NIR.*

XII Conferencia Española de Biometría.

Cádiz, 23 Septiembre 2009.

Comunicación Oral

Modelos de regresión lineal múltiple para predecir el contenido en diversos ácidos del aceite usando los datos del espectro NIR

Aramendía, M.A.¹; Caridad, J.M.²; Marinas, A.¹; Marinas, J.M.¹; Sánchez, E.¹; Sánchez, M.I.²; Urbano, F.J.¹

¹Dep. Química Orgánica, Univ. Córdoba

²tdlsarom@uco.es, Dep. Estadística, Econometría, Investigación Operativa y Organización de Empresas, Univ. Córdoba

Abstract

This paper presents linear regression models to explain the fatty acid profile in extra-virgin oil samples, using the data provided by NIR spectroscopy, technique that is currently extended to investigate traceability in olive oil. The main information of the spectrum is extracted using principal component analysis and considering the relative maximum of the curve.

Keywords: Linear regression, principal components, NIR.

1. Introducción

La necesidad de garantizar la calidad del aceite de oliva ha hecho necesario buscar nuevos métodos analíticos rápidos, fiables, económicos y que precisen poca o nula manipulación de la muestra que se está considerando. En este sentido, las técnicas de espectroscopía infrarroja cercana (NIR) se aplican ampliamente en el campo del aceite de oliva para medir algunas de sus características químicas (tales como el contenido en diversos ácidos grasos) o bien para detectar posibles adulteraciones con otros tipos de aceites vegetales (véase, por ejemplo, Kasemsumran et al. [1]). Las técnicas NIR generan espectros que representan, para cada longitud de onda, la cantidad de energía electromagnética absorbida por la muestra.

En este contexto, el proceso de adquisición de datos es relativamente sencillo, siempre y cuando se haya comprobado el correcto funcionamiento del instrumento de medida. Sin embargo, el aspecto que más frecuentemente se discute de las técnicas de espectroscopía infrarroja es la dificultad para interpretar los datos espectrales, debido a que generan información continua, que es rica en tipos de bandas tanto aisladas como solapadas que contienen la suma de la información de varias moléculas.

Así, el objetivo de este trabajo está en la extracción de la información relevante que proporcionan los espectros NIR sobre el aceite de oliva. Más concretamente, se pretende el ajuste de modelos de regresión lineal múltiple para predecir el contenido en diversos tipos de ácidos grasos del aceite utilizando los

datos que proporciona la espectroscopía NIR. Puesto que las observaciones que contiene, para cada muestra, el espectro son muy numerosas (varios cientos de miles), será necesario resumir la información que proporcionan los datos, debido a que cualquier análisis estadístico multivariante requiere que el número de casos o muestras exceda al número de variables (en este caso, longitudes de onda del espectro). Con esta finalidad, algunos autores (tales como, Ferrio et al. [2] o Lai et. al [3]) utilizan el análisis en componentes principales, que constituye un método eficiente de reducción de datos, eliminando la información redundante de las variables. En este estudio, también se utilizan las componentes principales como variables explicativas de los diversos modelos de regresión ajustados.

Sin embargo, con la finalidad de mejorar el grado de ajuste de cada uno de los modelos, este trabajo da un paso más. Puesto que en otro tipo de espectroscopías (en concreto, la que proporciona la técnica RMN) el contenido en algunos compuestos fundamentales del aceite puede ser predicho a partir del área encerrada bajo algunos de los picos del espectro, puede ser interesante recoger la información que proporcionan cada uno de los máximos relativos de la curva, incluyendo dichos máximos también como variables explicativas en el correspondiente modelo de regresión. De esta forma, se consigue ajustar modelos de regresión que explican un porcentaje de la variabilidad de la variable explicada muy próximo al total, situación excepcional que, en la práctica habitual con datos reales, en pocas ocasiones se produce. Además, se realiza la validación de cada modelo llevando a cabo los contrastes de significación de las diversas variables incluidas en el mismo y mediante un exhaustivo análisis de los residuos que genera.

2. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (Proyecto P08-FQM-03931).

3. Bibliografía

- [1] Kasemsumran, S.; Kang, N.; Christy, A.; Ozaki, Y. (2005) *Partial least squares processing of near-infrared spectra for discrimination and quantification of adulterated olive oils*. Spectroscopy Letters, 38(6), 839-851.
- [2] Ferrio, J.P.; Bertran, E.; Nachit, M.; Royo, C.; Araus, J.L. (2001) *Near infrared reflectance spectroscopy as a potential surrogate method for the analysis of $\Delta^{13}\text{C}$ in mature kernels of durum wheat*. Aust. J. Agric. Rec., 52, 809-816.
- [3] Lai, Y.W.; Kemsley, E.K.; Wilson, R.H. (1994) *Potential of Fourier transform infrared spectroscopy for the authentication of vegetable oils*. J Agric Food Chem., 42, 1154-1159.

Comunicación 3

*Aplicación de técnicas de análisis multivariante a los espectros RMN del
1H del aceite de oliva.*

**XV Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines.
Expoliva.**

Jaén, 11 Mayo de 2011.

Póster.

FORO DE LA INDUSTRIA, TECNOLOGÍA Y CALIDAD OLEÍCOLA: IND-17

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS MULTIVARIANTE A LOS ESPECTROS RMN DEL ¹H DEL ACEITE DE OLIVA

M^a Isabel Sánchez- Rodríguez^{1*}, Elena Sánchez López², M^a Ángeles Aramendía², Juan M. Caridad¹, Alberto Marinas², José M^a Marinas² y Francisco José Urbano²

¹ Dep. Estadística, Econometría, I.O., Org. Empresas y Ec. Aplicada. Fac. Derecho y Ciencias Económicas y Empresariales. Avda. Puerta Nueva, s/n. 14071. Córdoba. España. *e-mail: td1sarom@uco.es

² Dep. Química Orgánica. Edificio C-3 (Marie Curie - Anexo). Campus de Rabanales. 14014. Córdoba. España.

RESUMEN

Este trabajo muestra los resultados de la aplicación de diversas técnicas de análisis multivariante a datos sobre el aceite de oliva proporcionados por la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) del ¹H. Concretamente, se estudia la estructura de interrelaciones que existe entre la variedad de aceituna y su procedencia mediante un análisis de correspondencias, se realiza una clasificación de los aceites en conglomerados de aceites similares respecto a su composición en ácidos grasos mediante un análisis cluster y se determina, en el contexto del análisis de la varianza multivariante, si la campaña de recogida de la aceituna y la denominación de origen del aceite tienen efecto sobre su contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

Palabras clave: *Análisis multivariante aplicado. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Aceite de oliva virgen.*

INTRODUCCIÓN

El objetivo fundamental de la política de la Unión Europea con respecto al aceite de oliva está en mantener y potenciar su posición en los mercados mundiales. Con esta finalidad, parece pertinente la creación de una base de datos (similar a la ya existente para vinos) en la que queden recogidas todas sus características de calidad, pureza varietal y su trazabilidad. Dicha base de datos puede estar constituida por los resultados de los análisis de los aceites por técnicas como espectroscopias FT-Raman, NIR, RMN de ¹³C y ¹H y SIRMS.

Durante muchos años el análisis de los aceites vegetales ha sido llevado a cabo mediante procedimientos clásicos, tales como la cromatografía de gases, que requiere derivatización previa de la muestra. Esto hace que, en ocasiones, pueda verse alterada la composición de la muestra, con el correspondiente error en la medida. Por ello resulta deseable el empleo de técnicas que no requieran manipulación de la muestra.

En este sentido, las técnicas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) pueden emplearse en el campo del aceite de oliva para medir algunas de sus características químicas (tales como el contenido en diversos ácidos grasos) o bien para detectar posibles adulteraciones con otros tipos de aceites vegetales (véase Šmejkalová y col. [6]).

El objetivo de este trabajo es aplicar técnicas del contexto del análisis multivariante para extraer la información que proporcionan los datos del espectro RMN del ¹H del aceite de oliva (véanse, por ejemplo, Rezzi y col. [4], Sacco y col. [5], Vlahov y col. [9]), sobre variables tales como la variedad, la procedencia o la campaña de recogida de la aceituna o bien sobre la denominación de origen del aceite.

ADQUISICIÓN DE LOS DATOS

La realización de este estudio se basa en datos obtenidos a partir de muestras de aceite (prácticamente todas las muestras proceden de aceite de oliva, si bien existen algunas muestras de aceites comerciales de soja, maíz y girasol) obtenidas a partir de diferentes variedades de aceituna (fundamentalmente, zaity, arbequina, frantoio, gordal, picual y hojiblanca), procedentes de las campañas 2004-2005, 2005-2006, 2006-

2007, 2007-2008 y 2008-2009, con distintos orígenes (aunque la mayor parte de las muestras han sido extraídas en Andalucía, se ha dispuesto de algunas muestras procedentes de otras zonas, tales como Tarragona) y, en algunos casos, con una cierta denominación de origen asociada (Sierra de Cádiz, Estepa, Antequera, Lucena, Montoro-Adamuz, Baena, Priego de Córdoba, Poniente de Granada, Campiña de Jaén, Jaén Sierra Sur, Sierra de Cazorla).

Debido a que no se analiza, en el contexto del Muestreo Estadístico, la representatividad del conjunto de datos en una cierta población (Andalucía), las conclusiones del estudio deben ser enmarcadas en el contexto de la Estadística Descriptiva y no de la Estadística Matemática.

El estudio se realiza en base a aceite de oliva virgen suministrado por diversos productores o proporcionado a partir de aceitunas del Banco de Germoplasma de Córdoba, mediante el procedimiento ABENCOR.

Los datos objeto de análisis han sido obtenidos utilizando la espectroscopia RMN del ^1H del aceite (análisis realizados en el Servicio de RMN de la Universidad de Sevilla). En este contexto, el proceso de adquisición de datos es relativamente sencillo, siempre y cuando se ha comprobado el correcto funcionamiento del instrumento de medida. La señal obtenida a partir de un espectrómetro contiene información junto con ruido aleatorio, que puede causar errores sistemáticos en predicciones posteriores; por tanto, reducir el ruido, es decir, mejorar la relación señal-ruido es un aspecto de gran importancia. Por otra parte, también es indispensable conseguir la estabilidad del aparato de medida verificándose el valor de referencia del espectrómetro en condiciones normales de funcionamiento, una vez que se recogen sucesivamente los datos espectrales de la misma muestra en experimentos realizados bajo idénticas condiciones.

Por tanto, como resultado de la aplicación correcta del procedimiento se obtiene, para cada caso (para cada muestra de aceite, cuya información se recoge en una de las filas de la matriz de datos), un espectro RMN, que recoge diferentes señales correspondientes a distintos tipos de hidrógenos presentes en la muestra, esto es, hidrógenos en diferentes entornos químicos. A su vez, el área de cada señal informa de la proporción de hidrógenos a los cuales representa.

Algunos autores han propuesto diversas fórmulas para la determinación del perfil de ácidos grasos a partir del espectro de RMN del ^1H . Los mejores resultados –y, por consiguiente, los que se emplearán en este trabajo– son los propuestos por el *método de Guillén* (Guillén y col. [3]), ligeramente modificado, que calcula los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico, principalmente), los monoinsaturados (oleico, fundamentalmente), y los poliinsaturados (linoleico y linolénico, principalmente), a partir del área bajo los picos A-F del espectro, usando las fórmulas indicadas en la Figura 1.

En definitiva, se han observado 320 aceites, cuya información se recoge en las correspondientes filas de la matriz de datos, y, para cada aceite o caso, se han observado distintas variables tales como *campaña, variedad, procedencia, denominación de origen*, contenido en ácidos grasos *-linoleico, linolénico, oleico, saturados-* cuya información está recogida en las columnas de la matriz de datos. Se ha de tener en cuenta, de cara a la aplicación de los distintos procedimientos del contexto del análisis multivariante, que las cuatro primeras variables enumeradas son categóricas, mientras que las cuatro últimas son numéricas. Además, a partir de las variables numéricas consideradas pueden obtenerse las variables SAFA = *saturados*, MUFA = *oleico* y PUFA = *linoleico + linolénico*, que se utilizarán en la siguiente sección.

ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS ESPECTROS

En esta sección, nuestro objetivo es emplear diversas técnicas del contexto del análisis multivariante con la finalidad de extraer toda la información relevante sobre el aceite de oliva a partir de los datos que proporcionan los espectros RMN del ^1H .

En primer lugar, se realiza una visión global de la distribución de los datos, representando en la Figura 2 los diagramas de caja en los que se agrupan los datos según el contenido en ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA.

De la interpretación de la Figura 2 se deduce que, para cualquier tipo de aceite, el contenido en ácidos MUFA es considerablemente superior al contenido en ácidos SAFA o PUFA (en el primer caso, la mediana

en superior al 80%). La dispersión de los datos para las variables MUFA o PUFA es superior a la variabilidad de la variable SAFA. Además, entre los datos observados para la variable MUFA aparecen valores atípicos (*outliers*) especialmente pequeños y, entre los datos para la variable PUFA, valores atípicos especialmente grandes. Los valores atípicos más destacados en ambas variables, los que están más alejados del resto de valores, hacen referencia a los casos 77, 78 y 79, que casualmente se corresponden con aceites comerciales que no son de oliva (sino de maíz, soja y/o girasol). Puede intuirse así que en estos aceites comerciales el contenido en ácido oleico (MUFA) y ácidos PUFA es claramente diferente al del aceite de oliva, si bien el contenido en ácidos SAFA no cambia con respecto a los demás.

Análisis de correspondencias

En primer lugar, aplicamos un análisis de correspondencias para determinar una posible estructura de relaciones existente entre las variables que representan la variedad y la procedencia de la aceituna, que vaya más allá de los resultados que proporciona el análisis de la tabla de contingencia obtenida al cruzar ambas variables.

Partimos de la tabla de doble entrada (Tabla 1) que contiene en las filas tres de las *variedades* de aceituna predominantes entre los datos observados –arbecuina, picual y hojiblanca- y, en las columnas, las *procedencias* de los correspondientes casos, agrupadas en las zonas geográficas Sevilla-Málaga, Córdoba, Jaén-Granada y otros –esta última categoría incluye zonas geográficas situadas fuera de Andalucía-. Hemos de indicar que el estudio que se realizará posteriormente requiere que, en la tabla anterior, las frecuencias de las celdas que se obtienen al cruzar cada par de categorías sean superiores a 1 en todos los casos (así el estadístico que recoge la información entre las filas y las columnas de la tabla tiene aproximadamente distribución χ^2). Esta necesidad ha obligado a agrupar las categorías de la variable *procedencia* como se ha indicado antes y a considerar únicamente algunas variedades de aceituna.

Los datos recogidos en la Tabla 1 pueden representarse gráficamente mediante el diagrama de barras recogido en la Figura 3. A la vista de la Tabla 1 y de la Figura 3 puede intuirse la estructura de relación existente entre las variables *variedad* y *procedencia*: en la zona Sevilla-Málaga, entre las tres variedades consideradas, prácticamente sólo se produce la variedad hojiblanca y, sin embargo, en las zonas Jaén-Granada y Córdoba, esta variedad es minoritaria, siendo la variedad picual seguida de la arbecuina las que más se producen. Estas conclusiones podrán ser confirmadas y completadas mediante la realización del análisis de correspondencias, que profundiza en la estructura de relaciones entre las dos variables objeto de estudio.

En la Tabla 2 se resuelve el contraste de independencia entre las filas y las columnas de la tabla; observando el elevado valor del estadístico experimental χ^2 (cuya expresión recoge las desviaciones entre las frecuencias observadas y las frecuencias esperadas en caso de independencia) y la probabilidad límite asociada, próxima a cero, podemos concluir rechazando la hipótesis nula, es decir, afirmando que existe asociación entre la variedad de aceituna y su procedencia. Por otra parte, como resultado de aplicar un análisis de correspondencias, la Tabla 2 pone de manifiesto que un sistema cartesiano de dos ejes factoriales o dimensiones¹ es suficiente para explicar la dispersión total o *inerencia* de la nube de puntos. Para cada dimensión, la inercia se obtiene como el cuadrado del correspondiente valor singular y proporciona una medida de la importancia de la citada dimensión a la hora de explicar los datos de la tabla; es este caso concreto, la primera dimensión explica un 99,2% de la inercia y, la segunda dimensión, un 0,08%.

Para finalizar, en la Figura 4 se representan gráficamente las categorías fila (*variedad*) y columna (*procedencia*) de la tabla de contingencia en el plano que generan las dos dimensiones o factores considerados. La interpretación de la estructura de relaciones entre las categorías de ambas variables en el plano bidimensional, debe tener en cuenta la circunstancia de que las dos dimensiones no explican el mismo porcentaje de variabilidad de los datos de la tabla (de hecho, la primera explica el 99,2% y la segunda, sólo el 0,08%). De cualquier modo, puede resultar de interés dar un sentido o significado a los

¹ Las direcciones de los factores asociados a cada dimensión están dadas por los vectores propios correspondientes a los valores propios de la matriz $X'X$ - X se obtiene normalizando las frecuencias relativas de la tabla- ordenados de mayor a menor

ejes: el primero de ellos, contrapone la variedad hojiblanca con las variedades picual y arbequina, y la zona geográfica Sevilla-Málaga de las restantes; con respecto al segundo eje, contrapone la variedad arbequina y las zonas externas a Andalucía de las demás categorías. En general, cuanto más alejada está una categoría del origen de coordenadas del espacio bidimensional, mayor será su poder discriminante. Puesto que una mayor o menor proximidad entre las categorías (determinada en base a la distancia Chi-cuadrado) en el plano equivale a un mayor o menor grado de relación o interdependencia entre las mismas, en este caso se pone de manifiesto que existe un alto grado de dependencia entre la zona Sevilla-Málaga y la variedad hojiblanca, variedad muy poco relacionada con las demás zonas geográficas, de las que se encuentra muy alejada gráficamente. Por otro lado, en las zonas Jaén-Granada y Córdoba se produce mucho la variedad picual y, en menor grado, la variedad arbequina, según puede observarse por la situación de las correspondientes categorías en el gráfico.

Análisis cluster

El objetivo que nos planteamos a continuación está en aplicar un análisis cluster jerárquico aglomerativo² para clasificar los distintos casos observados (cada caso está asociado a una fila de la matriz de datos y se correspondería con un aceite concreto analizado) en grupos de casos similares (según la medida de distancia o proximidad que proporciona la distancia euclídea al cuadrado) en base al contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA que proporciona la espectroscopia RMN del ¹H. Es importante tener en cuenta que la clasificación que se obtendrá estará basada en estas variables, pudiendo diferir si se considerasen otras variables explicativas distintas.

Una vez clasificados los casos en tres grupos de aceites similares (las tablas y gráficos que resumen la información relativa a la formación de los clusters no se incluyen por motivos de extensión), en la Tabla 3 se recogen los resultados que se obtienen al cruzar el cluster o conglomerado de pertenencia con la variedad de aceituna (considerando únicamente las variedades mayoritarias).

A la vista de las frecuencias contenidas en las celdas de la Tabla 3 podemos intuir una cierta relación entre el cluster de pertenencia del caso y la variedad de aceituna asociada, de forma que el cluster 1 está asociado a las variedades picual y hojiblanca; el cluster 2, a las variedades zaity, arbequina y frantoio; el cluster 3, a la variedad gordal. Esta conclusión se intuye también a partir de la comparación de las nubes de puntos representadas en la Figura 5, donde se representa la variable SAFA en el eje X, MUFA en el eje Y y PUFA en el eje Z, etiquetando primero los casos según la variedad y, en segundo lugar, según el cluster en el que ha sido clasificado.

Análisis de la varianza multivariante

En este momento, en el contexto del análisis de la varianza multivariante (MANOVA), pretendemos determinar si dos variables categóricas o *factores*, concretamente, las que representan la campaña de recogida de la aceituna y la denominación de origen del aceite, así como las interacciones entre ellas, influyen en el contenido en ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA (que habrán de verificar una serie de supuestos que posteriormente se comentarán).

A la vista de las probabilidades límite contenidas en la última columna de la Tabla 4, asociadas a los contrastes en los que se plantea el efecto de los correspondientes factores (en definitiva, un contraste de medias múltiple), al nivel de significación $\alpha = 0,05$, el factor *campaña* afecta al contenido de ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA del aceite, sin embargo, el factor *denominación de origen* influye únicamente en el contenido de ácidos SAFA y MUFA, pero no PUFA (la interacción entre los factores afecta sólo en el contenido de ácidos SAFA).

Una vez determinados los factores que influyen en las correspondientes variables dependientes es necesario determinar los niveles o tratamientos concretos del factor que difieren significativamente entre sí, para lo que es necesario la realización de un contraste *post hoc*, como son los contrastes de Tukey o Bonferroni. Las tablas que se obtienen como resultado de la aplicación se omiten por su extensión y, en su

² Los clusters son formados agrupando casos o variables en conglomerados cada vez más grandes hasta que todos forman parte de uno único, de forma que inicialmente existirán tantos clusters como casos y al final uno solo; además, una vez formado un cluster no puede dividirse.

lugar, se muestran, en la Figura 6, los gráficos donde se representan las medias para cada tipo de ácido y para cada uno de los niveles de los dos factores (campaña y denominación de origen). Con respecto a la campaña de recogida, es la primera la que difiere significativamente de las restantes en el contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA –podría intentarse buscar una explicación a este hecho, por ejemplo, de tipo meteorológico, teniendo en cuenta que 2004 fue un año más lluvioso que los demás-; por otra parte, con respecto a la denominación de origen, es el contenido en ácidos SAFA el que establece una mayor discriminación entre las distintas denominaciones de origen, más concretamente, las denominaciones de Antequera y Estepa son las que más difieren en el contenido en ácidos SAFA o Estepa y Sierra de Cádiz son las más diferentes en el contenido en ácidos PUFA.

Finalmente, hacemos referencia a los supuestos que deben verificarse para que un Análisis de la Varianza, en general, pueda ser aplicado con rigor:

- Independencia de las muestras, que se verificará si la sección de los aceites se ha producido de forma aleatoria.
- Normalidad univariante. Cada una de las variables dependientes habrá de tener distribución normal univariante, hipótesis que puede comprobarse realizando los correspondientes contrastes de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 5).
- Homocedasticidad. Las varianzas del error serán iguales para todos los grupos, hipótesis que podrá comprobarse, para cada variable dependiente, mediante el contraste de Levené (Tabla 6).
- Normalidad multivariante: el vector (SAFA, MUFA, PUFA) tendrá distribución normal trivariante. La verificación y comprobación de esta hipótesis es dificultoso en la práctica –es necesario poner de manifiesto que el hecho de que cada variable individualmente se distribuya según una normal no implica la normalidad trivariante-. En este contexto, los programas de ordenador de estadística suelen aplicar el test de Box, que considera la hipótesis nula de que las matrices de covarianzas observadas para las variables dependientes son iguales para todos los grupos (Tabla 7) –en este caso, no puede aceptarse esta hipótesis-, y el test de Bartlett para contrastar la hipótesis nula de que la matriz de covarianzas residual es proporcional a una matriz identidad –a la vista del resultado de la Tabla 8 no puede aceptarse esta hipótesis, por lo que existe correlación entre las variables dependientes y, por tanto, un enfoque multivariante tiene sentido-.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Profesor Luis Rallo, del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba, haberles proporcionado las muestras del Banco de Germoplasma. Por otro lado, agradecen la financiación de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (Proyecto P08-FQM-03931) y del MICINN (CTQ2008/01330).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Anderson, T.W. (2003) An introduction to multivariate analysis (Third Edition). Wiley Series in Probability and Statistics.
- [2] Dillon, W.R.; Goldstein, M. (1984) Multivariate analysis: methods and applications. John Wiley and Sons Ed.
- [3] Guillén, M.D.; Ruiz, A. (2003) Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. European Journal of Lipid Science and Technology, 105(11), 688-696.
- [4] Rezzi, S.; Axelson, D.E.; Hëlberger, K.; Reniero, F.; Mariani, C.; Guillou, C. (2005) Classification of olive oils using high throughput flow 1H NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks. Analytica Chimica Acta, 552, 13-24.

- [5] Sacco, A.; Brescia, M.A.; Liuzzi, V.; Reniero, F.; Guillou, C.; Ghelli, S.; Van der Meer, P. (2000) Characterization of Italian Olive Oils Based on Analytical and Nuclear Magnetic Resonance Determinations. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(6), 619-625.
- [6] Šmejkalová, D.; Piccolo, A. (2010) High-Power Gradient Diffusion NMR spectroscopy for the rapid assessment of extra virgin olive oil adulteration. *Food Chemistry*, 118, 153-158.
- [7] Uriel, E.; Aldás, J. (2005) *Análisis multivariante aplicado*. Thomson.
- [8] Visauta, B.; Martori, J.C. (2003) *Análisis estadístico con SPSS para Windows*. McGraw-Hill.
- [9] Vlahov, G.; Shaw, A.D.; Kell D.B. (1999) Use of ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Distortionless Enhancement by Polarization Transfer Pulse Sequence and Multivariate Analysis to Discriminate Olive Oil Cultivars. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76(10), 1223-1231.

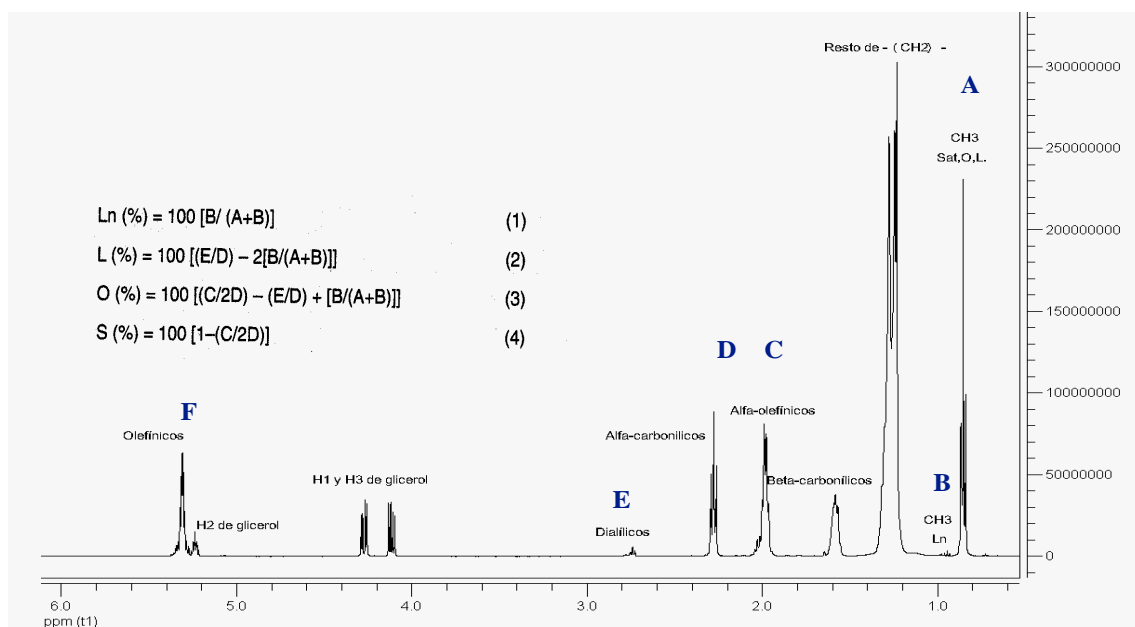


Figura 1. Espectro general de protón de un aceite de oliva virgen extra (RMN del ¹H 500 MHz)

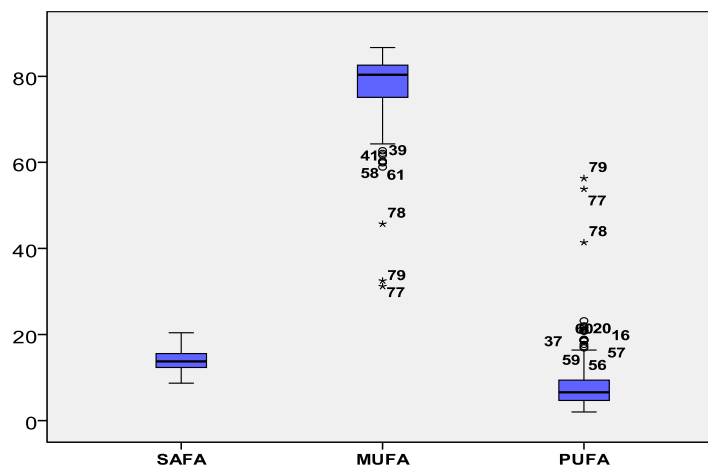


Figura 2. Diagramas de caja para las variables SAFA, MUFA y PUFA

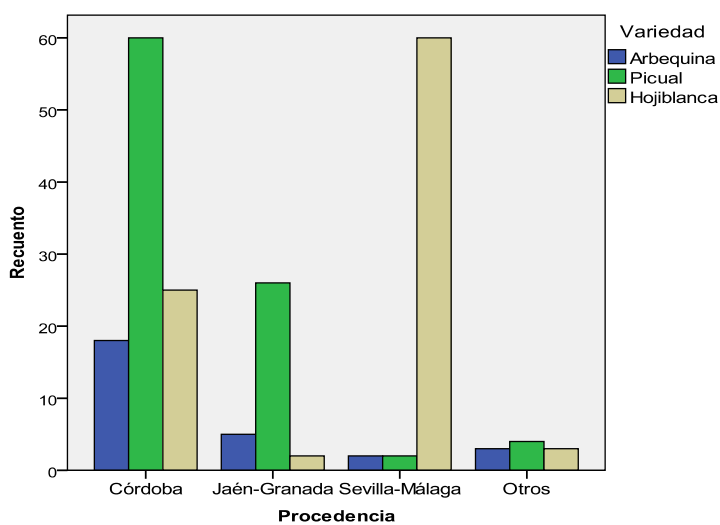


Figura 3. Diagrama de barras para las variedades de aceituna, agrupados los datos según la procedencia

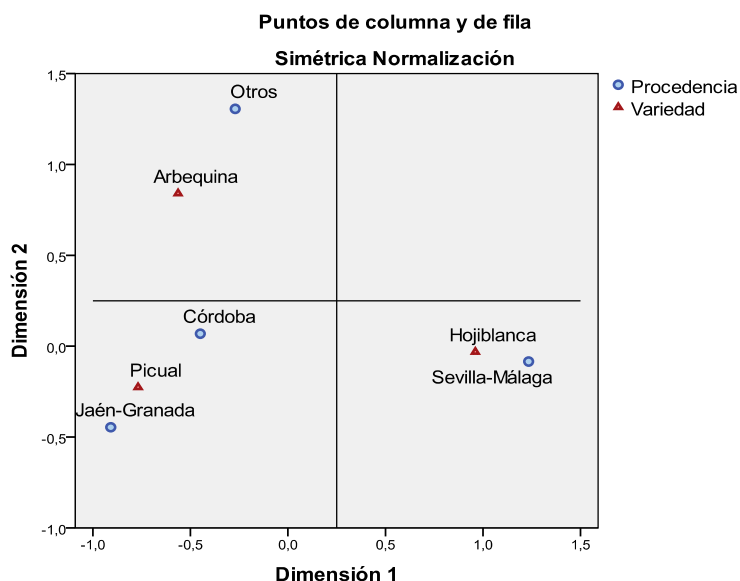


Figura 4. Representación en el plano de las categorías de la tabla

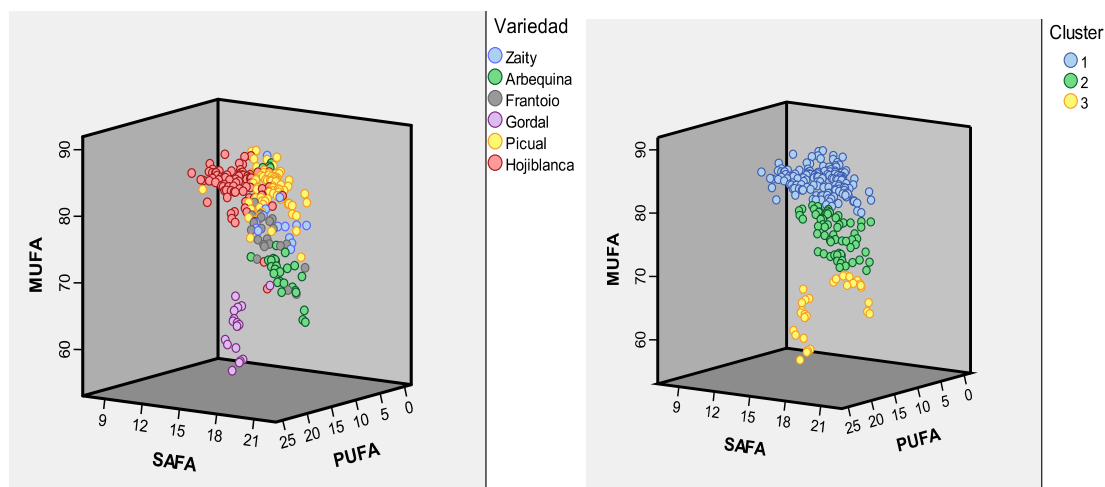


Figura 5. Representación tridimensional de los puntos etiquetados según la variedad y el cluster, respectivamente

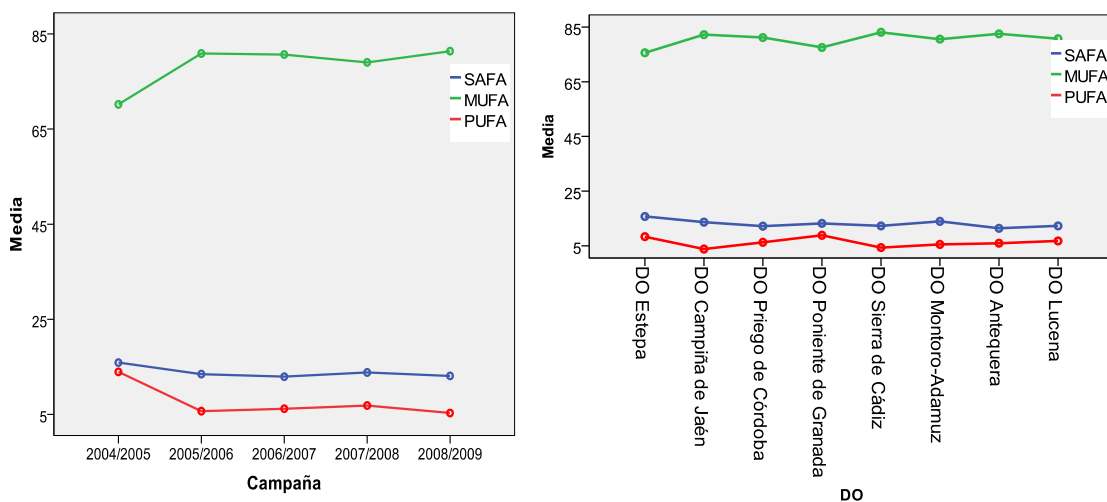


Figura 6. Gráficos de medias para cada tipo de ácido por campañas y denominaciones de origen

Tabla 1. Tabla de contingencia obtenida al cruzar la variedad y la procedencia de la aceituna

Variedad	Procedencia				
	Córdoba	Jaén-Granada	Sevilla-Málaga	Otros	Margen activo
Arbequina	18	5	2	3	28
Picual	60	26	2	4	92
Hojiblanca	25	2	60	3	90
Margen activo	103	33	64	10	210

Tabla 2. Tabla resumen de la aplicación del análisis de correspondencias

Dimensión	Valor propio	Inercia	Chi-cuadrado	Sig.	Proporción de inercia	
					Explicada	Acumulada
1	,709	,503			,992	,992
2	,064	,004			,008	1,000
Total		,507	101,398	,000 ^a	1,000	1,000

a. 4 grados de libertad

Tabla 3. Tabla de contingencia obtenida al cruzar el número de cluster y la variedad de la aceituna

	Variedad						Total
	Zaity	Arbequina	Frantoio	Gordal	Picual	Hojiblanca	
Cluster 1	3	4	1	0	81	77	166
2	11	15	18	0	10	10	64
3	0	10	2	18	0	1	31
Total	14	29	21	18	91	88	261

Tabla 4. Tabla MANOVA del modelo

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	SAFA	683,780 ^a	22	31,081	8,730	,000
	MUFA	6815,844 ^b	22	309,811	10,247	,000
	PUFA	3810,938 ^c	22	173,224	6,970	,000
Intersección	SAFA	17924,692	1	17924,692	5034,731	,000
	MUFA	625918,556	1	625918,556	20702,607	,000
	PUFA	5168,708	1	5168,708	207,961	,000
Campaña	SAFA	157,345	4	39,336	11,049	,000
	MUFA	3499,614	4	874,903	28,938	,000
	PUFA	2342,133	4	585,533	23,559	,000
DO	SAFA	232,609	8	29,076	8,167	,000
	MUFA	596,551	8	74,569	2,466	,014
	PUFA	201,465	8	25,183	1,013	,426
Campaña * DO	SAFA	93,045	10	9,304	2,613	,005
	MUFA	298,929	10	29,893	,989	,453
	PUFA	72,562	10	7,256	,292	,983
Error	SAFA	982,618	276	3,560		
	MUFA	8344,530	276	30,234		
	PUFA	6859,759	276	24,854		
Total	SAFA	60133,278	299			
	MUFA	1826844,341	299			
	PUFA	30048,737	299			
Total corregida	SAFA	1666,398	298			
	MUFA	15160,374	298			
	PUFA	10670,696	298			

a. R cuadrado = ,410 (R cuadrado corregida = ,363)

b. R cuadrado = ,450 (R cuadrado corregida = ,406)

c. R cuadrado = ,357 (R cuadrado corregida = ,306)

Tabla 5. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

	SAFA	MUFA	PUFA
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,307	2,708	2,893
Sig. asintót. (bilateral)	,066	,000	,000

Tabla 6. Contraste de Levené sobre la igualdad de las varianzas

Variable dependiente	F	gl1	gl2	Sig.
SAFA	1,983	13	92	,031
MUFA	2,940	13	92	,001
PUFA	4,017	13	92	,000

Tabla 7. Test de Box

M de Box	1122,065
F	7,848
gl1	114
gl2	4601,942
Sig.	,000

Tabla 8. Test de Bartlett

Razón de verosimilitudes	,000
Chi-cuadrado aprox.	1998,846
gl	5
Sig.	,000

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS MULTIVARIANTE A LOS ESPECTROS RMN DEL ¹H DEL ACEITE DE OLIVA



M.I. Sánchez-Rodríguez^{1*}, E. Sánchez-López², M.A. Aramendía², J.M. Caridad¹, A. Marinas², J.M. Marinas² y F.J. Urbano²

¹Dep. Estadística, Econometría, I.O., Org. Empresas y Ec. Aplicada. *e-mail: td1saram@uco.es

²Dep. Química Orgánica.

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



1. Introducción

El objetivo fundamental de la política de la Unión Europea con respecto al aceite de oliva está en mantener y potenciar su posición en los mercados mundiales. Con esta finalidad, parece pertinente la creación de una **base de datos** (similar a la ya existente para vinos) en la que queden recogidas todas sus características de calidad, pureza varietal y su trazabilidad.

Durante muchos años el análisis de los aceites vegetales ha sido llevado a cabo mediante procedimientos clásicos, tales como la cromatografía de gases, que requiere derivatización previa de la muestra. Esto hace que, en ocasiones, pueda verse alterada la composición de la muestra, con el correspondiente error en la medida. Por ello resulta deseable el empleo de procedimientos que no requieran manipulación de la muestra, tales como las **técnicas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)**.

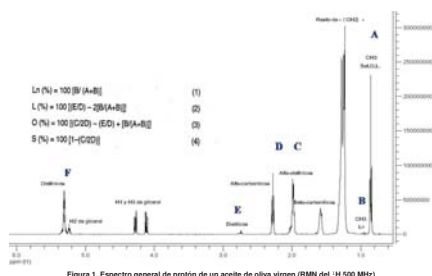
El objetivo de este trabajo consiste en aplicar técnicas del contexto del **análisis multivariante** para extraer la información que proporcionan los datos del espectro RMN del ¹H del aceite de oliva ([2]-[4]), sobre variables tales como la variedad, la procedencia o la campaña de recogida de la aceituna o bien sobre la denominación de origen del aceite.

2. Adquisición de los datos

La realización de este estudio se basa en datos extraídos a partir de muestras de aceite obtenidas a partir de diferentes **variedades** de aceituna (fundamentalmente, zaity, arbequina, frantoio, gordal, picual y hojiblanca), procedentes de las **campañas** 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007, 2007-2008 y 2008-2009 y, en algunos casos, con ciertas **denominaciones de origen** asociadas (Sierra de Cádiz, Estepa, Antequera, Luceña, Montoro-Adamuz, Baena, Priego de Córdoba, Poniente de Granada, Campiña de Jaén, Jaén Sierra Sur, Sierra de Cazorla).

Los análisis de RMN de protón han sido realizados en el servicio de RMN de la Universidad de Sevilla. Los aceites han sido proporcionados por diversos cultivadores u obtenidos por nosotros, por el procedimiento ABENCOR, a partir de aceitunas recogidas del Banco de Germoplasma de Córdoba.

Algunos autores han propuesto diversas fórmulas para la determinación del perfil de ácidos grasos a partir del espectro de RMN del ¹H. Los mejores resultados son los propuestos por el método de Guillén, [1], ligeramente modificado, que calcula los ácidos grasos saturados (palmitico y esteárico, principalmente), SAFA, los monoinsaturados (oleico, fundamentalmente), MUFA, y los poliinsaturados (linoleico y linolénico, principalmente), PUFA, a partir del área bajo los picos A-F del espectro, usando las fórmulas indicadas en la Figura 1.



3. Análisis multivariante de los espectros

Inicialmente, para realizar una visión global de la distribución de los datos, se representan los diagramas de caja para las variables SAFA, MUFA y PUFA (Figura 2). Se deduce que, para cualquier tipo de aceite, el contenido en ácidos MUFA es considerablemente superior al contenido en ácidos SAFA o PUFA y que la dispersión de los datos para las variables MUFA o PUFA es superior a la variabilidad de la variable SAFA. Además, entre los datos observados para las variables MUFA y PUFA aparecen valores atípicos (*outliers*), asociados a los casos 77, 78 y 79, que casualmente se corresponden con aceites comerciales que no son de oliva (sino de maíz, soja y/o girasol).

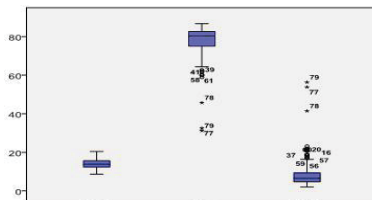


Figura 2. Diagramas de caja para las variables SAFA, MUFA y PUFA.

Análisis de correspondencias

A continuación, aplicamos un análisis de correspondencias para determinar una posible estructura de relaciones existente entre las variables que representan la variedad y la procedencia de la aceituna, que vaya más allá de los resultados que proporciona el análisis de la Tabla 1, tabla de contingencia obtenida al cruzar ambas variables -representada gráficamente en la Figura 3-.

Variedad	Córdoba	Jaén-Granada	Sevilla-Málaga	Otros	Margen activo
Arbequina	18	5	2	3	28
Picual	60	26	2	4	92
Hojiblanca	25	2	60	3	90
Margen activo	103	33	64	10	210

Tabla 1. Tabla de doble entrada entre variedad y procedencia.

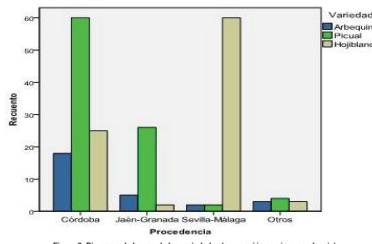


Figura 3. Diagrama de barras de las variedades (agrupación según procedencia).

En la Figura 4 se representan gráficamente las categorías fila (variedad) y columna (procedencia) de la tabla de contingencia en el plano que generan los dos primeros ejes factoriales, de forma que la proximidad entre las categorías es indicativa de un alto grado de relación entre ellas. Aunque las dos dimensiones no explican el mismo porcentaje de variabilidad de los datos de la tabla, a la vista de la Figura 4 puede deducirse que:

- el primero de los ejes contraponen la variedad hojiblanca con las variedades picual y arbequina, y la zona geográfica Sevilla-Málaga de las restantes;
- con respecto al segundo eje, contraponen la variedad arbequina y las zonas externas a Andalucía de las demás categorías;
- Existe un alto grado de dependencia entre la zona Sevilla-Málaga y la variedad hojiblanca, variedad muy poco relacionada con las demás zonas geográficas, de las que se encuentra muy alejada gráficamente;
- por otro lado, en las zonas Jaén-Granada y Córdoba se produce mucho la variedad picual y, en menor grado, la variedad arbequina.

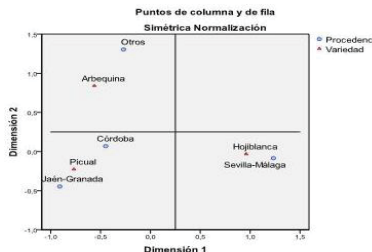


Figura 4. Representación en el plano de las categorías de la tabla de contingencia.

Análisis cluster

Se aplica un análisis cluster jerárquico aglomerativo para clasificar los distintos aceites observados en grupos de aceites similares (según la distancia euclídea al cuadrado) en base al contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA que proporciona la espectroscopia RMN del ¹H.

Una vez clasificados los casos en tres grupos de aceites similares, en la Tabla 2 se recogen los resultados que se obtienen al cruzar el cluster de pertenencia con la variedad de aceituna (considerando únicamente las variedades mayoritarias). A

la vista de las frecuencias contenidas en las celdas de la Tabla 2 (y de las representaciones tridimensionales representadas en la Figura 5) podemos intuir una cierta relación entre el cluster de pertenencia del caso y la variedad de aceituna asociada, de forma que:

- el cluster 1 está asociado a las variedades picual y hojiblanca;
- el cluster 2, está relacionado con las variedades zaity, arbequina y frantoio;
- la variedad gordal está asociada al cluster 3.

Cluster	Variedad						Total
	Zaity	Arbequina	Frantoio	Gordal	Picual	Hojiblanca	
1	3	4	1	0	81	77	166
2	11	15	18	0	10	10	64
3	0	10	2	18	0	1	31
Total	14	29	21	18	91	89	261

Tabla 2. Tabla de contingencia obtenida al cruzar número de cluster y variedad.

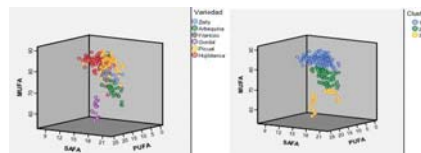


Figura 5. Representación tridimensional de los puntos según variedad y cluster.

Análisis de la varianza multivariante

La realización de un análisis de la varianza multivariante (MANOVA) pone de manifiesto que el factor campaña afecta al contenido de ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA del aceite; sin embargo, el factor denominación de origen influye únicamente en el contenido de ácidos SAFA y MUFA, pero no PUFA (la interacción entre los factores afecta sólo en el contenido de ácidos SAFA). Una vez determinados los factores que influyen en las correspondientes variables dependientes, la realización de un contraste *post hoc* -como son los contrastes de Tukey o Bonferroni- permite determinar los niveles concretos de los factores que difieren significativamente entre sí. En la Figura 6 se representa el contenido medio para cada tipo de ácido y para cada uno de los niveles de los dos factores (campaña y denominación de origen), obteniéndose:

- Las campañas de recogida de la aceituna 2007/08 y 2008/09 son las más diferentes con respecto al contenido en ácidos MUFA y PUFA, puesto que el contenido en ácidos SAFA no muestra diferencias significativas por campañas;
- por otra parte, las denominaciones de origen de Antequera y Estepa son las que más difieren en el contenido en ácidos SAFA, Estepa y Sierra de Cazorla son las más diferentes en el contenido en ácidos MUFA, mientras que el contenido en ácidos PUFA distingue fundamentalmente a las denominaciones de Estepa y Poniente de Granada.

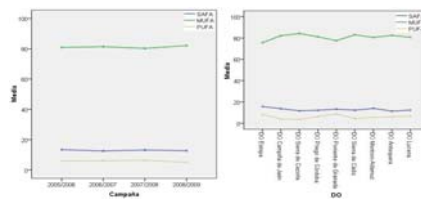


Figura 6. Gráficos de medias para cada tipo de ácido por campañas y denominaciones de origen.

Agradecimientos: Los autores agradecen la financiación de la Junta de Andalucía (P08-FQM-03931) y fondos FEDER.

Referencias

[1] Guillén, M.D.; Ruiz, A. (2003) *Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils*. European Journal of Lipid Science and Technology, 105(11), 688-696.

[2] Rezzi, S.; Axelsson, D.E.; Hölzberger, K.; Reniero, F.; Mariani, C.; Guillou, C. (2005) *Classification of olive oils using high throughput flow ¹H NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks*. Analytica Chimica Acta, 552, 13-24.

[3] Smejkalová, D.; Piccolo, A. (2010) *High-Power Gradient Diffusion NMR spectroscopy for the rapid assessment of extra virgin olive oil adulteration*. Food Chemistry, 118, 153-158.

[4] Vlahov, G.; Shaw, A.D.; Kell D.B. (1999) *Use of ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Distortionless Enhancement by Polarization Transfer Pulse Sequence and Multivariate Analysis to Discriminate Olive Oil Cultivars*. J. Am. Oil Chem. Soc., 76(10), 1223-1231.

Comunicación 4

Aplicación de la técnica IRMS a la trazabilidad de aceites de oliva andaluces.

**I Congreso Científico de Investigadores en Formación en
Agroalimentación.**

Córdoba, 8-9 mayo 2012.

Comunicación Oral.

“APLICACIÓN DE LA TÉCNICA SIRMS A LA TRAZABILIDAD DE ACEITES DE OLIVA ANDALUCES”

INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva es el aceite vegetal comestible más importante en los países mediterráneos y Portugal. En España, Andalucía es la Comunidad que concentra la mayor parte de la producción (80%). Es un aceite apreciado por su sabor y sus beneficios sobre la salud. En el mercado alcanza precios elevados, por lo que es susceptible de sufrir adulteraciones, mezclándolo con otros aceites de calidad más baja, como girasol o soja, suponiendo, además de un fraude económico, un riesgo para la salud.

La necesidad de garantizar la calidad de los alimentos ha hecho necesario buscar nuevos métodos analíticos rápidos, fiables, económicos y que precisen poca o nula manipulación de la muestra. La aplicación de métodos espectroscópicos (NIR, MIR y RAMAN, RMN de ^{13}C y de ^1H) y las técnicas de SIRMS (Espectrometría de Masas de Isótopos Estables, del inglés “Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry”), combinados con la estadística asistida por ordenador y procedimientos matemáticos de tratamientos informáticos, son las técnicas emergentes en el campo de la química de la calidad del aceite de oliva.

La técnica “SIRMS” constituye una variante de la Espectrometría de Masas que tiene por objeto la medida, con una alta exactitud y precisión, de las variaciones en la abundancia isotópica natural de los isótopos estables ligeros de C, O, H, N, S en muy diversos tipos de muestras. Dichas variaciones son atribuibles al llamado “fraccionamiento isotópico”. El fraccionamiento ocurre debido a que, aunque los isótopos de un mismo elemento tienen las mismas propiedades químicas, difieren en sus propiedades físicas y físico-químicas, al poseer diferente masa. Debido a esto, la composición isotópica varía con la altitud, latitud, distancia al mar, temperatura y variedad. Los valores isotópicos obtenidos mediante la técnica SIRMS se expresan mediante la llamada “notación en delta”, expresada en tanto por mil.

OBJETIVOS

El objetivo de nuestro trabajo es crear una base de datos de aceites de oliva, principalmente andaluces, que permita discriminar entre variedades, procedencia geográfica, DOP y, a su vez, evitar fraudes.

Hasta el comienzo de este estudio, había poca bibliografía referida a la trazabilidad de aceites de oliva. La que existía hasta el momento se refería a detección de fraudes [1,2] y estaba poco estudiada la identificación del origen geográfico de los aceites mediante relaciones isotópicas. Para ello se utilizan los valores $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ (que ya han sido empleados en

otros estudios para establecer la trazabilidad de otros alimentos, tales como vinos, miel o zumos [3,7]), junto con datos procedentes de otras técnicas (NIR, RMN [8], Raman).

Se dispone de muestras representativas de aceites andaluces de siete campañas agrícolas (desde la campaña 2004-2005 hasta la campaña 2010-2011) con trazabilidad garantizada y aseguramiento de pureza varietal y el mismo entorno climático (bancos de Germoplasma de Córdoba y banco de Germoplasma de Tarragona), multivarietales con una variedad predominante, ‘Hojiblanca’ o ‘Picual’ (muestras procedentes de la Cooperativa Hojiblanca y de distintas Denominaciones de Origen), muestras de la variedad ‘Picual’ cultivadas a distintas altitudes, entre 117m y 935 m y muestras de aceites vegetales distintos a los aceites de oliva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han recogido muestras de las campañas 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007, 2007-2008, 2008-2009, 2009-2010 y 2010-2011. A estas campañas les hemos asignado los números 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente. Tal como se ha dicho anteriormente, a las variedades procedentes del banco de Germoplasma de Córdoba se les ha asignado la letra G, a las del banco de Germoplasma de Tarragona las letras GT, a las suministradas por el Grupo Hojiblanca la H, a las de variedad ‘Picual’ procedentes de altitudes entre 117m y 935m la A y a las de distintas Denominaciones de Origen le corresponde DO. Además, en la campaña 1 se estudiaron variedades procedentes de Siria (S) y de Estepa (Sevilla) (E), así como algunos aceites vegetales (V). Así, cada serie vendrá definida por la inicial correspondiente seguida del número de la campaña a la que pertenezca (Serie H2: corresponde a muestras del Grupo Hojiblanca y a la campaña 2005-2006).

Las muestras procedentes del banco de Germoplasma han sido obtenidas mediante el proceso ABENCOR [9], el cual reproduce el proceso industrial a escala de laboratorio, mientras que las demás, procedentes de distintas almazaras, han sido obtenidas mediante el sistema de dos fases. Estas muestras son clasificadas y conservadas en el frigorífico y en la oscuridad, para que no sufran alteración, hasta el momento del análisis.

Para analizar las muestras, se coloca la cantidad de aceite correspondiente (250-300 μg para determinar $\delta^{18}\text{O}$, 180-200 μg para $\delta^{13}\text{C}$ y 300 μg para $\delta^2\text{H}$) en unas cápsulas de estaño (para $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$) y de plata (para $\delta^2\text{H}$). Estas cápsulas, una vez preparadas, son colocadas en el automuestreador del equipo.

El equipo utilizado para el análisis de masas de isótopos es un Delta Plus XL, de Thermo Finnigan. Atendiendo a la manera de preparar la muestra se distingue entre:

a) “EA-IRMS”: Se utiliza para determinar C. Antes de llegar al Masas de Isótopos, la muestra pasa a través de un analizador elemental, que transformará el carbono en CO_2 , nitrógeno en N_2 y azufre en SO_2 , pudiendo así medir la relación isotópica de estos tres

elementos. Los tres gases pasan por una columna cromatográfica donde son separados y llegan al “IRMS”.

b) “Py-IRMS”, también conocida como técnica “TC/EA-IRMS”: se emplea para la determinación de oxígeno e hidrógeno por formación de CO y H₂, respectivamente, mediante un proceso de pirólisis (“pyrolysis”). Obviamente, mediante la técnica “EA-IRMS” no puede determinarse oxígeno, al emplear éste para la oxidación del compuesto orgánico.

Como patrones, se suelen emplear el VSMOW (valor medio del oxígeno en agua oceánica) para el oxígeno e hidrógeno y la VPDB (Belemnita de Pee Dee –un carbonato-) para el carbono.

PRINCIPALES APORTACIONES

1-Se han puesto a punto diversas técnicas para la determinación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ con precisiones, expresadas como desviaciones estándar, de 0.1, 0.3 y 3, en tanto por mil, para cada uno de los tres isótopos. Estos resultados mejoran los valores aconsejados en la técnica.

2.- En los estudios con la serie G1 y GT3 se observaron discriminaciones en función de la variedad y de la procedencia, pero no respecto al índice de madurez.

3.- Para las variedades ‘Hojiblanca’, ‘Picual’ y ‘Arbequina’, si fijamos el entorno geográfico de cultivo y el año de cosecha, en muestras de Córdoba se presentan las siguientes tendencias: $\delta^{13}\text{C}$ ‘Arbequina’ < $\delta^{13}\text{C}$ ‘Picual’ < $\delta^{13}\text{C}$ ‘Hojiblanca’. Esta tendencia se conserva para muestras de Tarragona (GT3).

En cuanto al Oxígeno, solo hay datos para muestras de Córdoba, siendo la tendencia:

$\delta^{18}\text{O}$ ‘Arbequina’ < $\delta^{18}\text{O}$ ‘Picual’ < $\delta^{18}\text{O}$ ‘Hojiblanca’

4.- Al comparar valores de $\delta^{18}\text{O}$ de las muestras de la serie H2 [10], se observa un enriquecimiento en el isótopo más pesado con la latitud.

5.- Los otros aceites vegetales estudiados, a excepción del de maíz que es del ciclo del C4, presentan valores de $\delta^{13}\text{C}$ similares a los de oliva, pero parece diferenciarse en los de $\delta^{18}\text{O}$. Esto podría ser interesante para detectar mezclas de aceites vegetales y de oliva.

6.- En la comparación de $\delta^{13}\text{C}$ vs SAFA para distintas Denominaciones de Origen andaluzas se puede observar una agrupación de las muestras de algunas DOP.

7.- Si se comparan los valores medios de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ para las variedades más frecuentes en nuestra comunidad (‘Hojiblanca’ y ‘Picual’), de la campaña 2005-2006, con los encontrados por F. Camin y colaboradores [11], para aceites italianos de diferentes regiones de la misma campaña, se observa que pueden diferenciarse los aceites de ambos países, siendo los aceites de la región Sur2 los que más se asemejan a los españoles. No obstante, con la ayuda de los tres isótopos, se pueden establecer diferencias entre los aceites españoles e italianos.

PRINCIPALES REFERENCIAS

- 1.- S. Kelly, I. Parker, M. Shaman, J. Dennis, I. Goodall. *Food Chem.*, 59 (1997) 181
- 2.- F. Angerosa, L. Camera, S. Cumitini, G. Gleixner, F. Reniero, *J. Agr. Food Chem.*, 45 (1997) 3044.
- 3.- J. T. Brenna, T. N. Corso, H. J. Tobias, R. J. Caimi. *Mass Spectrom. Rev.*, Vol: 16 (1997)227.
- 4.- C. M. Scrimgeour. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.*, Vol: 104 (2002)57
- 5.- H.W. Krueger, R.H. Reesman. *Mass Spectrom. Rev.*, Vol: 1 (1982)205.
- 6.- C. Guillou, M. Lipp, B. Radovic, F. Reniero, M. Schmidt, E. Anklam. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, Vol: 49(1999)329.
- 7.- G. Huerou, S.D. Kelly, M.J. Dennis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, Vol: 13 (1999)1257.
- 8.- M.A. Aramendía, A. Marinas, J.M. Marinas, E. Sánchez, J.M. Moreno, C. Guillou, M. Moalem, L. Rallo, F.J. Urbano. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, pp. 1457-1466.
- 9.- J. M. Martínez, E. Muñoz, J. Alba, A. Lanzón. "Informe sobre la utilización del analizador de rendimiento ABENCOR". *Grasas y Aceites* 26(6)- (1975) 379-385
- 10.- M. A. Aramendía, A. Marinas, J. M. Marinas, J. M. Moreno, M. Moalem, L. Rallo, F. J. Urbano. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, Vol: 21 (2007) 487-496.
- 11.- F. Camin, R. Larcher, M. Perini, L. Bomtempo, D. Bertoldi, G. Gagliano, G. Nicolini, G. Versini. *Food Chemistry* (2008).

Comunicación 5

*Trazabilidad de aceites de oliva andaluces mediante la aplicación
de la técnica IRMS.*

XXIII Reunión Nacional de Espectroscopia.

Córdoba, 20 septiembre 2012.

Póster.

Trazabilidad de aceites de oliva andaluces mediante la aplicación de la técnica IRMS

E. Sánchez-López*¹, A. Marinas¹, M.I. Sánchez-Rodríguez², J.M. Marinas¹, F.J. Urbano¹, J.M. Caridad²

¹Departamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Agroalimentario ceiA3; *g02saloe@uco.es.

²Dep. Estadística, Econometría, I.O., Org. Empresas y Ec. Aplicada, Universidad de Córdoba

Resumen

El aceite de oliva es el aceite vegetal comestible más importante en los países mediterráneos y Portugal. Es un aceite que alcanza precios elevados, por lo que es susceptible de sufrir adulteraciones, mezclándolo con otros aceites de calidad más baja, como girasol o soja, suponiendo, además de un fraude económico, un riesgo para la salud.

Actualmente existen métodos espectroscópicos capaces de garantizar la calidad de productos agroalimentarios, como es el aceite de oliva. Mediante estos métodos y la técnica IRMS, la cual constituye una variante de la Espectrometría de Masas, se pretende detectar la presencia de fraudes, así como la procedencia geográfica y varietal de los aceites. Para ello se utilizan los valores $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ (que ya han sido empleados en otros estudios para establecer la trazabilidad de otros alimentos) aplicados a aceites andaluces de cinco campañas consecutivas.

Trazabilidad de aceites de oliva andaluces mediante la aplicación de la técnica IRMS

E. Sánchez-López^{*1}, A. Marinas¹, M.I. Sánchez-Rodríguez², J.M. Marinas¹, F.J. Urbano¹, J.M. Caridad²

¹Departamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Agroalimentario ceiA3; *g02saloe@uco.es.

²Dep. Estadística, Econometría, I.O., Org. Empresas y Ec. Aplicada, Universidad de Córdoba

Introducción

El aceite de oliva es el aceite vegetal comestible más importante en los países mediterráneos y Portugal. Es un aceite apreciado por su sabor y sus beneficios sobre la salud. En el mercado alcanza precios elevados, por lo que es susceptible de sufrir adulteraciones, mezclándolo con otros aceites de calidad más baja, como girasol o soja, suponiendo, además de un fraude económico, un riesgo para la salud.

La aplicación de métodos espectroscópicos (NIR, MIR y RAMAN, RMN de ¹³C y de ¹H) y la técnica de IRMS (Espectrometría de Masas de Isótopos Estables, del inglés “Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry”), combinada con tratamientos estadísticos, son las técnicas emergentes en el campo de la química de la calidad del aceite de oliva para garantizar su calidad.

Objetivos

El objetivo de nuestro trabajo es crear una base de datos de aceites de oliva, principalmente andaluces, que permita discriminar entre variedades, procedencia geográfica, Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) y, a su vez, evitar fraudes.

Hasta el comienzo de este estudio, había poca bibliografía referida a la trazabilidad de aceites de oliva. La que existía se refería a detección de fraudes [1,2] y estaba poco estudiada la identificación del origen geográfico de los aceites mediante relaciones isotópicas. Para ello se utilizan los valores $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ (que ya han sido empleados en otros estudios para establecer la trazabilidad de otros alimentos, tales como vinos, miel o zumos [3-6]), junto con datos procedentes de otras técnicas (NIR, RMN [7], Raman).

Materiales y métodos

La técnica IRMS constituye una variante de la Espectrometría de Masas que tiene por objeto la medida, con una alta exactitud y precisión, de las variaciones en la abundancia isotópica natural de los isótopos estables ligeros de C, O, H, N, S en muy diversos tipos de muestras. Los valores isotópicos obtenidos mediante la técnica IRMS se expresan mediante la llamada “notación en delta”, expresada en tanto por mil. Como patrones, se suelen emplear el VSMOW (valor medio del oxígeno en agua oceánica) para el oxígeno e hidrógeno y la VPDB (Belemnita de Pee Dee –un carbonato-) para el carbono. El equipo

utilizado para el análisis de masas de isótopos es un Delta Plus XL, de Thermo Finnigan. Atendiendo a la manera de preparar la muestra se distingue entre:

- a) “EA-IRMS”: Se utiliza para determinar C tras quemar la muestra en un analizador elemental.
- b) “Py-IRMS”, también conocida como técnica “TC/EA-IRMS”: se emplea para la determinación de oxígeno e hidrógeno por formación de CO y H₂, respectivamente, mediante un proceso de pirólisis (“pyrolysis”).

Se dispone de muestras representativas de aceites andaluces de cinco campañas agrícolas (desde la campaña 2004-2005 hasta la campaña 2008-2009) con trazabilidad garantizada y aseguramiento de pureza varietal y el mismo entorno climático (bancos de Germoplasma de Córdoba (G) y banco de Germoplasma de Tarragona (GT)), multivarietales con una variedad predominante, ‘Hojiblanca’ o ‘Picual’ (muestras procedentes de la Cooperativa Hojiblanca (H) y de distintas Denominaciones de Origen (DO)), muestras de la variedad ‘Picual’ cultivadas a distintas altitudes (A), entre 117m y 935 m y muestras de aceites vegetales (V) distintos a los aceites de oliva.

Resultados

- 1.- Se han puesto a punto diversas técnicas para la determinación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$.
- 2.- Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ para las variedades ‘Hojiblanca’, ‘Picual’ y ‘Arbequina’, si fijamos el entorno geográfico de cultivo y el año de cosecha, presentan las siguientes tendencias: ‘Arbequina’ < ‘Picual’ < ‘Hojiblanca’.
- 3.- Los otros aceites vegetales estudiados, a excepción del de maíz que es del ciclo del C₄, presentan valores de $\delta^{13}\text{C}$ similares a los de oliva, pero parecen diferenciarse en los de $\delta^{18}\text{O}$. Esto podría ser interesante para detectar mezclas de aceites vegetales y de oliva.
- 4.- Representando $\delta^{13}\text{C}$ vs SAFA (contenido de los aceites en ácidos grasos saturados) para distintas Denominaciones de Origen andaluzas se puede observar una agrupación de la muestras de algunas DOP.
- 5.- Si se comparan los valores medios de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ de muestras andaluzas con los encontrados por F. Camin y colaboradores [8], para aceites italianos de diferentes regiones de la misma campaña, se pueden establecer diferencias entre los aceites españoles e italianos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de la Junta de Andalucía (Proyecto P08-FQM-3931) y Fondos FEDER.

Referencias

- 1.- Kelly, S., Parker, I., Shaman, M., Dennis, J., Goodall, I. *Food Chem.*, **59**, 181-186 (1997).
- 2.- Angerosa, F., Camera, L., Cumitini, S., Gleixner, G., Reniero, F. *J. Agr. Food Chem.*, **45**, 3044-3048 (1997).
- 3.- Brenna, J. T., Corso, T. N., Tobias, H. J., Caimi, R. J. *Mass Spectrom. Rev.*, **16**, 227-258 (1997).
- 4.- Scrimgeour, C. M. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.*, **104**, 57-59 (2002).
- 5.- Krueger, H.W., Reesman, R.H. *Mass Spectrom. Rev.*, **1**, 205-236 (1982).
- 6.- Guillou, C., Lipp, M., Radovic, B., Reniero, F., Schmidt, M., Anklam, E. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **49**, 329-335 (1999).
- 7.- Aramendia, M.A., Marinas, A., Marinas, J.M., Sánchez, E., Moreno, J.M., Guillou, C., Moalem, M., Rallo, L., Urbano, F.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 1457-1466 (2010).
- 8.- Camin, F., Larcher, R., Perini, M., Bontempo, L., Bertoldi, D., Gagliano, G., Nicolini, G., Versini, G. *Food Chem.*, **118**, 901-909 (2008).

INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva es el aceite vegetal comestible más importante en los países mediterráneos y Portugal. Es un aceite apreciado por su sabor y sus beneficios sobre la salud. En el mercado alcanza precios elevados, por lo que es susceptible de sufrir adulteraciones, mezclándolo con otros aceites de calidad más baja, como girasol o soja, suponiendo, además, de un fraude económico, un riesgo para la salud. La aplicación de métodos espectroscópicos (NIR, MIR y RAMAN, RMN de ¹³C y de ¹H) y la técnica de IRMS (Espectrometría de Masas de Isótopos Estables, del inglés "Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry"), combinada con tratamientos estadísticos, son las técnicas emergentes en el campo de la química del aceite de oliva para garantizar su calidad. El objetivo de nuestro trabajo es crear una base de datos de aceites de oliva, principalmente andaluces, que permita discriminar entre variedades, procedencia geográfica, Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) y, a su vez, evitar fraudes. Hasta el comienzo de este estudio, había poca bibliografía referida a la trazabilidad de aceites de oliva. La que existía se refería a detección de fraudes [1,2] y estaba poco estudiada la identificación del origen geográfico de los aceites mediante relaciones isotópicas. Para ello se utilizan los valores $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ (que ya han sido empleados en otros estudios para establecer la trazabilidad de otros alimentos, tales como vinos, miel o zumos [3-6]), junto con datos procedentes de otras técnicas (NIR, RMN [7], Raman).

MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica IRMS es una variante de la Espectrometría de Masas que tiene por objeto la medida, con una alta exactitud y precisión, de las variaciones en la abundancia isotópica natural de los isótopos estables ligeros de C, O, H, N, S en muy diversos tipos de muestras. Los valores isotópicos obtenidos mediante la técnica IRMS se expresan mediante la llamada "notación de delta", expresada en tanto por mil.

El equipo utilizado para el análisis de masas de isótopos es Delta Plus XL, de Thermo Finnigan (Figura 1). Atendiendo a la manera de preparar la muestra se distingue entre:

- a) "EA-IRMS": Se utiliza para determinar C tras quemar la muestra en un analizador elemental (Figura 2).
- b) "Py-IRMS", también conocida como "TC/EA-IRMS": se emplea para la determinación de oxígeno e hidrógeno por formación de CO y H₂, respectivamente, mediante un proceso de pirólisis (Figura 3).

Se dispone de muestras representativas de aceites andaluces de cinco campañas agrícolas (desde la campaña 2004-2005 hasta la campaña 2008-2009) con trazabilidad garantizada y aseguramiento de pureza varietal y el mismo entorno climático (bancos de Germoplasma de Córdoba (G) y banco de Germoplasma de Tarragona (GT)), multivarietales con una variedad predominante, 'Hojiblanca' o 'Picual' (muestras procedentes de la Cooperativa Hojiblanca (H) y de distintas Denominaciones de Origen (DO)), muestras de la variedad 'Picual' cultivadas a distintas altitudes (A), entre 117m y 935 m y muestras de aceites vegetales (V) distintos a los aceites de oliva.

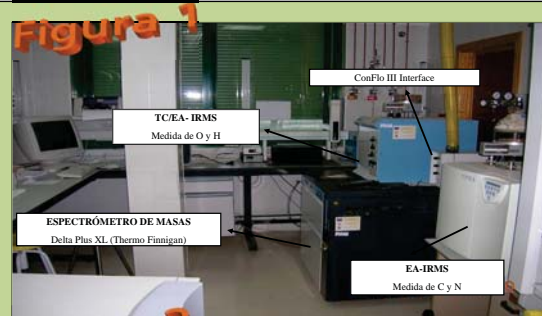


Fig.1. Laboratorio de isótopos estables en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba

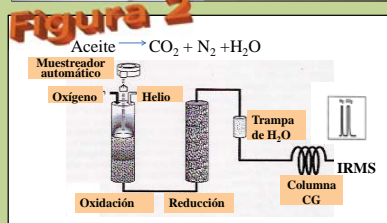
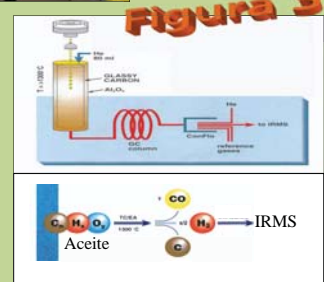


Fig.2. Determinación del contenido isotópico en C y N mediante la técnica EA-IRMS
 Fig.3. Determinación del contenido isotópico en H y O mediante la técnica TC/EA-IRMS.



RESULTADOS

- Se han puesto a punto diversas técnicas para la determinación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$.
- Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ para las variedades 'Hojiblanca', 'Picual' y 'Arbequina', si fijamos el entorno geográfico de cultivo y el año de cosecha, presentan las siguientes tendencias: 'Arbequina' < 'Picual' < 'Hojiblanca' (Figura 4).
- Los otros aceites vegetales estudiados, a excepción del de maíz que es del ciclo del C4, presentan valores de $\delta^{13}\text{C}$ similares a los de oliva, pero parecen diferenciarse en los de $\delta^{18}\text{O}$. Esto podría ser interesante para detectar mezclas de aceites vegetales y de oliva (Figura 5).
- Representando SAFA (contenido de los aceites en ácidos grasos saturados) vs $\delta^{13}\text{C}$ para distintas Denominaciones de Origen andaluzas se puede observar una agrupación de las muestras de algunas DOP (Figura 6).
- Si se comparan los valores medios de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ de muestras andaluzas con los encontrados por F. Camin y colaboradores [8], para aceites italianos de diferentes regiones de la misma campaña, se pueden establecer diferencias entre los aceites españoles e italianos. Además, los aceites de la región Sur 2 los que más se asemejan a los andaluces, debido a que presentan una latitud parecida (Figura 7).

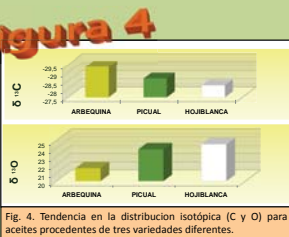


Fig. 4. Tendencia en la distribución isotópica (C y O) para aceites procedentes de tres variedades diferentes.

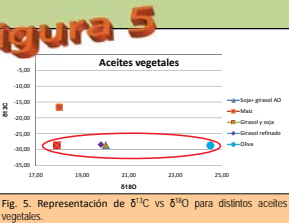


Fig. 5. Representación de $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{18}\text{O}$ para distintos aceites vegetales.

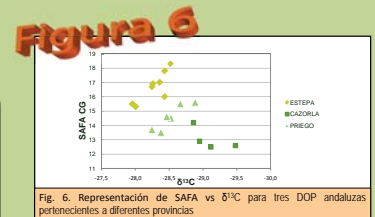


Fig. 6. Representación de SAFA vs $\delta^{13}\text{C}$ para tres DOP andaluzas pertenecientes a diferentes provincias

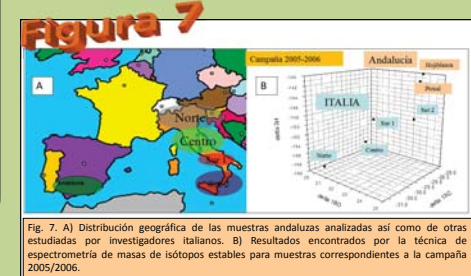


Fig. 7. A) Distribución geográfica de las muestras andaluzas analizadas así como de otras estudiadas por investigadores italianos. B) Resultados encontrados por la técnica de espectrometría de masas de isótopos estables para muestras correspondientes a la campaña 2005/2006.

REFERENCIAS:

- Kelly, S., Parker, I., Shaman, M., Dennis, J., Goodall, I. *Food Chem.*, **59**, 181-186 (1997).
- Angerosa, F., Camera, L., Cumitini, S., Gleixner, G., Reniero, F. *J. Agr. Food Chem.*, **45**, 3044-3048 (1997).
- Brenna, J. T., Corso, T. N., Tobias, H. J., Caiami, R. J. *Mass Spectrom. Rev.*, **16**, 227-258 (1997).
- Scrimgeour, C. M. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.*, **104**, 57-59 (2002).
- Krueger, H.W., Reesman, R.H. *Mass Spectrom. Rev.*, **1**, 205-236 (1982).
- Guillou, C., Lipp, M., Radovic, B., Reniero, F., Schmidt, M., Anklam, E. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **49**, 329-335 (1999).
- Aramendía, M.A., Marinas, A., Marinas, J.M., Sánchez, E., Moreno, J.M., Guillou, C., Moalem, M., Rallo, L., Urbano, F.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 1457-1466 (2010).
- Camin, F., Larcher, R., Perini, M., Bontempo, L., Bertoldi, D., Gagliano, G., Nicolini, G., Versini, G. *Food Chem.*, **118**, 901-909 (2008).

AGRADECIMIENTOS: Los autores agradecen la financiación de la Junta de Andalucía (Proyectos P08-FQM-3931, P07-FQM-02695 y P09-FQM-4781), MICINN (CTQ2008-01330) y Fondos FEDER.

Comunicación 6

Estudio comparativo de ácidos grasos obtenidos por RMN (1H y ^{13}C) en aceites de oliva andaluces.

XVI Simposium Científico-Técnico de Expoliva.

Jaén, 9 mayo 2013.

Póster.

Estudio comparativo del contenido en ácidos grasos, en aceites de oliva andaluces, obtenido por RMN (¹H Y ¹³C)

Elena Sánchez López^{1*}, M^a Isabel Sánchez Rodríguez², Alberto Marinas¹, José M^a Caridad², Francisco J. Urbano Navarro¹, José M^a Marinas¹, Victoriano Borau¹

¹Dpto. Química Orgánica de la Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, 14014 Córdoba. España. (*): e-mail: g02saloe@uco.es

²Dpto. Estadística, Econometría, I.O., Org. Empresas y Ec. Aplicada, Universidad de Córdoba

RESUMEN

En este trabajo se comparan distintos métodos para el cálculo de ácidos grasos (SAFA, MUFA y PUFA) de aceites de oliva vírgenes extra, procedentes de las distintas Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) andaluzas, mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (¹H) y de carbono 13 (¹³C). Para ello, se estudian los errores cuadráticos medios (MSC) para cada una de las cuatro zonas espectrales seleccionadas (una para el protón y tres para el carbono) y cada una de las familias de ácidos grasos (SAFA, MUFA Y PUFA) y se hace un análisis de las estimaciones propuestas.

Palabra clave: *Resonancia Magnética Nuclear, Denominaciones de Origen Protegidas, Aceite de oliva virgen, Error cuadrático medio.*

INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva virgen extra es un aceite comestible muy apreciado por su sabor y sus beneficios sobre la salud. Son los países mediterráneos (España, Italia, Grecia, Turquía, Túnez y Marruecos) y Portugal los que abarcan el 90% de la producción mundial, siendo España e Italia los mayores productores y consumidores. Dentro de España, Andalucía produce el 80% del producto nacional. Al ser un aceite obtenido a partir del fruto de la oliva únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos, presenta un elevado precio en el mercado, lo cual lo hace susceptible de sufrir adulteraciones con otros aceites de menor valor (girasol, soja, maíz, aceites de oliva refinados...). Esto, junto con la emergencia de aceites procedentes de Denominaciones de Origen Protegidas, hace necesario buscar métodos analíticos rápidos, fiables, económicos y que precisen poca o nula manipulación de la muestra. En este sentido, desde hace varios años venimos elaborando una base de datos de aceites de oliva virgen extra empleando diversas técnicas espectroscópicas como IR, Raman, IRMS o RMN. Esta última técnica, tanto de ¹³C como de ¹H, combinada con la estadística asistida por ordenador permite extraer gran cantidad de información de sus espectros. En esta ocasión, nos centramos en la búsqueda de la técnica y zona del espectro que nos permite la determinación del contenido del aceite en ácidos grasos de una manera más precisa. Como técnica de referencia se emplea la cromatografía de gases.

La composición del aceite de oliva depende del tipo y de la distribución de los ácidos grasos presentes en los triglicéridos y de las posiciones en las que éstos ácidos grasos están unidos a la cadena principal del glicerol. Los principales ácidos grasos presentes en los triglicéridos de aceites vegetales son oleico, linoleico, linolénico, mirístico, palmítico y esteárico. Estos tres últimos se clasifican como Saturados (SAFA), el oleico como Monoinsaturado (MUFA) y linoleico y linolénico como Poliinsaturados (PUFA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han analizado 128 muestras de aceite de oliva virgen extra procedentes de distintas DOP andaluzas (Estepa, Sierra de Cazorla, Priego de Córdoba, Poniente de Granada, Montoro-Adamuz, Antequera y Sierra de Cádiz) (Gráfico 1), correspondientes a cuatro campañas consecutivas (2007-2008 a 2010-2011), presentando un índice de madurez de 3. Las variedades estudiadas son, principalmente, 'Arbequina', 'Hojiblanca', 'Picual', 'Lechín', 'Manzanilla', 'Picudo' y 'Royal'.

Para todas las muestras se obtuvieron los espectros de ¹³C y de ¹H y se calculó el contenido en ácidos grasos (SAFA, MUFA y PUFA).

Existen distintas formas de calcular los ácidos grasos mediante ¹H RMN [1-4]. En nuestro caso, los mejores resultados fueron obtenidos por el método de Guillén y Ruiz [1], el cual determina los ácidos grasos *saturados* (Palmítico y Esteárico, principalmente), *monoinsaturados* (Oleico, principalmente), Linoleico y Linolénico (designados como S, O, L y Ln), a partir de las siguientes expresiones:

$$Ln (\%) = 100 [B / (A + B)]$$

$$L (\%) = 100 [(E / D) - 2[B / (A + B)]]$$

$$O (\%) = 100 [(C / 2D) - (E / D) + [B / (A + B)]]$$

$$S (\%) = 100 [1 - (C / 2D)]$$

Donde A es el área de la señal correspondiente a los hidrógenos de los metilos de todos los ácidos menos el Linolénico, B el área de la señal correspondiente a los hidrógenos del metilo del Linolénico, C el área de la señal correspondiente al área de los hidrógenos de los metilenos alílicos, (o alfa olefínicos), D es el área de los hidrógenos de los grupos metileno en α respecto al carbonilo y E el área de los metilenos bisalílicos (o dialílicos) (Gráfico 2).

La determinación de ácidos grasos en el espectro de ¹³C RMN (Gráfico 3) se lleva a cabo en tres zonas distintas:

1. Zona carbonílica: Desde 172 a 174 ppm. En esta zona los triglicéridos aparecen en dos grupos: las cadenas que esterifican las posiciones 1 y 3 del glicerol aparecen a desplazamiento químico mayores (mayor valor de ppm) que las que lo hacen en la posición 2 del mismo, debido a que los grupos C=O de la posición 2 experimentan dos interacciones "y gauche" mientras que los de las posiciones 1 y 3 sólo una. En el grupo de señales de las posiciones 1 y 3 aparecen, de mayor a menor valor de ppm, la señal de los ácidos saturados (palmítico y esteárico, principalmente), un pequeño pico asignado a los ácidos Vaccénico (presente únicamente en aceites de oliva) y Gadoleico, una señal intensa que se corresponde con ácido Oleico y una cuarta señal correspondiente al ácido Linoleico. En esta región, el ácido Linoléico que se encuentra en proporciones inferiores al 1% no se separa de la señal del Linoleico. Los ácidos en posición 2 del glicerol aparecen a menos desplazamiento químico observándose dos señales debidas al ácido Oleico y al Linoleico (Gráfico 3).
2. Zona C16: Esta zona aparece entre 31 y 32 ppm y en ella se presentan señales para los ácidos grasos Saturados, Oleico, Vaccénico y Linoleico (Gráfico 4).
3. Zona carbonos alifáticos: Esta es la zona de las regiones metilo y metileno de carbono, comprendiendo desde 10 a 35 ppm. Las señales utilizadas para el cálculo de los ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA son A, B', D, E y F [5] (Gráfico 5).

Se pretende utilizar procedimientos estadísticos para estimar, utilizando la información que proporcionan las cuatro zonas espectrales (las tres obtenidas de las zonas carbonílica, carbono 16 y carbonos alifáticos del espectro ¹³C RMN y la asociada al espectro ¹H RMN), el contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA de las muestras de aceite, utilizando como referencia los valores obtenidos por cromatografía de gases (técnica clásica).

Inicialmente, se establece la notación que será utilizada. Tal y como se ha indicado anteriormente en el proceso de adquisición de datos, se han observado aceites pertenecientes a $i=1,2,\dots,7$ denominaciones de origen protegidas, DOP (Estepa –E-, Sierra de Cazorla –SCz-, Priego de Córdoba –PC-, Poniente de Granada –PG-, Montoro-Adamuz –MA-, Antequera –A, Sierra de Cádiz –SCd-) extrayéndose, en cada caso, una muestra de tamaño n_i : $n_1=16$, $n_2=8$, $n_3=12$, $n_4=24$, $n_5=28$, $n_6=28$, $n_7=12$ (en total, $N=128$ aceites observados).

Para cada aceite se conoce el contenido en ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA proporcionado por cromatografía de gases y por las $k=1,2,3,4$ zonas RMN (véase Tabla 1).

Para el posterior tratamiento de los datos, la matriz referida en la Tabla 1 será subdividida en cajas, cuyos elementos se denotarán de la forma indicada en la Tabla 2. Los subíndices de los elementos indican, respectivamente, la DOP (i), la zona RMN (k) y la posición en la submuestra de la DOP (j). Los superíndices S , M , P hacen referencia a los ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA.

Teniendo en cuenta esta notación, los errores cuadráticos medios que se producen al estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA obtenido mediante cromatografía de gases mediante los respectivos contenidos proporcionados por las cuatro zonas RMN tienen las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned}MSE_k^S &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^7 \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^S - x_{i,k,j}^S \right)^2, \\MSE_k^M &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^7 \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^M - x_{i,k,j}^M \right)^2, \\MSE_k^P &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^7 \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^P - x_{i,k,j}^P \right)^2, \\& k=1,2,3,4\end{aligned} \quad (1)$$

Y las expresiones que diferencian entre DOP son:

$$\begin{aligned}MSE_{i,k}^S &= \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^S - x_{i,k,j}^S \right)^2, \\MSE_{i,k}^M &= \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^M - x_{i,k,j}^M \right)^2, \\MSE_{i,k}^P &= \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \left(y_{i,j}^P - x_{i,k,j}^P \right)^2, \\& i=1,\dots,7, j=1,\dots,n_i\end{aligned} \quad (2)$$

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La Tabla 3 presenta el error cuadrático medio cometido al estimar el contenido de cada uno de los tres tipos de ácidos grasos y mediante cada una de las técnicas RMN. Se presentan los resultados totales y los obtenidos en cada DOP.

A continuación, se indicarán las sucesivas formas propuestas para estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA de los diversos aceites (usando los valores obtenidos mediante cromatografía de gases como referencia) empleando la información proporcionada mediante RMN.

Estimación 1. Usando la zona carbono 16 del espectro ¹³C RMN

A partir de la Tabla 3 puede observarse que, si bien los resultados son diferentes en cada DOP, los mejores resultados totales se obtienen al estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA utilizando la zona carbono 16 del espectro RMN ($MSE_2^S = 5,278$, $MSE_2^M = 4,792$, $MSE_2^P = 0,938$). En tal caso, la primera estimación que se propone para predecir el contenido en ácidos grasos del aceite pasa con considerar la estimación que proporciona el espectro RMN en la zona carbono 16, dado que proporciona un menor error cuadrático medio:

$$\hat{y}_{i,j}^{1S} = x_{i,2,j}^S,$$

$$\hat{y}_{i,j}^{1M} = x_{i,2,j}^M,$$

$$\hat{y}_{i,j}^{1P} = x_{i,2,j}^P,$$

$$i = 1, \dots, 7, \quad j = 1, \dots, n_i$$

Estimación 2. Usando el promedio de los valores obtenidos por cada una de las cuatro técnicas RMN

A la vista del Gráfico 6, parece intuirse que un promedio de las estimaciones obtenidas por las cuatro técnicas RMN podría proporcionar una estimación más próxima al valor de referencia obtenido por CG (dado que unas estimaciones difieren por exceso y otras por defecto del valor observado por CG). Además, este procedimiento permite utilizar toda la información estadística que el espectro ¹H y el espectro ¹³C (en sus tres zonas) proporcionan. De este modo, la segunda aproximación que se considera para estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA es:

$$\hat{y}_{i,j}^{2S} = \frac{1}{4} \sum_{k=1}^4 x_{i,k,j}^S,$$

$$\hat{y}_{i,j}^{2M} = \frac{1}{4} \sum_{k=1}^4 x_{i,k,j}^M,$$

$$\hat{y}_{i,j}^{2P} = \frac{1}{4} \sum_{k=1}^4 x_{i,k,j}^P,$$

$$i = 1, \dots, 7, \quad j = 1, \dots, n_i$$

Por otra parte, si se considera al error cuadrático medio como una medida (inversamente proporcional) de la precisión obtenida al estimar el contenido en cada uno de los ácidos por cada una de las técnicas (y en cada DOP), una estimación más acertada que la proporcionada anteriormente se obtiene al realizar el promedio ponderando los valores por el inverso del error cuadrático medio obtenido en cada caso.

Llevar a la práctica este procedimiento no sería factible dado que la estimación que se propone requeriría conocer los valores del error cuadrático medio para cada ácido y cada zona, y este hecho conllevaría conocer los valores de SAFA, MUFA y PUFA obtenidos mediante cromatografía de gases, técnica considerada de referencia (es decir, para obtener esta estimación del valor real es necesario conocer el valor real; por tanto, carece de sentido proporcionar una estimación).

De manera alternativa, se propone reservar aproximadamente un 20% de los aceites observados (en total, 26 de los 128, considerando la representatividad de las distintas DOP). Después, obtener los errores cuadráticos medios (de ajuste o calibración) para cada ácido y zona usando el 80% de los datos restantes (102). Finalmente, utilizar estos errores cuadráticos medios para corregir las estimaciones proporcionadas mediante el 20% de los datos restantes. Siempre y cuando la muestra considerada (muestra piloto) fuese representativa de la población de aceites (y las submuestras representativas de las diferentes DOP consideradas) estos errores se podrían considerar estimaciones de los errores cuadráticos medios que se cometerían al estimar cada tipo de ácido, por cada técnica y en cada DOP y podrían utilizarse para ponderar los datos en predicciones posteriores en el sentido que a continuación se propone.

En adelante, se denotará por n'_i ($i = 1, 2, \dots, 7$) al tamaño de submuestra relativa a la DOP i utilizada para calibración ($N' = \sum_{i=1}^7 n'_i$) y, por tanto, $n_i - n'_i$ representa el número de observaciones reservadas para predicción, en cada caso. Las observaciones han sido seleccionadas aleatoriamente en cada DOP y, buscando la representatividad de la muestra total, se han seleccionado aproximadamente un 20% de aceites por DOP, que suponen también aproximadamente un 20% sobre el total. Así, $n'_1 = 13$, $n'_2 = 6$, $n'_3 = 10$, $n'_4 = 19$, $n'_5 = 22$, $n'_6 = 22$, $n'_7 = 10$, $N' = 102$.

Los errores cuadráticos medios de calibración (calculados usando expresiones similares a las determinadas en (1), empleando la muestra de tamaño N' y las submuestras de tamaño n'_i) para cada técnica y tipo de ácido se denotan mediante $MSEC_k^S$, $MSEC_k^M$, $MSEC_k^P$ ($k = 1, 2, 3, 4$) y las expresiones de calibración que diferencian entre DOP (con expresiones similares a las recogidas en

(2) se denotan por $MSEC_{i,k}^S$, $MSEC_{i,k}^M$, $MSEC_{i,k}^P$
 ($i = 1, 2, \dots, 7$, $k = 1, 2, 3, 4$)

Estimación 3. Usando el promedio ponderado de los valores obtenidos por cada una de las cuatro zonas RMN, con pesos inversamente proporcionales al MSEC total cometido en cada caso.

En este caso, teniendo en cuenta todos los comentarios anteriores, las observaciones reservadas para predicción serán ponderadas inversamente por el error cuadrático medio de calibración obtenido para cada tipo de técnica RMN y ácido:

$$\hat{y}_{i,j}^{3S} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{X_{i,k,j}^S}{MSEC_k^S}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_k^S}}$$

$$\hat{y}_{i,j}^{3M} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{X_{i,k,j}^M}{MSEC_k^M}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_k^M}}$$

$$\hat{y}_{i,j}^{3P} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{X_{i,k,j}^P}{MSEC_k^P}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_k^P}}$$

$$i = 1, \dots, 7, \quad j = 1, \dots, n_i - n_i'$$

Estimación 4. Usando el promedio ponderado de los valores obtenidos por cada una de las cuatro zonas RMN, con pesos inversamente proporcionales al MSEC cometido, para cada DOP, en cada caso.

En este caso, teniendo en cuenta que se conoce la DOP (entre las 7 posibles) a la que pertenece un aceite, puede considerarse que la precisión en las estimaciones por cada zona puede diferir según la DOP considerada. De este modo, en este caso se considera como estimación del contenido en los diversos ácidos SAFA, MUFA y PUFA el promedio ponderado, donde cada observación está acompañada de un peso inversamente proporcional al error cuadrático medio de calibración existente, para cada tipo de ácido, en su DOP de procedencia:

$$\hat{y}_{i,j}^{4S} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{X_{i,k,j}^S}{MSEC_{i,k}^S}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_{i,k}^S}}$$

$$\hat{y}_{i,j}^{4M} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{X_{i,k,j}^M}{MSEC_{i,k}^M}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_{i,k}^M}}$$

$$\hat{y}_{i,j}^{4P} = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{X_{i,k,j}^P}{MSEC_{i,k}^P}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{MSEC_{i,k}^P}}$$

$$i = 1, \dots, 7, \quad j = 1, \dots, n_i - n_i'$$

Finalmente, para cada estimación propuesta (y tipo de ácido) pueden calcularse los errores cuadráticos medios de predicción mediante la expresión genérica:

$$MSEP = \frac{1}{N - N'} \sum_{i=1}^7 \sum_{j=1}^{n_i - n_i'} (y_{i,j} - \hat{y}_{i,j})^2,$$

o bien distinguiendo entre DOP:

$$MSEP_i = \frac{1}{n_i - n_i'} \sum_{j=1}^{n_i - n_i'} (y_{i,j} - \hat{y}_{i,j})^2, \quad i = 1, 2, \dots, 7$$

La Tabla 4 muestra los errores cuadráticos medios de predicción que se obtienen al estimar cada tipo de ácido empleando cada zona. Se han considerado los MSEP referidos a las cuatro estimaciones propuestas -E1, E2, E3, E4- y además los que se obtienen al emplear las técnicas RMN directamente (que no difieren significativamente de los MSE, recogidos en la Tabla 3, calculados al considerar el 100% de los datos). La mejor estimación se obtiene al realizar el promedio ponderado de los valores obtenidos mediante las cuatro zonas RMN, empleando como pesos los inversos de los MSEC para cada ácido y DOP. Esta conclusión es lógica, dado que este último estimador es el que consigue emplear toda la información que los datos disponibles proporcionan, contemplando todas sus fuentes de variabilidad conocidas.

Estos resultados son confirmados a la vista del Gráfico 7 donde se representan los errores cuadráticos medios de predicción acumulados para cada técnica en el caso en que se predice el contenido en ácidos MUFA (porcentaje mayoritario). Para los ácidos SAFA y PUFA se obtendrían representaciones similares.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero a la Junta de Andalucía (Proyectos P08-FQM-3931, P07-FQM-02695 y P09-FQM-4781) y Fondos FEDER.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Guillén MD., Ruiz A. Eur J.Lipid. Sci. Technol. 2003; 105: 688.
 [2] Vlahov G. Prog. Nucl. Mag. Res. Spectr. 1999; 35: 341.
 [3] Knothe G., Kenar JA. Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 2004; 106: 88.

[4] Barison A, da Silva CW. Magn. Reson. Chem. 2010; 48:642.
 [5] Miyake Y., Yokomizo K. J. Am. Oil Chemistry Soc.1998; 75: 9.

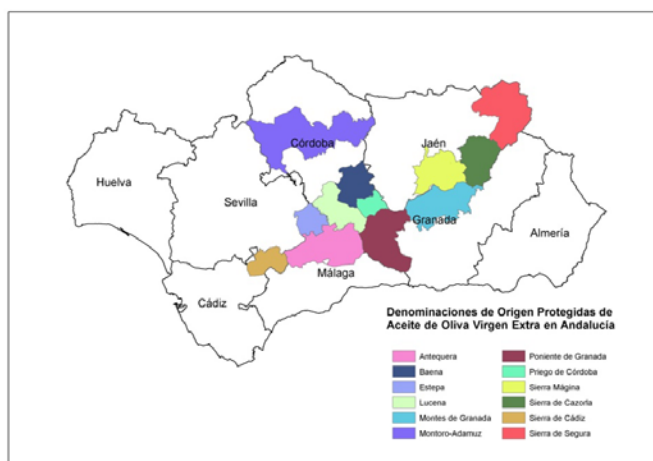


Gráfico 1. Distintas DOP andaluzas

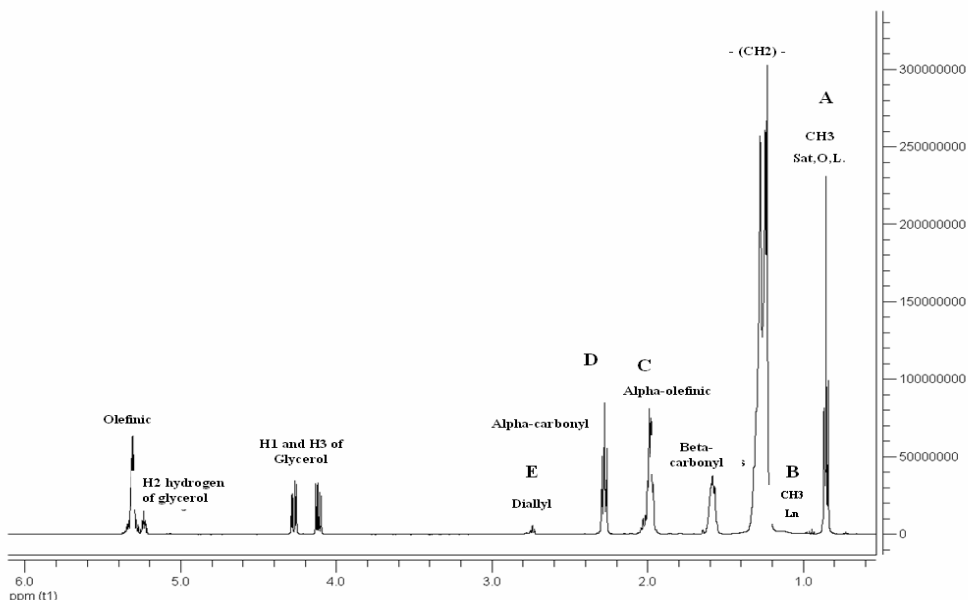


Gráfico 2. Espectro de RMN ¹H de aceite de oliva virgen extra, obtenido a 500 MHz.

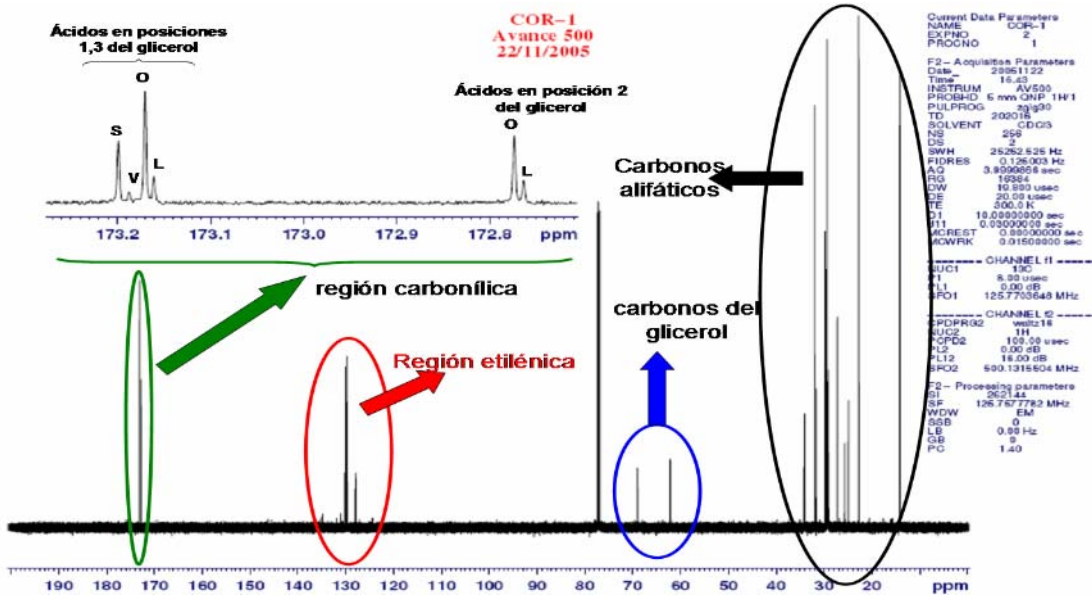


Gráfico 3. Espectro de RMN ¹³C de un aceite de oliva virgen extra, obtenido a 127.55 MHz.

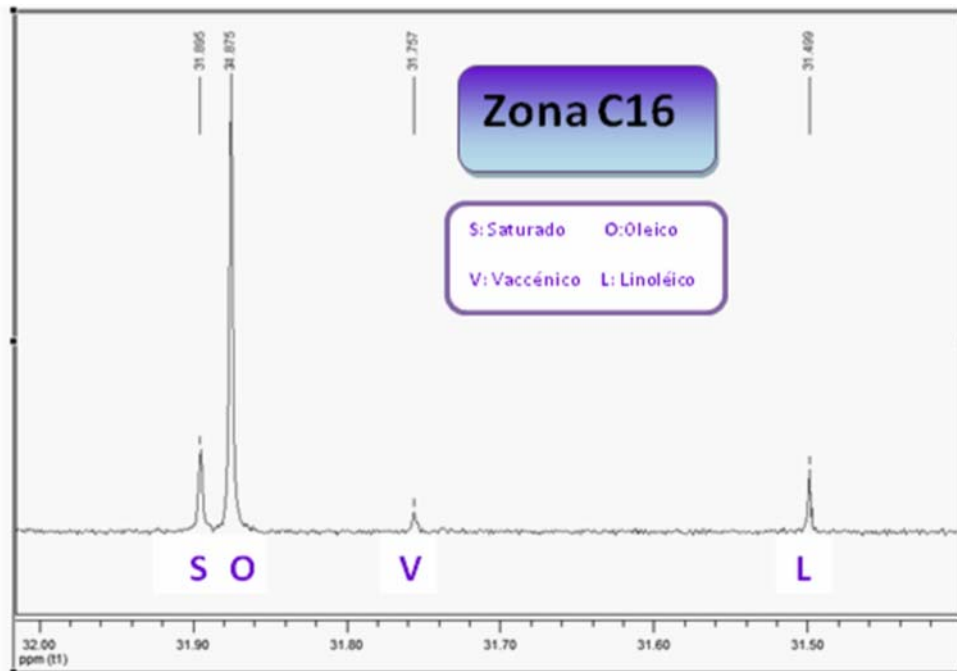


Gráfico 4. Zona C16 del espectro de RMN ¹³C de una aceite de oliva virgen extra.

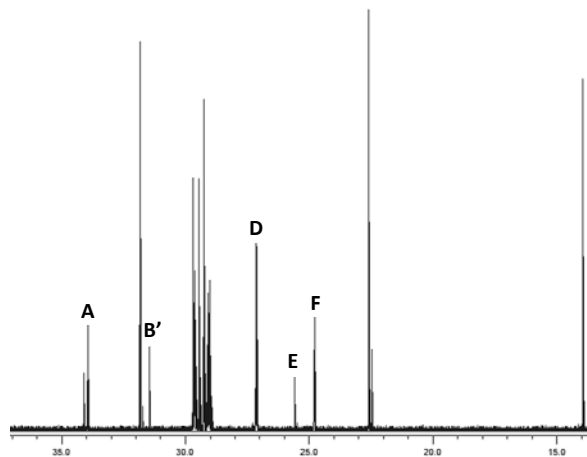


Gráfico 5. Zona C16 del espectro de RMN ¹³C de aceite de oliva virgen extra.

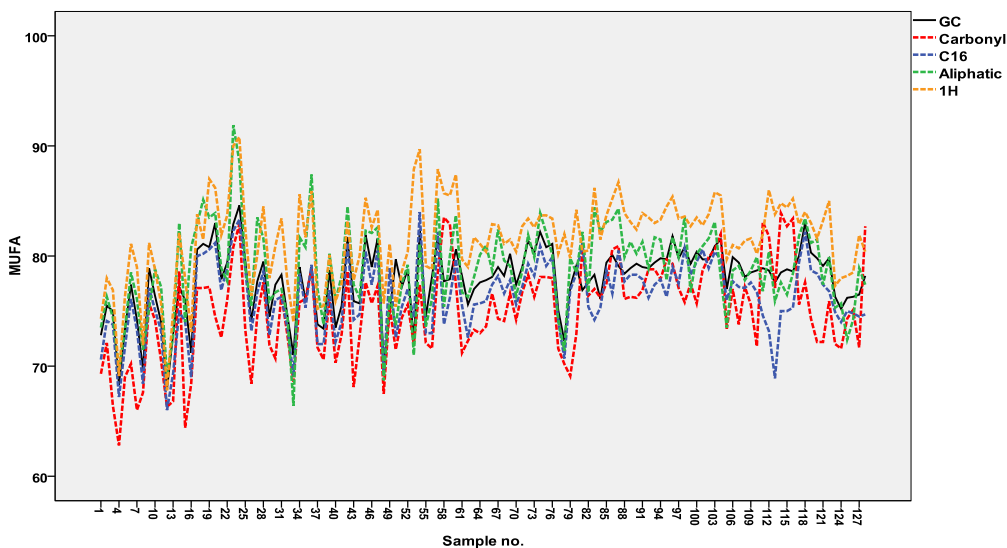


Gráfico 6. Contenido en MUFA obtenido mediante CG y las cuatro técnicas RMN

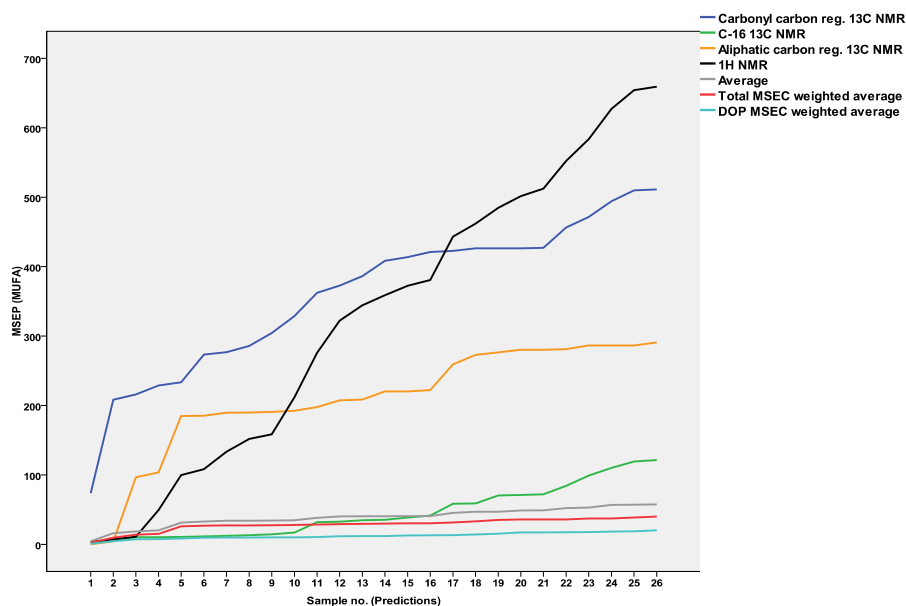


Gráfico 7. MSEP acumulado para el contenido en MUFA para cada técnica de estimación empleada

	CG			13C NMR									1H NMR		
				Carbonyl			C-16			Aliphatic					
	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
E	17	72,8	10,1	17,1	69,3	13,6	19,08	70,57	10,3	17,6	73,5	8,86	16,6	74,3	9,06
	15,5	75,5	9,1	16,1	72,1	11,8	17,04	74,05	8,9	15,7	76,3	8,04	14,2	78	7,85
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
SCz	16,7	71,2	12,1	18	68,4	13,5	18,96	68,96	12,1	9,9	80,8	9,3	17,7	73,1	9,2
	12,5	80,6	6,8	12,7	77,1	10,2	13,64	79,97	6,39	11,7	82,9	5,39	10,7	83,8	5,57
	14,2	81,1	4,8	14,3	77,1	8,54	15,18	80,2	4,62	11	85,1	3,82	14,6	81,5	3,86
SCd	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	11,8	84,6	3,6	11,8	82,9	5,27	13,05	83,33	3,61	8,1	88,6	3,3	8,3	90,8	0,9
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
SCd	13,3	80	6,7	13,4	75,6	11,1	14,6	79,4	6	10,9	81,8	7,3	12,8	82,9	4,3
	12,5	83	4,5	12,8	77,6	9,6	13,8	82,2	3,9	12	83,4	4,6	12,1	84	3,9
	14,8	78,2	7	17,3	82,7	0	19,36	74,73	5,9	15,5	77,4	7,1	13,8	80,4	5,7

Tabla 1. Parte de la matriz de datos obtenida en el proceso de adquisición de datos

	CG			13C NMR									1H NMR		
				Carbonyl			C-16			Aliphatic					
	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
E	$y_{1,1}^S$	$y_{1,1}^M$	$y_{1,1}^P$	$x_{1,1,1}^S$	$x_{1,1,1}^M$	$x_{1,1,1}^P$	$x_{1,2,1}^S$	$x_{1,2,1}^M$	$x_{1,2,1}^P$	$x_{1,3,1}^S$	$x_{1,3,1}^M$	$x_{1,3,1}^P$	$x_{1,4,1}^S$	$x_{1,4,1}^M$	$x_{1,4,1}^P$
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	y_{1,n_1}^S	y_{1,n_1}^M	y_{1,n_1}^P	$x_{1,1,n_1}^S$	$x_{1,1,n_1}^M$	$x_{1,1,n_1}^P$	$x_{1,2,n_1}^S$	$x_{1,2,n_1}^M$	$x_{1,2,n_1}^P$	$x_{1,3,n_1}^S$	$x_{1,3,n_1}^M$	$x_{1,3,n_1}^P$	$x_{1,4,n_1}^S$	$x_{1,4,n_1}^M$	$x_{1,4,n_1}^P$
SCz	$y_{2,1}^S$	$y_{2,1}^M$	$y_{2,1}^P$	$x_{2,1,1}^S$	$x_{2,1,1}^M$	$x_{2,1,1}^P$	$x_{2,2,1}^S$	$x_{2,2,1}^M$	$x_{2,2,1}^P$	$x_{2,3,1}^S$	$x_{2,3,1}^M$	$x_{2,3,1}^P$	$x_{2,4,1}^S$	$x_{2,4,1}^M$	$x_{2,4,1}^P$
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	y_{2,n_2}^S	y_{2,n_2}^M	y_{2,n_2}^P	$x_{2,1,n_2}^S$	$x_{2,1,n_2}^M$	$x_{2,1,n_2}^P$	$x_{2,2,n_2}^S$	$x_{2,2,n_2}^M$	$x_{2,2,n_2}^P$	$x_{2,3,n_2}^S$	$x_{2,3,n_2}^M$	$x_{2,3,n_2}^P$	$x_{2,4,n_2}^S$	$x_{2,4,n_2}^M$	$x_{2,4,n_2}^P$
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
SCd	$y_{7,1}^S$	$y_{7,1}^M$	$y_{7,1}^P$	$x_{7,1,1}^S$	$x_{7,1,1}^M$	$x_{7,1,1}^P$	$x_{7,2,1}^S$	$x_{7,2,1}^M$	$x_{7,2,1}^P$	$x_{7,3,1}^S$	$x_{7,3,1}^M$	$x_{7,3,1}^P$	$x_{7,4,1}^S$	$x_{7,4,1}^M$	$x_{7,4,1}^P$
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	y_{7,n_7}^S	y_{7,n_7}^M	y_{7,n_7}^P	$x_{7,1,n_7}^S$	$x_{7,1,n_7}^M$	$x_{7,1,n_7}^P$	$x_{7,2,n_7}^S$	$x_{7,2,n_7}^M$	$x_{7,2,n_7}^P$	$x_{7,3,n_7}^S$	$x_{7,3,n_7}^M$	$x_{7,3,n_7}^P$	$x_{7,4,n_7}^S$	$x_{7,4,n_7}^M$	$x_{7,4,n_7}^P$

Tabla 2. Notación empleada para las observaciones que constituyen la matriz de datos

	13C NMR									1H NMR		
	Carbonyl carbon reg.			C-16 reg.			Aliphatic carbon reg.			SAFA	MUFA	PUFA
MSE	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
Estepa	1,285	30,063	36,589	3,795	3,32	0,11	9,249	10,763	2,124	2,272	7,105	2,848
Sierra de Cazorla	0,138	19,989	21,179	1,547	0,979	0,205	13,699	16,318	1,213	5,705	22,734	6,247
Priego de Córdoba	0,59	13,387	84,005	2,16	1,495	0,25	10,814	13,943	2,194	5,711	19,785	4,656
Poniente de Granada	1,694	16,93	17,735	3,352	6,265	2,676	2,839	5,317	2,666	8,666	28,762	7,466
Montoro-Adamuz	2,392	14,002	13,873	5,225	4,168	1,086	7,9276	7,430	2,624	4,398	19,522	7,178
Antequera	2,811	10,54	13,754	10,24	8,097	0,55	5,875	3,253	2,177	5,149	17,506	5,012
Sierra de Cádiz	0,704	23,728	23,808	5,264	3,397	0,302	2,828	3,036	1,075	0,719	9,639	5,237
TOTAL	1,746	17,03	25,373	5,278	4,792	0,938	6,843	7,292	2,198	4,956	18,56	5,74

Tabla 3. MSE total y por DOP obtenido para cada técnica RMN y para cada tipo de ácido grasos

Technique	MSEP		
	SAFA	MUFA	PUFA
Carbonyl carbon reg. 13C NMR	1,211	19,658	25,162
C-16 reg. 13C NMR (E1)	6,206	4,674	0,251
Aliphatic carbon reg. 13C NMR	8,578	11,188	1,709
1H NMR	7,139	25,348	6,444
Average (E2)	0,830	2,213	1,602
Total MSEC weighted average (E3)	0,599	1,540	0,433
Dop MSEC weighted average (E4)	0,501	0,778	0,398

Tabla 4. MSEP para cada tipo de ácido y técnica de estimación empleada

INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva virgen extra es un aceite comestible muy apreciado por su sabor y sus beneficios sobre la salud. Son los países mediterráneos (España, Italia, Grecia, Turquía, Túnez y Marruecos) y Portugal los que abarcan el 90% de la producción mundial, siendo España e Italia los mayores productores y consumidores. Dentro de España, Andalucía produce el 80% del producto nacional. Presenta un elevado precio en el mercado, lo cual lo hace susceptible de sufrir adulteraciones con otros aceites de menor valor (girasol, soja, maíz, aceites de oliva refinados...). Esto, junto con la emergencia de aceites procedentes de Denominaciones de Origen Protegidas, hace necesario buscar métodos analíticos rápidos, fiables, económicos y que precisen poca o nula manipulación de la muestra. En este sentido, desde hace varios años venimos elaborando una base de datos de aceites de oliva virgen extra empleando diversas técnicas espectroscópicas como IR, Raman, IRMS o RMN. Esta última técnica, tanto de ¹³C como de ¹H, combinada con la estadística asistida por ordenador permite extraer gran cantidad de información de sus espectros. En esta ocasión, nos centramos en la búsqueda de la técnica y zona del espectro que nos permite la determinación del contenido del aceite en ácidos grasos de una manera más precisa. Como técnica de referencia se emplea la cromatografía de gases.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han analizado 128 muestras de aceite de oliva virgen extra procedentes de distintas DOP andaluzas (Estepa, Sierra de Cazorla, Priego de Córdoba, Poniente de Granada, Montoro-Adamuz, Antequera y Sierra de Cádiz), correspondientes a cuatro campañas consecutivas (2007-2008 a 2010-2011), presentando un índice de madurez de 3. Las variedades estudiadas son, principalmente, 'Arbequina', 'Hojiblanca', 'Picual', 'Lechín', 'Manzanilla', 'Picudo' and 'Royal'. Para todas las muestras se obtuvieron los espectros de ¹³C y de ¹H y se calculó el contenido en ácidos grasos (SAFA, MUFA y PUFA). Existen distintas formas de calcular los ácidos grasos mediante ¹H RMN [1-4]. En nuestro caso, los mejores resultados fueron obtenidos por el método de Guillén y Ruiz [1], el cual determina los ácidos grasos a partir de las expresiones mostradas en la Figura 1, la cual representa el espectro de RMN de ¹H correspondiente a un aceite de oliva virgen extra.

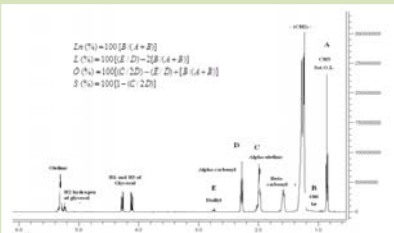


Fig. 1. Espectro de RMN ¹H de aceite de oliva virgen extra, obtenido a 500 MHz.

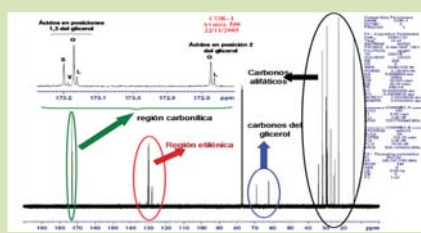


Fig. 2. Espectro de RMN ¹³C de un aceite de oliva virgen extra, obtenido a 127.55 MHz.

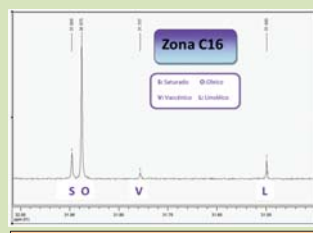


Fig. 3. Zona C16 del espectro de RMN ¹³C de un aceite de oliva virgen extra.

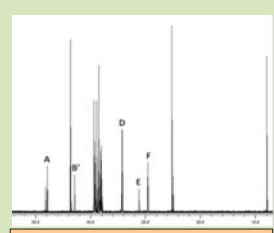


Fig. 4. Zona C16 del espectro de RMN ¹³C de un aceite de oliva virgen extra.

La determinación de ácidos grasos en el espectro de ¹³C RMN (Figura 2) se lleva a cabo en tres zonas distintas:

- Zona carbonilica: Desde 172 a 174 ppm. En esta zona los triglicéridos aparecen en dos grupos:
 - En el grupo de señales de las **posiciones 1 y 3** aparecen, de mayor a menor valor de ppm, la señal de los ácidos saturados (palmitico y esteárico, principalmente), un pequeño pico asignado a los ácidos Vaccínico (presente únicamente en aceites de oliva) y Gadoleico, una señal intensa que se corresponde con ácido Oleico y una cuarta señal correspondiente al ácido Linoleico. En esta región, el ácido Linoléico que se encuentra en proporciones inferiores al 1% no se separa de la señal del Linoleico (Figura 2).
 - Los ácidos en **posición 2** del glicerol aparecen a menos desplazamiento químico observándose dos señales debidas al ácido Oleico y al Linoleico (Figura 2).
- Zona C16: Esta zona aparece entre 31 y 32 ppm y en ella se presentan señales para los ácidos grasos Saturados, Oleico, Vaccínico y Linoleico (Figura 3).
- Zona carbonos alifáticos: Esta es la zona de las regiones metilo y metileno de carbono, comprendiendo desde 10 a 35 ppm. Las señales utilizadas para el cálculo de los ácidos grasos SAFA, MUFA y PUFA son A, B', D, E y F [5] (Figura 4).

Se pretende utilizar procedimientos estadísticos para estimar, utilizando la información que proporcionan las cuatro zonas espectrales (las tres obtenidas de las zonas carbonilica, carbono 16 y carbonos alifáticos del espectro ¹³C RMN y la asociada al espectro ¹H RMN), el contenido en ácidos SAFA, MUFA y PUFA de las muestras de aceite, utilizando como referencia los valores obtenidos por cromatografía de gases (técnica clásica).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La Tabla 1 presenta el error cuadrático medio cometido al estimar el contenido de cada uno de los tres tipos de ácidos grasos y mediante cada una de las técnicas RMN. Se presentan los resultados totales y los obtenidos en cada DOP.

A continuación, se indicarán las sucesivas formas propuestas para estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA de los diversos aceites (usando los valores obtenidos mediante cromatografía de gases como referencia) empleando la información proporcionada mediante RMN.

Estimación 1. Usando la zona carbono 16 del espectro ¹³C RMN

A partir de la Tabla 1 puede observarse que, si bien los resultados son diferentes en cada DOP, los mejores resultados totales se obtienen al estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA utilizando la zona carbono 16 del espectro RMN. En tal caso, la primera estimación que se propone para predecir el contenido en ácidos grasos del aceite pasa con considerar la estimación que proporciona el espectro RMN en la zona carbono 16, dado que proporciona un menor error cuadrático medio:

$$\hat{x}_i = \frac{\sum_{j=1}^n x_{ij}}{n}, \quad i=1, \dots, 7, \quad j=1, \dots, n$$

Estimación 2. Usando el promedio de los valores obtenidos por cada una de las cuatro técnicas RMN

A la vista de la Figura 5, parece intuirse que un promedio de las estimaciones obtenidas por las cuatro técnicas RMN podría proporcionar una estimación más próxima al valor de referencia obtenido por CG (dado que unas estimaciones difieren por exceso y otras por defecto del valor observado por CG). Además, este procedimiento permite utilizar toda la información estadística que el espectro ¹H y el espectro ¹³C (en sus tres zonas) proporcionan. De este modo, la segunda aproximación que se considera para estimar el contenido en SAFA, MUFA y PUFA es:

$$\hat{x}_i = \frac{\sum_{j=1}^n x_{ij} + \sum_{j=2}^n x_{ij} + \sum_{j=3}^n x_{ij} + \sum_{j=4}^n x_{ij}}{4}, \quad i=1, \dots, 7, \quad j=1, \dots, n$$

Por otra parte, si se considera al error cuadrático medio como una medida (inversamente proporcional) de la precisión obtenida al estimar el contenido en cada uno de los ácidos por cada una de las técnicas (y en cada DOP), una estimación más acertada que la proporcionada anteriormente se obtiene al realizar el promedio ponderando los valores por el inverso del error cuadrático medio obtenido en cada caso. Llevar a la práctica este procedimiento no sería factible dado que la estimación que se propone requeriría conocer los valores del error cuadrático medio para cada ácido y cada zona, y este hecho conllevaría conocer los valores de SAFA, MUFA y PUFA obtenidos mediante cromatografía de gases, técnica considerada de referencia (es decir, para obtener esta estimación del valor real es necesario conocer el valor real; por tanto, carece de sentido proporcionar una estimación).

De manera alternativa, se propone reservar aproximadamente un 20% de los aceites observados (en total, 26 de los 128, considerando la representatividad de las distintas DOP). Después, obtener los errores cuadráticos medios (de ajuste o calibración) para cada ácido y zona usando el 80% de los datos restantes (102). Finalmente, utilizar estos errores cuadráticos medios para corregir las estimaciones proporcionadas mediante el 20% de los datos restantes.

Estimación 3. Usando el promedio ponderado de los valores obtenidos por cada una de las cuatro zonas RMN, con pesos inversamente proporcionales al MSEC total cometido en cada caso.

En este caso, teniendo en cuenta todos los comentarios anteriores, las observaciones reservadas para predicción serán ponderadas inversamente por el error cuadrático medio de calibración obtenido para cada tipo de técnica RMN y ácido:

$$\hat{x}_i = \frac{\sum_{j=1}^n \frac{x_{ij}}{MSEC_{ij}}}{\sum_{j=1}^n \frac{1}{MSEC_{ij}}}, \quad i=1, \dots, 7, \quad j=1, \dots, n$$

Estimación 4. Usando el promedio ponderado de los valores obtenidos por cada una de las cuatro zonas RMN, con pesos inversamente proporcionales al MSEC cometido, para cada DOP, en cada caso

En este caso, teniendo en cuenta que se conoce la DOP (entre las 7 posibles) a la que pertenece un aceite, puede considerarse que la precisión en las estimaciones por cada zona puede diferir según la DOP considerada. De este modo, en este caso se considera como estimación del contenido en los diversos ácidos SAFA, MUFA y PUFA el promedio ponderado, donde cada observación está acompañada de un peso inversamente proporcional al error cuadrático medio de calibración existente, para cada tipo de ácido, en su DOP de procedencia:

$$\hat{x}_i = \frac{\sum_{j=1}^n \frac{x_{ij}}{MSEC_{ij}} \cdot \frac{1}{DOP_{ij}}}{\sum_{j=1}^n \frac{1}{MSEC_{ij}} \cdot \frac{1}{DOP_{ij}}}, \quad i=1, \dots, 7, \quad j=1, \dots, n$$

La Tabla 2 muestra los errores cuadráticos medios de predicción que se obtienen al estimar cada tipo de ácido empleando cada zona. Se han considerado los MSEP referidos a las cuatro estimaciones propuestas -E1, E2, E3, E4- y además los que se obtienen al emplear las técnicas RMN directamente (que no difieren significativamente de los MSE, recogidos en la Tabla 3, calculados al considerar el 100% de los datos). La mejor estimación se obtiene al realizar el promedio ponderado de los valores obtenidos mediante las cuatro zonas RMN, empleando como pesos los inversos de los MSEC para cada ácido y DOP. Esta conclusión es lógica, dado que este último estimador es el que consigue emplear toda la información que los datos disponibles proporcionan, contemplando todas sus fuentes de variabilidad conocidas.

Estos resultados son confirmados a la vista de la Figura 6 donde se representan los errores cuadráticos medios de predicción acumulados para cada técnica en el caso en que se predice el contenido en ácidos MUFA (porcentaje mayoritario). Para los ácidos SAFA y PUFA se obtendrían representaciones similares.

AGRADECIMIENTOS
 Los autores agradecen el apoyo financiero a la Junta de Andalucía (Proyectos P08-FQM-3931, P07-FQM-02695 y P09-FQM-4781) y Fondos FEDER.

BIBLIOGRAFÍA
 [1] Guillén MD, Ruiz A. Eur J.Lipid. Sci. Technol. 2003; 105: 688.
 [2] Vlahov G. Prog. Nucl. Mag. Res. Spectr. 1999; 35: 341.
 [3] Knothe G., Kenar JA. Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 2004; 106: 88.
 [4] Barison A, da Silva CV. Magn. Reson. Chem. 2010; 48:642.
 [5] Miyake Y., Yokomizo T. J. Oil Chemistry Soc.1998; 75: 9.

	13C NMR									1H NMR		
	Carbonyl carbon reg.			C-16 (cg)			Aliphatic carbon reg.					
MSE	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA
Estepa	1,285	30,063	36,589	3,795	3,32	0,11	9,249	10,763	2,124	2,272	7,105	2,848
Sierra de Cazorla	0,138	19,989	21,179	1,547	0,979	0,205	13,699	16,318	2,213	5,705	22,734	6,247
Priego de Córdoba	0,59	13,387	84,005	2,16	1,495	0,25	10,814	13,943	2,194	5,711	19,785	4,656
Poniente de Granada	1,694	16,93	17,735	3,352	6,265	2,676	2,839	5,317	2,666	8,666	28,762	7,466
Montoro-Adamuz	3,392	14,002	13,873	5,215	4,168	1,086	7,9276	7,430	2,824	4,398	19,522	7,178
Antequera	2,811	10,54	13,754	10,24	8,097	0,55	5,875	3,253	2,177	5,149	17,506	5,012
Sierra de Cádiz	0,704	23,728	23,808	5,264	3,397	0,302	2,828	3,036	1,075	0,719	9,639	5,237
TOTAL	1,746	17,03	25,373	5,278	4,792	0,938	6,843	7,292	2,198	4,956	18,56	5,74

Tabla 1. MSE total y por DOP obtenido para cada técnica RMN y para cada tipo de ácido grasos.

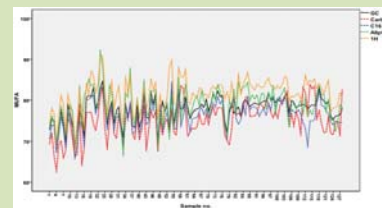


Fig. 5. Contenido en MUFA obtenido mediante CG y las cuatro técnicas RMN

Technique	SAFA	MUFA	PUFA
Carbonyl carbon reg. 13C NMR	1,211	19,018	25,162
C-16 reg. 13C NMR (E1)	0,306	4,674	0,251
Aliphatic carbon reg. 13C NMR	6,578	11,188	1,709
1H NMR	2,328	20,388	4,888
Average (E2)	0,830	2,213	1,602
Inverse MSE weighted average (E3)	0,019	1,540	0,601
Inverse MSE weighted average (E4)	0,001	0,778	0,308

Tabla 2. MSEP para cada tipo de ácido y técnica de estimación empleada



Fig. 6. MSEP acumulado para el contenido en MUFA para cada técnica de estimación empleada

Comunicación 7.

*Characterisation and classification of Andalusian extra-virgin
olive oils by using NMR and IR spectral data.*

XIV Conferencia Española de Biometría.

Ciudad Real, 23 mayo 2013.

Comunicación Oral

Characterisation and classification of Andalusian extra-virgin olive oils by using NMR and IR spectral data

M.I. Sánchez-Rodríguez^{1}, E.M. Sánchez-López², A. Marinas², J.M. Caridad¹,
F.J. Urbano Navarro², J.M. Marinas², V. Borau²*

²*Dep. Estadística y Empresas. Avda. Puerta Nueva, s/n. 14071. Universidad de Córdoba.*

**Corresponding author e-mail:tdlsarom@uco.es*

¹*Departamento de Química Orgánica. Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, 14014. Universidad de Córdoba.*

Abstract

This paper compares different chemical and statistical methods to predict the content in fatty acids (SAFA, MUFA and PUFA) or classify extra-virgin olive oil from different Andalusian protected designations of origin (PDOs) and varieties of olives. The available data have been obtained from gas chromatography (used as a reference classical technique for fatty acid content) and some spectroscopic methods (¹H-NMR, ¹³C-NMR, MIR and NIR).

Keywords: Chemometrics, prediction, classification, extra-virgin olive oil, protected designations of origin

AMS: 62H25, 62J05, 62Q99.

1. Introduction

Olive oil is an edible one prized for its taste and health benefits. The virgin olive oil is defined as the oil obtained from the olive only by mechanical or other physical procedure under conditions that do not alter the oil. It presents a high market price, making it susceptible to adulteration with other cheaper oils (sunflower, soybean, corn, refined olive oils...). This fact, coupled with the emergence of oils from Protected Designation of Origin (PDO), make necessary the development of fast, reliable, inexpensive analytical methods requiring little or none sample handling. In this sense, a large amount of information on olive oil can be obtained from some spectroscopic techniques such as NMR, MIR and NIR through the application of computer-assisted statistics. The reference technique used to quantify the fatty acids in olive oils is Gas Chromatography (GC) by the method of cold transesterification suitable for an acid number less than 3.3°. The main fatty acids present in vegetable oils are triglycerides of oleic, linoleic, linolenic, myristic, palmitic and stearic. The latter three are classified as saturated (SAFA), oleic as monounsaturated (MUFA) and linoleic and linolenic as polyunsaturated (PUFA).

2. Materials and methods

The samples studied included 128 extra-virgin olive oils supplied by different Andalusian PDO and mixtures of different cultivars ("Estepa":16, "Sierra de Cazorla":8, "Priego de Córdoba": 12, "Poniente de Granada": 24, "Montoro-Adamuz": 28, "Antequera": 28 and "Sierra de Cádiz": 12). These samples were collected for four consecutive seasons (from 2007/2008 to 2010/2011) with a ripeness index of 3. The varieties studied are, mainly, 'Arbequina', 'Hojiblanca', 'Picual', 'Lechín', 'Manzanilla', 'Picudo' and 'Royal'. Olive oil was extracted through a two-phase centrifugation system.

There are various ways of determining a fatty acid profile from an ¹H NMR spectrum [1-4]. In our case, the best results were obtained by the method described by Guillén et al. [1] who determine saturated (palmitic and stearic, mainly), monounsaturated (oleic, mainly), linoleic and linolenic acids (designated S, O, L and Ln, respectively) from the following expressions:

$$Ln (\%) = 100 [B/(A + B)]$$

$$L (\%) = 100 [(E/D) - 2[B/(A + B)]]$$

$$O (\%) = 100[(C/2D) - (E/D) + [B/(A + B)]]$$

$$S (\%) = 100 [1 - (C/2D)]$$

where *A* is the area under signal corresponding to the methyl protons in all acids except linolenic, *B* that under signal of methyl protons in linolenic acid, *C* that under signal of protons in allyl methylene or α -olefinic groups, *D* that for the protons in the methylene groups α to the carboxyl group and *E* that for the protons in *bis*-allyl methylene (diallyl) group.

As for the ^{13}C NMR spectrum of an olive oil sample, it contains the resonances of carbons from the triglyceride fraction of olive oil, i.e. the fatty acid resonances. The fatty acids determinations, in the ^{13}C NMR, spectrum is carried out in three different areas:

- **Carbonyl carbon region (172-174 ppm).** Triglycerides appear in two set of resonances: resonances at lower chemical shift values correspond to the 2-glycerol position chain whereas signal at higher ppm values are associated to the chains esterified at 1, 3-glycerol positions. Therefore, this difference can be explained due to the fact that C=O groups of 2-position chains experience two “*gammauche*” interactions, while in the 1,3 positions present just one interaction. In the signals group of 1 and 3 positions appear, from high to low ppm values, the saturated acids (mainly palmitic and stearic), a small signal corresponding to Vaccenic (only present in olive oils) and Gadoleic acids, an intense signal corresponding to oleic acid and a fourth signal associated to linoleic acid. This acid is present in proportions below 1% and is not separated from linoleic acid signal. The group of signals at low chemical shifts (2-glycerol position) is constituted by two signals ascribed to oleic and linoleic acid, respectively, from high to low ppm values
- **C-16 carbons regions** from saturated, oleic, linoleic and vaccenic acids appear from 31 to 32 ppm.
- **Aliphatic carbons region** appear at chemical shifts from 10 to 35 ppm. The calculation of SAFA, MUFA and PUFA was made from the calculations described in [5] with a slight modification.

3. Chemometric analysis

This section describes statistical procedures to predict the content in SAFA, MUFA and PUFA fatty acids of olive oil using the information of the four spectral zones (three obtained from the carbonyl carbons, C-16 carbons and aliphatic carbons regions of the ^{13}C NMR spectrum and the associated to the ^1H NMR spectrum), using the values obtained by GC (classical technique) as a reference. Table 1 presents the mean squared error (MSE) of the estimation of each type of fatty acid by each NMR spectral region. This table shows the total results and the ones obtained for each PDO.

MSE	^{13}C NMR									^1H NMR		
	Carbonyl carbon reg.			C-16 reg.			Aliphatic carbon reg.			SAFA	MUFA	PUFA
	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA	SAFA	MUFA	PUFA			
Estepa	1.285	30.063	36.589	3.795	3.32	0.11	9.249	10.763	2.124	2.272	7.105	2.848
Sierra de Cazorla	0.138	19.989	21.179	1.547	0.979	0.205	13.699	16.318	1.213	5.705	22.734	6.247
Priego de Córdoba	0.59	13.387	84.005	2.16	1.495	0.25	10.814	13.943	2.194	5.711	19.785	4.656
Poniente de Granada	1.694	16.93	17.735	3.352	6.265	2.676	2.839	5.317	2.666	8.666	28.762	7.466
Montoro-Adamuz	2.392	14.002	13.873	5.225	4.168	1.086	7.9276	7.430	2.624	4.398	19.522	7.178
Antequera	2.811	10.54	13.754	10.24	8.097	0.55	5.875	3.253	2.177	5.149	17.506	5.012
Sierra de Cádiz	0.704	23.728	23.808	5.264	3.397	0.302	2.828	3.036	1.075	0.719	9.639	5.237
TOTAL	1.746	17.03	25.373	5.278	4.792	0.938	6.843	7.292	2.198	4.956	18.56	5.74

Table 1. MSE in fatty acid determination (SAFA, MUFA and PUFA) for each DOP and total MSE obtained from each NMR spectral region

Then, the successive improvement in the estimations of the different fatty acids in olive oils, using the NMR spectral data, is described:

- **Estimation 1. Using the carbon-16 region of the ^{13}C NMR spectrum.** In spite of the fluctuations in the values among the PDOs, this zone of the ^{13}C NMR spectrum provides the best total results (taking into account the MSE) in the estimation of the content in SAFA, MUFA and PUFA.

- **Estimation 2.** *Using the average of the values obtained from each of the four NMR techniques*, as some estimations differ in excess and other by default from the values observed by GC. This procedure permits to use the whole statistical information from the ^1H NMR and ^{13}C NMR (in the three regions) spectra.

Therefore, if the mean squared error is considered as a measure (inversely proportional) of the precision in the estimation of the content of each fatty acid family by each spectral region (and in each PDO), a more accurate estimation than that provided above is obtained from a weighted average, when the values are weighted by the inverse of the mean squared error obtained in each. The implement of this procedure is not feasible as the proposed estimation requires to know the values of MSE for each acid and technique and so the values of SAFA, MUFA and PUFA obtained by GC, reference technique (that is, to obtain the estimation of the real value it is necessary to know the real value and thus to provide a estimation is meaningless). Alternatively, ca. 20% of the olive oils are reserved (26 in total, considering the representability of the different PDOs). Then, the mean squared error of calibration (MSEC) is calculated for each fatty acid and spectral region by using the 80% of the remaining data (102). Finally, these MSEC are used to correct the estimations provided by the 20% of the reserved data. If the considered sample (*pilot sample*) is representative of the global population of extra-virgin olive oils in Andalusia (and the subsample are representative of the different PDOs) these errors can be considered estimations of the theoretical mean squared error by estimating each fatty acid, in each PDO and by each spectral region and then can be used to weight the data in future predictions in the sense described as follows:

- **Estimation 3.** *Using the weighted average of the values obtained from each of the four NMR spectral regions, with weights inversely proportional to each total MSEC.* In this case, the observations reserved to prediction are inversely weighted by the mean squared error of calibration obtained for each NMR spectral region and fatty acid family before calculating the average.
- **Estimation 4.** *Using the weighted average of the values obtained from each of the four NMR spectral regions, with weights inversely proportional to the MSEC in each PDO.* Taking into account that the PDO (among 7 possible) when the olive oil is extracted is known, it can be considered that the precision in the estimation for each NMR technique can differ as a function of the specific PDO. Therefore, this procedure considers as an estimation of the content in SAFA, MUFA and PUFA acids the weighted average, when the weight of each observation is the inverse of the mean squared error of calibration for each NMR spectral region, type of fatty acid and PDO.

Table 2 shows the mean squared errors of prediction obtained when each type of acid is estimated by each technique (the four proposed estimations -E1, E2, E3, E4- and the ones obtained by using the NMR spectral region directly, whose values do not differ significantly from the ones calculated with the 100% of the data -Table 1-). The best estimation is obtained by the weighted average of the values provided, for each fatty acid family, by the four spectral regions, when the weights are the inverses of the MSEC for each acid and PDO. This is a certainly logic conclusion as this estimator is the one that uses all the information in the available data, considering all their sources of variability.

Technique	MSEP		
	SAFA	MUFA	PUFA
Carbonyl carbon reg. ^{13}C NMR	1,211	19,658	25,162
C-16 reg. ^{13}C NMR (E1)	6,206	4,674	0,251
Aliphatic carbon reg. ^{13}C NMR	8,578	11,188	1,709
^1H NMR	7,139	25,348	6,444
Average (E2)	0,830	2,213	1,602
Total MSEC weighted average (E3)	0,599	1,540	0,433
Dop MSEC weighted average (E4)	0,501	0,778	0,398

Table 2. MSE of prediction for each fatty acid and NMR technique

These results are confirmed by Figure 1 which represents the accumulated MSE for each technique when the content of MUFA acids (the main constituents) is predicted. For SAFA and PUFA acids (not represented) the trends are similar.

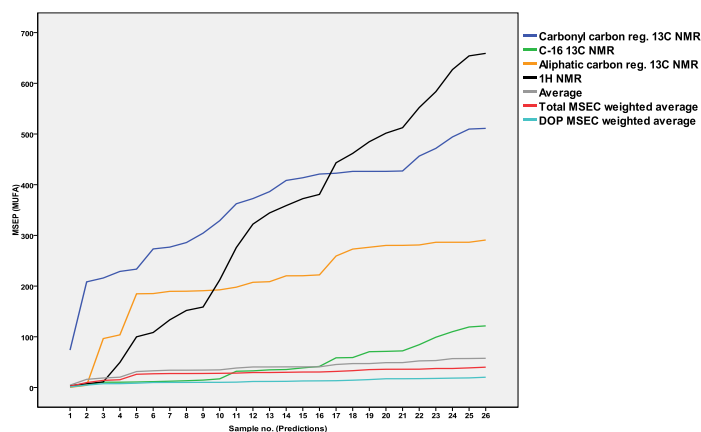


Figure 1. Accumulated MSE of the prediction of MUFA acids by each estimation technique

4. Extended chemometric analysis

- The weights considered in Estimation 4 are analyzed to determine the best NMR spectral region to estimate the content of each type of fatty acid (SAFA, MUFA and PUFA) of olive oil and if there are differences attending to the PDO. For example, the carbonyl carbon region of the ^{13}C NMR spectrum provides the best estimations in SAFA acids or the aliphatic carbon region is better for the estimations in MUFA acids than the 16-carbon region.
- The estimations of the content in SAFA, MUFA and PUFA obtained by the NMR spectra using chemical procedures are compared to the estimations provided by statistical models obtained by NIR or MIR spectra. In this sense, Sánchez-Rodríguez et al. [6] used principal component analysis or partial least squares analysis to reduce the great number of explanatory variables, associated to each wavelength of a NIR spectra, and then proposed regression models considering these components as regressors.
- The content in SAFA, MUFA and PUFA obtained by any of the described procedures from the NMR spectra or the components obtained using PCA or PLS from the MIR or NIR spectra are used to discriminate among varieties of olive or classify the olive oil attending to the DPO (using procedures such as MANOVA, LDA or SIMCA).

5. Acknowledgments

The authors thank the financial support by “Junta de Andalucía” (Projects P08-FQM-3931, P07-FQM-02695 and P09-FQM-4781) and FEDER funds.

6. Bibliography

- [1] Guillén MD., Ruiz A. (2003) *Eur J.Lipid. Sci. Technol.* **105**:688.
- [2] Vlahov G. (1999) *Prog. Nucl. Mag. Res. Spectr.* **35**:341.
- [3] Knothe G., Kenar JA. (2004) *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **106**:88.
- [4] Barison A, da Silva CW. (2010) *Magn. Reson. Chem.* **48**:642.
- [5] Miyake Y., Yokomizo K. (1998) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**:9.
- [6] Sánchez-Rodríguez MI, Sánchez-López E, Caridad JM, Marinas A, Marinas JM, Urbano FJ (2013) SORT, in press.

Publicación 1.

A Nuclear Magnetic Resonance (^1H and ^{13}C) and isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$) study of Andalusian olive oils.

M.A. Aramendía, A. Marinas, J.M. Marinas, E. Sánchez, F.J. Urbano, C. Guillou, J.M. Moreno Rojas, M. Moalem y L. Rallo.

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 24 (2010) 1457–1466.

A nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C) and isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$) study of Andalusian olive oils

María A. Aramendía¹, Alberto Marinas^{1*}, José M Marinas¹, Elena Sánchez¹, Francisco J. Urbano¹, Claude Guillou², José M. Moreno Rojas^{1,2}, Mustafa Moalem^{1,3} and Luis Rallo³

¹Department of Organic Chemistry, University of Córdoba, Campus de Rabanales, Marie Curie Building, E-14014 Córdoba, Spain

²European Commission – Joint Research Centre, Institute for Health & Consumer Protection Systems Toxicology Unit – BEVABS TP-281 Via Fermi, 2, 21020 Ispra (VA), Italy

³Department of Agronomy, ETSIAM, University of Córdoba, Campus de Rabanales, Celestino Mutis Building, E-14071 Córdoba, Spain

Received 13 December 2009; Revised 27 February 2010; Accepted 2 March 2010

We have determined $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ isotopic abundances in Andalusian olive oils. In addition, the fatty acid composition and the distribution of isomers at positions 1,3 and 2 of glycerol were determined by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, respectively. Isotopic results obtained for four series of oil samples extracted from olives harvested in the 2004/05 and 2005/06 seasons are discussed in terms of olive variety, ripeness, geographical origin, fatty acid composition and growing altitude. A distinction was also established between olives grown in irrigated and in dry land by studying selected samples of the previous series and others from the 2005/06, 2006/07, 2007/08 and 2008/09 seasons. The results showed that olive ripeness does not influence the abundance of any of the three isotopes studied. On the other hand, the olive variety influences the abundance of the oxygen and hydrogen isotopes, and also, less markedly, that of carbon. No clear-cut effect of height or latitude on isotope values is observed, probably because the olive variety also changes with height and latitude, thus masking such influences. The oil samples from dryland-grown olives had increased $\delta^{13}\text{C}$ values relative to irrigation-grown olives. In addition, no definite relationship appears to exist between isotope distribution and fatty acid composition. Finally, oil samples from olives harvested in the 2005/06 season in Italy could be distinguished from those from Spain in terms of their isotopic values ($\delta^2\text{H}$ mainly). Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

The determination of food authenticity and the detection of adulteration are of increasing importance for the food industry in general and for the olive oil sector in particular. Spectroscopic techniques such as Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR),^{1,2} proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR),³ mass spectrometry (MS) [head-space (HS-MS),⁴ electrospray ionisation (ESI-MS) and atmospheric pressure photoionisation (APPI-MS),⁵ high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation (HPLC/APCI-MS),⁶ or stable isotope ratio mass spectrometry (SIRMS)^{7,8}], excitation-emission fluorescence spectroscopy (EEFS)⁹ and chromatographic methods [gas-liquid chromatography-flame ionisation detection (GLC-FID),⁶ solid-phase microextraction/multidimensional gas chromatography (SPME-MDGC)¹⁰] have been used successfully to

detect the adulteration of olive oil with other low cost edible oils (e.g. sunflower, corn, soybean, hazelnut).

The emergence of oils with a protected designation of origin (PDO) has also raised the need to check that oil products come from the stated production area. This triggered the development of analytical methods based on ^1H NMR^{11–13} and ^{13}C NMR,^{13,14} HS-MS,^{15,16} proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS),¹⁷ GC-FID,^{18,20} GC/MS,¹⁹ GC-FID,²⁰ high-performance liquid chromatography-refractometric detection,²⁰ SPME-GC,²¹ inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS),²² and the extraction and profiling of DNA.²³ There has also been a recent trend towards the increased use of a combination of techniques such as HPLC-fluorimetric detection, GLC/MS and GLC-FID²⁴ or UV-Vis, HS-MS and NIR.²⁵

The present research deals with the application of SIRMS to olive oil traceability. This technique seems to be ideal for checking Protected Designation of Origin (PDO) since the natural distribution of isotopes depends on variables related to geographical distribution such as temperature and altitude.

*Correspondence to: A. Marinas, Department of Organic Chemistry, University of Córdoba, Campus de Rabanales, Marie Curie Building, E-14014 Córdoba, Spain.
E-mail: alberto.marinas@uco.es

Royer *et al.*²⁶ studied the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of the palmitic, oleic and linoleic fatty acids of olive oils, observing differences between French and Italian olive oils and those from Greece, and achieved regional classification of the Greek olive oils. Angerosa *et al.*²⁷ identified the geographical origin of various olive oils by plotting $\delta^{18}\text{O}$ as a function of $\delta^{13}\text{C}$ for the oils and for their sterol and linear alcohol fractions.

In a previous paper,²⁸ we reported the development of a method for the determination of $\delta^{18}\text{O}$ isotopic abundance in olive oils, and the results obtained for both C and O stable isotopes in Andalusian olive oil corresponding to 2004/05 and 2005/06 seasons were discussed in terms of olive variety, geographical origin, climate and ripeness index. During the preparation of the present paper, there have been two reports on the characterization of Italian olive oils using a third element (hydrogen) as well,^{29,30} $\delta^2\text{H}$ values showing promising geographical discrimination capability. Here, all three isotopes C, O and H have been determined in olive oil samples. Moreover, since triglycerides account for 98–99% of all fatty acids in oil, the fatty acid profile of an oil might influence its isotope distribution. This led us to examine the fatty acid composition of Andalusian olive oils as determined by ^1H NMR spectroscopy using the method of Guillén *et al.*³¹ which, as explained below, was found to be particularly accurate for this purpose. Similarly, based on reports on the possibility of distinguishing among several vegetable oils,^{32–36} determination of the fatty acid distribution between positions 1/3 and 2 on the glycerol backbone was carried out.

EXPERIMENTAL

Origin of samples

The samples in the series G1 were obtained from the germplasm bank of Córdoba for the 2004/05 season and differed in olive variety or ripeness. The samples from the 2005/06 season (series X2) included (a) some varieties studied in the previous season ('Picual', 'Sorani', 'Zaitiy', 'Hojiblanca' and 'Arbequina') and obtained from the germplasm bank of Córdoba (G2); (b) samples from 'Picual' olives harvested at a variable altitude from 165 to 935 m (A2); and (c) oils supplied by Cooperativa Hojiblanca (H2) that were obtained from mills within its area of influence, which encompasses locations in the provinces of Córdoba and Málaga (Andalusia). The influence of irrigated and dry cultivation was examined on some samples of the above-mentioned 2005/06 season (series X2) as well as some others from 2006/07, 2007/08 and 2008/09 (series X3, X4 and X5, respectively). Sampling was carried out following a protocol similar to that stipulated by the European Union for grapes to be used in isotope analyses of wines.³⁷ All samples in the series X2, X3, X4 and X5 were collected at a ripeness index of 3. Samples were chosen in terms of significance to the Andalusian region, and also of their presence in other Spanish regions. Olive oils were extracted from the olives by using an Abencor system from MC2 Ingeniería y Sistemas (Sevilla, Spain), which reproduces the industrial process on the laboratory scale and follows the same stages of grinding, beating, centrifugation and decantation.^{38,39}

Measuring equipment and operating conditions

^1H and ^{13}C NMR

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer (Kahlsruhe, Germany), using a resonance frequency of 500.2 MHz for ^1H and 125.77 MHz for ^{13}C , and a direct-detection 5 mm QNP $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ probe. Further details are given in the Supporting Information.

SIRMS

$\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ measurements were made on a Delta Plus XL stable isotope ratio mass spectrometer from ThermoFinnigan (Bremen, Germany). Samples were analyzed for carbon by combustion in a Carlo Erba Flash EA 1112 Series elemental analyzer from ThermoQuest (Milan, Italy) and for oxygen by pyrolysis in a total combustion/elemental analyzer (TC/EA) instrument from ThermoQuest (Bremen, Germany). Both instruments were connected to the mass spectrometer via a ConFlo III interface (ThermoFinnigan, Bremen, Germany). $\delta^2\text{H}$ values were measured using a total conversion elemental analyzer (TC/EA) coupled to a Delta PlusXP mass spectrometer from Thermo Fisher (Rodano, Italy).

For $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ measurements, the carrier and reference gas (He in both cases) were circulated at 80 and 60 mL/min, respectively. Combustion oxygen was delivered at 175 mL/min for 5 s. Quantitative combustion was accomplished by passing the mixture of gases over a catalyst layer of chromium oxide at 1020°C and then over elemental copper at 640°C to reduce nitrous oxide to elemental nitrogen. Following reduction, the gas mixture was passed through an $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ water trap onto a Porapak QS chromatographic column at 45°C and, finally, into the electron ionization (EI) ion source of the mass spectrometer via a open split interface. The abundances of the principal isotopomers of masses 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ and $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$), and 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$) resulting from the different possible combinations of isotopes ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C and ^{12}C were determined from the ion currents measured with three different collectors in the isotope ratio mass spectrometer. The contributions of isotopomers $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ and $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ were neglected in view of their low values. The ion current at m/z 45 was corrected for the contribution of $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$, which was estimated from the current intensity at m/z 46 with provision for the abundance of ^{18}O and ^{17}O (i.e. with the Craig correction⁴⁰). A comparison with a reference calibrated against the international reference VPDB allowed the ^{13}C content to be calculated on the $\delta^{13}\text{C}$ scale.

For $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ measurements, pressures of the purge and carrier gas (both helium) were 22 and 26 psi, respectively. The sample held in each capsule was dropped into a graphite crucible which was then accurately positioned in the hottest zone of a glassy carbon reactor heated at 1400°C. This allowed high-temperature conversion and the resulting gases (*viz.* CO, H_2 and N_2) to be chromatographically separated at 90°C on a column filled with molecular sieve 5 Å and, finally, introduced into the EI ion source of the mass spectrometer via an open split interface. The mass spectrometer was used to simultaneously determine the abun-

dance of each CO isotopomer [*viz.* $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ (m/z 28); $^{13}\text{C}^{16}\text{O}$ and $^{12}\text{C}^{17}\text{O}$ (m/z 29); and $^{12}\text{C}^{18}\text{O}$ and traces of $^{13}\text{C}^{17}\text{O}$ (m/z 30)]. A comparison with a reference calibrated against the international primary reference standard VSMOW allowed the ^{18}O content to be calculated on the $\delta^{18}\text{O}$ scale.

The $\delta^2\text{H}$ values were measured using a voltage of 7000 mV for the reference peaks under the following temperature conditions: 85°C for the GC column and 1450°C for the glassy carbon column reactor.

Sample preparation

NMR

Samples were prepared for analysis by placing a volume of 200 μL of oil sample in an Eppendorf vial and adding 500 μL of deuterated chloroform. This treatment was applied immediately upon the introduction of each sample into the NMR spectrometer in order to avoid evaporation of the solvent since the position of the signals for carboxylic carbons (172–174 ppm) is known to be concentration-dependent.³⁶

SIRMS

Olive oil samples were dropped into the appropriate capsules by means of a metal plug, the capsule then being flattened and placed on the autosampler. Special care was taken on samples for oxygen determination, in order to avoid or minimize contamination by atmospheric air. For $\delta^{18}\text{O}$ determination, 250–300 μg of oil sample and tin capsules, either Ref. E12001 from Eurovector (Milan, Italy) or product Ref. Ultraclean D-1027 from Elemental Microanalysis Ltd. (Okehampton, UK), were used. In the case of the $\delta^{13}\text{C}$ determination, 180–200 μg of oil sample was inserted into a Eurovector Ref. E12001 tin capsule. Finally, for $\delta^2\text{H}$ measurements, 300 μg of oil was placed on silver capsules Re. 84.9903.36 from Lüdiag (Flawil, Switzerland).

Standards

Isotopic determination of $\delta^{18}\text{O}$

A CO working standard gas from SEO (Sevilla, Spain) was used for quality control of $\delta^{18}\text{O}$ measurements, all samples being prepared in quintuplicate.

Two different in-house prepared quality control materials that were analyzed in parallel with the samples were used to check our pyrolysis device for stability, and also to monitor the accuracy and precision of the analytical results. First, a solid working standard (sucrose, with $\delta^{18}\text{O} = +23.0\%$ vs. the international primary reference standard (VSMOW)) was systematically analyzed at the beginning and end of each batch, and also after every two samples (10 analyses in all). Such a standard, supplied by the Joint Research Centre of the European Commission (Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italy), has been used for statistical control of the pyrolysis of organic matter since 1995.

One of the olive oils studied, with $\delta^{18}\text{O} = +25.5\%$, was periodically used as a standard in order to fulfill the metrological criteria of similarity (*viz.* matrix and composition similar to those of the measured samples). Blank determinations were also conducted on a periodic basis during the measurement of each batch of samples by placing

empty tin capsules on the autosampler. Mock injections – no sample or capsule – gave absolutely no signal. The standard deviation of the $\delta^{18}\text{O}$ measurements ($n = 10$), determined by using the respective reference gases, was $\pm 0.1\%$. The standard deviation for $\delta^{18}\text{O}$ in individual analyses was equal to or less than 0.3%.

Isotopic determination of $\delta^{13}\text{C}$

A CO₂ working standard gas from SEO was used for quality control of $\delta^{13}\text{C}$ measurements. All samples were prepared in triplicate. Similarly to the determination of $\delta^{18}\text{O}$, sucrose ($\delta^{13}\text{C} = -25.2\%$) and an in-house prepared olive oil of $\delta^{13}\text{C} = -29.4\%$ supplied by *Estación Enológica de Jerez–Junta de Andalucía* (Jerez, Spain) and the Joint Research Centre of the European Commission (Institute for Health and Consumer Protection – Physical and Chemical Exposure Unit, BEVABS, Ispra, Italy), respectively, were used as standards. The standard deviation of the $\delta^{13}\text{C}$ measurements ($n = 10$), determined by using the respective reference gases, was $\pm 0.1\%$. The standard deviation for $\delta^{13}\text{C}$ in individual analyses was equal to or less than 0.1%.

Some samples were submitted to the Joint Research Centre of the European Commission (Institute for Health and Consumer Protection – Physical and Chemical Exposure Unit, BEVABS, Ispra, Italy) or the *Laboratorio Arbitral Agroalimentario* (MAPA, Madrid, Spain) for analysis in order to compare the results with our carbon isotope values.

Isotopic determination of $\delta^2\text{H}$

Alphagaz TM H₂ 2 pressurized hydrogen from Air Liquide Italia (Milan, Italy), with $\delta^2\text{H} = -190.6\%$, was used for quality control of the $\delta^2\text{H}$ measurements.

One olive oil was calibrated with international reference materials and used as the working standard ($\delta^2\text{H} = -148.32\%$). Measurements were checked for repeatability and any drift deviations in them corrected by analyzing the working standard at regular intervals. The standard deviation of the $\delta^2\text{H}$ measurements ($n = 10$) as determined by using the respective reference gases was $\pm 0.8\%$. Each olive oil sample was analyzed in triplicate in order to avoid inhomogeneity and ensure representativeness in the studied material. The standard deviation for $\delta^2\text{H}$ in these individual analyses was less than 3.0%.

Calibration of working standards and control samples

The CO, CO₂ and H₂ working standard gases were calibrated against various international reference materials. Thus, benzoic acid IAEA-601 ($\delta^{18}\text{O} = +23.3\%$) was used for oxygen determinations and sucrose ($\delta^{13}\text{C} = -10.4\%$) for carbon determinations. The control gas (H₂) was calibrated by using the reference materials: IAEA-CH7-Polyethylene ($\delta^2\text{H} = -100.3\%$) and NBS22-Oil ($\delta^2\text{H} = -118.5\%$).

The results of the carbon, oxygen and hydrogen isotope ratio determinations are given in per mil unit (‰) relative to VPDB (C) and VSMOW (O and H), respectively. All results were obtained from the following equation:

$$\text{Delta (‰)} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{reference}}) - 1] \times 100$$

where R is the ratio of the heavy-to-light stable isotope (e.g. $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) in the sample (R_{sample}) and standard ($R_{\text{reference}}$).

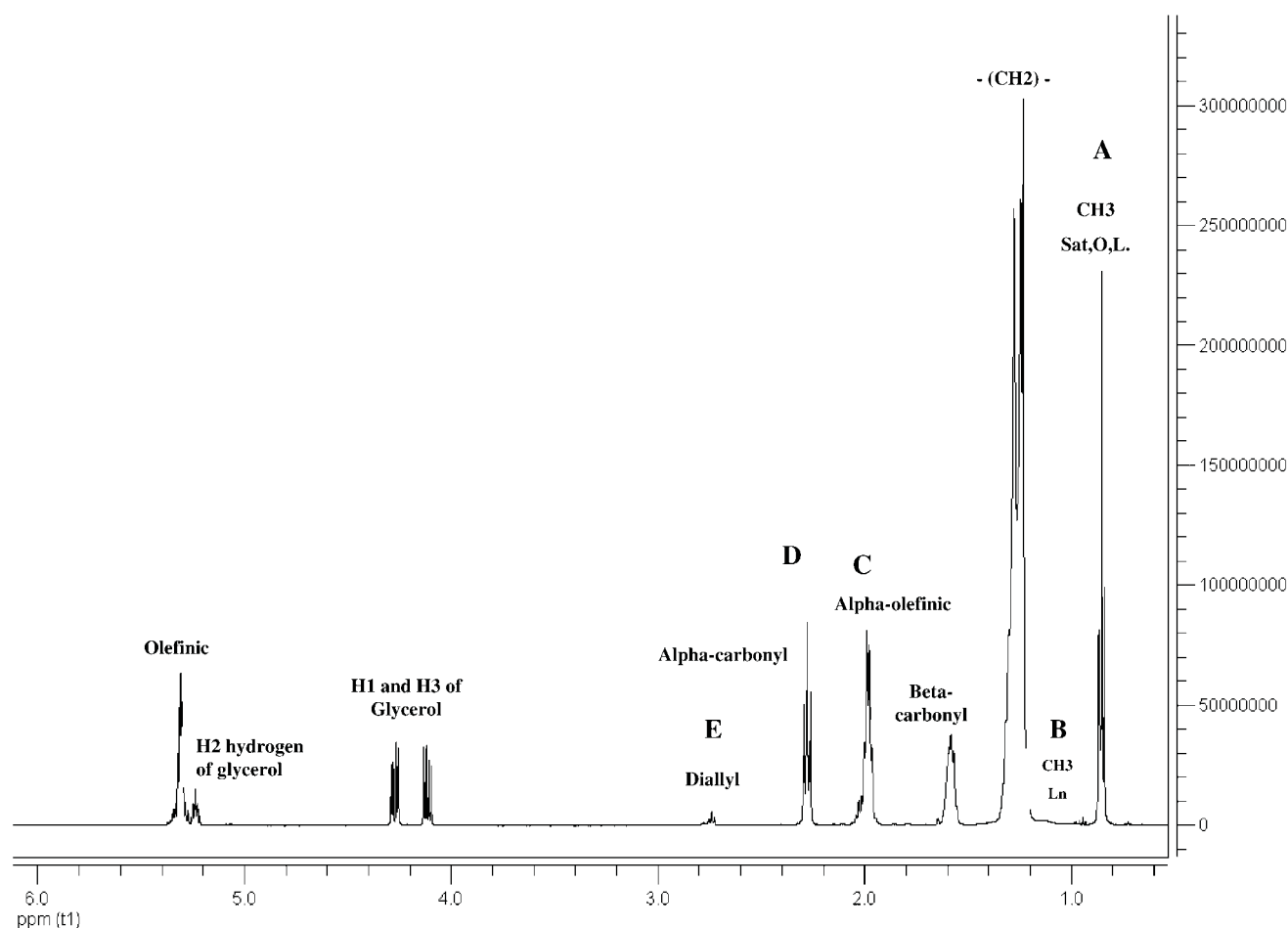


Figure 1. ^1H NMR spectrum for an extra virgin olive oil taken at 500 MHz. Sat, O, L and Ln denote saturated, mono-unsaturated, linoleic and linolenic acids, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

^1H NMR results for the oil samples

Figure 1 shows the ^1H NMR signals for the different proton types in the spectrum for an extra virgin olive oil, recorded at 500 MHz.

The proportions of the different types of fatty acids in oils and fats provide highly useful knowledge for both nutritional and technological purposes. The classical method for their estimation includes transesterification of fatty acids to methyl esters prior to gas chromatographic analysis. This methodology is subject to risks such as oxidation of the sample and artifact formation during transesterification or analysis.

There are various ways of determining a fatty acid profile from an ^1H NMR spectrum.^{31,33,41} Our best results were obtained with the method of Guillén *et al.*³¹ (Fig. 1) who determine saturated (palmitic and stearic, mainly), mono-unsaturated (oleic, mainly), and linoleic and linolenic acids (designated S, O, L and Ln, respectively) from the following expressions:

$$\text{Ln} (\%) = 100 [B/(A + B)]$$

$$\text{L} (\%) = 100 [(E/D) - 2[B/(A + B)]]$$

$$\text{O} (\%) = 100 [(C/2D) - (E/D) + [B/(A + B)]]$$

$$\text{S} (\%) = 100 [1 - (C/2D)]$$

where *A* is the area of the signal corresponding to the methyl protons in all acids except linolenic, *B* that of the signal of methyl protons in linolenic acid, *C* that of the signal of protons in allyl methylene or α -olefinic groups, *D* that for the protons in the methylene groups α to the carboxyl group and *E* that for the protons in *bis*-allyl methylene (diallyl) groups.

Tables 1 and 2 show the results for the G1, G2, H2 and A2 series. As can be seen from Table 1, the fatty acid profiles of G1 samples varied slightly with olive ripeness in the two studied varieties ('Arbequina' and 'Gordal'), which have rather different oleic acid contents. In addition, the 'Sorani' sample from Syria had a slightly lower oleic acid content than that from Spain. Rallo *et al.*⁴² classified olive oils into four groups according to fatty acid content: (i) oils with a very high oleic acid content, and low palmitic and linoleic acid contents, exhibiting MUFA/PUFA >11; (ii) oils with MUFA/PUFA between 11 and 6; (iii) oils with a high palmitic acid content in and a medium-to-high linoleic acid content with MUFA/PUFA between 6 and 4; and (iv) oils with an unusually high linolenic acid content and MUFA/PUFA <4. According to such a classification, the analyzed olive oils (see Tables 1 and 2) cover all groups from type I (e.g. most of the 'Picual' samples in the A2 series, Table 2) to type IV (e.g. the 'Gordal' samples in Table 1) with type II (e.g. the 'Hojiblanca' and 'Sorani' samples in the G2 series, Table 1) and type III

Table 1. Fatty acid profile for various oils made from olives harvested in the 2004/05 and 2005/06 seasons (suffix 1 and 2, respectively) as determined from ^1H and ^{13}C NMR spectra. Oils were made from samples from olives of the Germplasm bank of Cordoba or Cooperativa Hojiblanca (G and H series, respectively)

Season	Series	No.	Variety	RI ^b	Fatty acid composition ^c				Ratios		r_1^{**}	r_2^{**}
					% Ln	% L	% O	% Sat	(MUFA+PUFA)/SAFA	MUFA/PUFA		
2004/2005	G1	25	Arbequina	2	0.6	10.3	72.7	16.4	5.1	6.7	1.5	0.7
	G1	26	Arbequina	3	0.5	11.6	70.9	17.0	4.9	5.9	1.4	1.0
	G1	27	Arbequina	4	0.6	11.2	70.9	17.3	4.8	6.0	1.5	1.1
	G1	37	Gordal ^a	2	0.9	17.8	65.0	16.3	5.1	3.5	1.4	1.0
	G1	38	Gordal ^a	3	0.9	18.2	64.2	16.7	5.0	3.4	1.5	1.0
	G1	39	Gordal ^a	4	0.9	21.1	59.9	18.1	4.5	2.7	1.4	1.1
	G1	42	Gordal ^a	4	0.9	18.3	64.1	16.7	5.0	3.3	1.5	0.9
	G1	68	Sorani (Syria)	3	0.5	10.2	71.3	18.0	4.6	6.7	1.3	1.2
2005/2006	G1	72	Sorani (Spain)	3.3	0.6	10.8	73.6	15.0	5.7	6.5	1.6	0.7
	G2	49	Picual	3	0.8	1.7	84.3	13.2	6.6	33.7	1.5	1.0
	G2	51	Zaiti	3	0.4	6.0	77.0	16.6	5.0	12.0	1.4	1.0
	G2	53	Arbequina	3	0.5	11.1	69.0	19.4	4.2	5.9	1.5	0.7
	G2	55	Picual de Estepa	3	0.9	7.6	76.1	15.4	5.5	9.0	1.5	1.2
	G2	56	Hojiblanca	3	0.8	7.8	77.3	14.1	6.1	9.0	1.4	1.0
	G2	60	Sorani	3	0.8	6.5	78.8	13.9	6.2	10.8	1.5	0.9
	H2	3	Picual*	3	0.6	9.7	75.3	14.4	5.9	7.3	1.5	1.0
	H2	5	Picual*	3	0.9	6.5	78.4	14.2	6.0	10.6	1.5	0.9
	H2	9	Picual*	3	0.8	3.5	81.4	14.3	6.0	18.9	1.5	0.9
	H2	14	Picual*	3	0.7	2.9	82.6	13.8	6.2	22.9	1.5	0.9
	H2	15	Picual*	3	0.6	6.5	79.1	13.8	6.2	11.1	1.6	0.9
	H2	16	Picual*	3	0.7	3.6	81.3	14.4	5.9	18.9	1.5	1.1
	H2	42	Picual*	3	0.5	3.3	79.8	16.4	5.1	21.0	1.5	0.9
	H2	18	Hojiblanca*	3	0.9	7.3	78.5	13.3	6.5	9.6	1.5	1.2
	H2	22	Hojiblanca*	3	0.8	4.2	82.6	12.4	7.1	16.5	1.6	1.0
	H2	25	Hojiblanca*	3	0.9	4.1	82.9	12.1	7.3	16.6	1.6	1.0
	H2	35	Hojiblanca*	3	0.6	6.9	82.0	10.5	8.5	10.9	1.6	0.7
H2	36	Hojiblanca*	3	0.4	6.0	82.4	11.2	7.9	12.9	1.6	0.6	

^a Gordal denotes 'Gordal de Vélez Rubio'.

^b RI stands for ripeness index.

^c Ln, L, O, and Sat denote linolenic, linoleic, mono-unsaturated and saturated fatty acids, respectively. Fatty acid compositions were determined by ^1H NMR spectroscopy.

* Prevailing variety.

** r_1 and r_2 are the ratios of the mole proportions of oleic and linoleic acid, respectively, at positions 1/3 to position 2, which were determined from the carboxyl region in the ^{13}C NMR spectra.

(e.g. the 'Arbequina' sample in the G2 series) as intermediate situations.

The 'Picual' sample Nr 48 in Table 2 exhibits an unusually high linoleic acid content, suggesting that it may not be a single-seed oil. In fact, the olives were from El Carpio, a village also growing small amounts of the 'Nevadillo Negro' variety – which gives group III oils, with a medium-to-high

linoleic acid content. Thus, our oil may contain an undefined proportion of fat from such a variety. If sample Nr 48 is not considered, the data in Table 2 show no substantial differences in fatty acid profiles between oils from olives grown at different altitudes. The samples from Cooperativa Hojiblanca (Table 1, H2 series) possibly contained variable, minor proportions of other, indigenous varieties in addition

Table 2. Fatty acid profiles for various oils made from olives of the 'Picual' variety grown at variable altitudes (A2) in the 2005/06 season as determined from ^1H and ^{13}C NMR spectra

Series	No.	Altitude (m)	Ln (%)	L (%)	O (%)	S (%)	(MUFA+PUFA)/SAFA	MUFA/PUFA	r_1	r_2
A2	48	165	0.9	8.7	76.2	14.2	6.0	7.9	1.5	1.1
A2	43	334	1.0	1.0	85.5	12.5	7.0	42.8	1.5	0.6
A2	46	436	0.7	2.1	84.2	13.0	6.7	30.1	1.5	1.1
A2	45	550	0.9	2.0	84.0	13.0	6.7	29.0	1.6	0.6
A2	44	645	1.1	1.3	84.6	13.0	6.7	35.3	1.5	0.7
A2	47	935	0.7	2.7	83.9	12.7	6.9	24.7	1.5	0.9

Fatty acid compositions were determined by ^1H NMR spectroscopy.

Ln, L, O, and Sat denote linolenic, linoleic, mono-unsaturated and saturated fatty acids, respectively.

r_1 and r_2 are the ratios of the mole proportions of oleic and linoleic acid, respectively, at positions 1/3 to position 2, which were determined from the carboxyl region in the ^{13}C NMR spectra.

to 'Hojiblanca' or 'Picual'. As can be seen from Table 1, samples 3, 5 and 15 had increased linoleic contents (see sample Nr. 49 in the G2 series). Sample 3 possibly contained a small amount of 'Lechin' and/or 'Nevadillo Negro' (groups II and III, respectively). Finally, the 'Hojiblanca' sample 18 was from Alozaina and may have contained a small amount of 'Verdial' olives, thus accounting for its low oleic acid content than that of the other, mainly 'Hojiblanca', samples.

These results demonstrate (i) that the present study has been carried out on olive oil samples covering a wide range of oleic acid content, and (ii) the necessity to study only samples with a guaranteed monovarietal purity (i.e. from a germplasm bank) for some isotopic studies.

^{13}C NMR results for the oil samples

A typical ^{13}C NMR spectrum for an extra-virgin olive oil is represented in Fig. 2. The inset is a magnified view of the signals for the carboxyl carbons in saturated (S), vaccenic + 11-eicosenoic (V), oleic (O) and linoleic (L) acids at positions 1/3 and 2 on the glycerol backbone.

Tables 1 and 2 show the fatty acid distribution between positions 1/3 and 2 on the glycerol backbone as calculated from the carboxylic region in the ^{13}C NMR spectra for the studied samples. Parameter r_1 (1/3 oleic to 2 oleic ratio) in the tables represents the proportion of the area under the signal for oleic acid at positions 1/3 to that at position 2. Similarly, r_2 represents the ratio of 1/3 linoleic to 2 linoleic acid. The unsaturated acids were all preferentially oriented to position 2 (r_1 and r_2 less than 2), but the selectivity was higher for linoleic acid (r_2 from 0.6 to 1.2) than it was for oleic acid (r_1 from 1.3 to 1.6). Other authors have previously found average r_1 and r_2 values of 1.5 and 1.1, respectively.³² No saturated acids were detected at position 2. Interestingly, the

acids, vaccenic and 11-eicosenoic, were directed to 1/3 by the effect of the enzyme not recognizing them as unsaturated acids owing to the long distance between their double bond and the carboxyl group. A parallel study on 200 olive oil samples (not shown in the present paper) showed contents for both acids ranging from 1.2 to 6.9%.

Results of the SIRMS tests

Isotope contents of the olive oils

Results obtained for isotopic contents of all the samples analyzed in the present study (see Tables 3–6) spanned a very narrow $\delta^{13}\text{C}$ range (-30.2 to -27.1%); this is consistent with values described for plants following the C_3 (Calvin) biosynthetic pathway. The $\delta^{18}\text{O}$ values ranged from 21.4 to 27.6‰. The sole primary source of hydrogen for any organic compound in the biosphere is water and, for plant biomass, water in leaves. The actual $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratio is governed by geographical, climatic and physiological factors including altitude, latitude, precipitation, and plant evapotranspiration; from here isotope discrimination in the metabolism starts.¹⁷ Our $\delta^2\text{H}$ values (-129.9 to -153.0%) are consistent with previously reported values for fat from plants following the C_3 cycle: -120 to -196% .^{43–45} As can be seen, the range spanned by $\delta^{13}\text{C}$ was narrower than those for the other two isotopes.

To consider the influence of different variables on the isotopic distribution, it was first necessary to fix many of the variables known to influence the isotopic distribution (such as altitude, distance to the sea, or temperature). Thus, monovarietal samples from the germplasm bank in Cordoba, corresponding to the 2004/2005 season (G1 series), were analyzed. The results are presented in Table 3. As can be seen

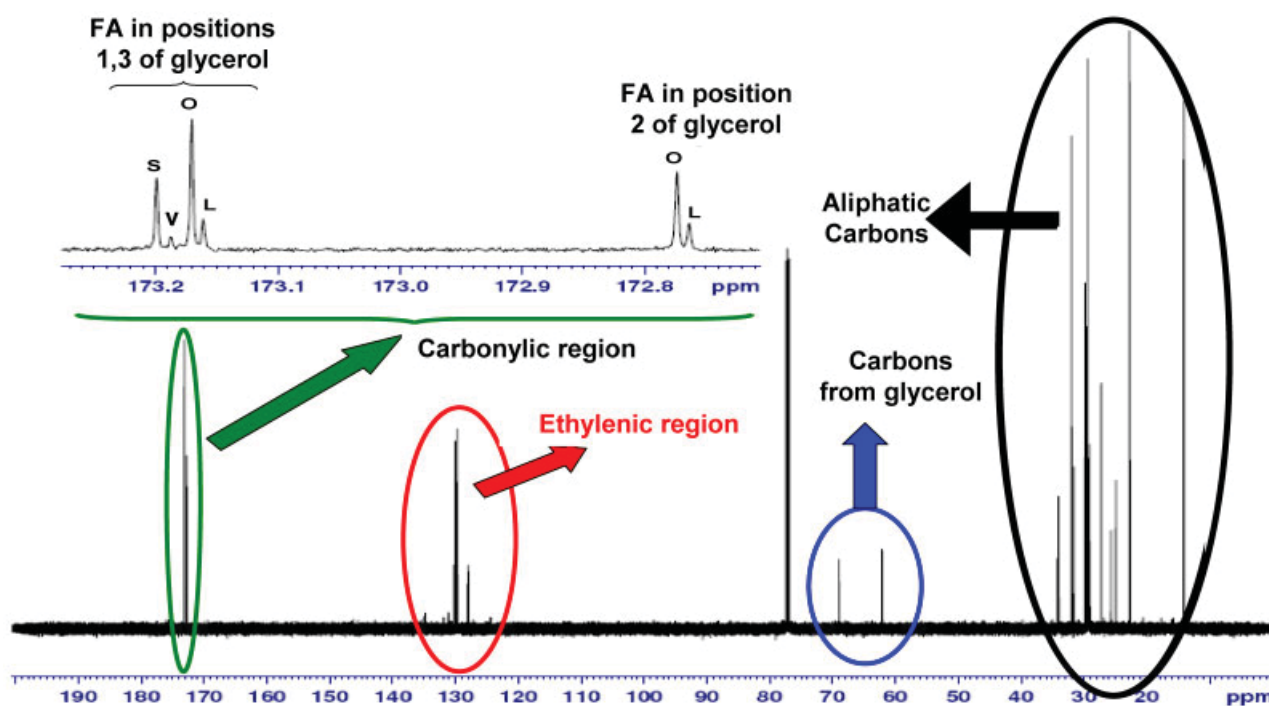


Figure 2. ^{13}C NMR spectrum for an extra virgin olive oil taken at 125.77 MHz. S, V, O and L denote saturated, vaccenic + 11-eicosenoic, oleic and linoleic acids, respectively.

Table 3. Isotope abundance ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$) for samples from the germplasm of Córdoba harvested in variable degrees of ripeness in the 2004/05 and 2005/06 seasons (G1 and G2, respectively)

Season	Series	No.	Variety	RI ^a	Origin	$\delta^{18}\text{O}^b$	$\delta^{13}\text{C}^c$	$\delta^2\text{H}^d$
2004/05	G1	25	Arbequina	2	Córdoba	21.6	-30.2	-147
	G1	26	Arbequina	3	Córdoba	21.4	-29.9	-145
	G1	27	Arbequina	4	Córdoba	21.7	-29.9	-144
	G1	37	Gordal Vélez Rubio	2	Córdoba	25.3	-29.9	-136
	G1	38	Gordal Vélez Rubio	3	Córdoba	24.9	-30.2	-139
	G1	39	Gordal Vélez Rubio	4	Córdoba	25.2	-29.4	-137
	G1	42	Gordal Vélez Rubio	4	Córdoba	25.4	-29.8	-139
	**	68	Sorani (Syria)	3	Edleb	23.6	-28.7	-137
	**	72	Sorani (Spain)	3.3	Cabra*	23.5	-28.3	-130
	2005/06	G2	49	Picual	3	Córdoba	22.8	-30.2
G2		51	Zaity	3	Córdoba	27.6	-30.0	-134
G2		53	Arbequina	3	Córdoba	22.1	-29.4	-153
G2		55	Picual de Estepa	3	Córdoba	25.4	-27.8	-145
G2		56	Hojiblanca	3	Córdoba	23.7	-28.8	-153
G2**		60	Sorani (Spain)	3	Cabra*	24.9	-28.1	-136

* An experimental farm in the province of Córdoba.

** Samples of the same variety harvested in the 2003/04 season in Spain and Syria.

^a RI stands for ripeness index.

^b Standard deviation of $\delta^{18}\text{O}/\delta^{16}\text{O}$ equal to or less than 0.3‰.

^c Standard deviation of $\delta^{13}\text{C}/\delta^{12}\text{C}$ equal to or less than 0.1‰.

^d Standard deviation of $\delta^2\text{H}/\delta^1\text{H}$ equal to or less than 3‰.

Table 4. Isotope abundance ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$) for samples of the Picual variety harvested at variable altitudes in the 2005/06 season (A2)

No.	Variety	Origin	Distance to sea (km)	Latitude	Longitude	Altitude (m)	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$
48	Picual*	El Carpio (Córdoba)	150.5	37°35 N	4°06 W	165	26.0	-28.9	-132
43	Picual	Baena (Córdoba)	98.8	37°52 N	4°46 W	334	25.1	-28.9	-137
46	Picual	Mancha Real (Jaén)	117.0	37°47 N	3°36 W	436	22.9	-29.5	-152
45	Picual	Martos (Jaén)	111.5	37°37 N	4°19 W	550	22.5	-27.9	-139
44	Picual	Alcaudete (Jaén)	94.0	37°56 N	4°30 W	645	24.0	-28.3	-139
47	Picual	Iznalloz (Granada)	75.5	37°43 N	3°58 W	935	24.2	-28.5	-145
Mean							24.1	-28.7	-141

* The NMR results (Table 2) are consistent with a high linoleic acid content.

(compare rows 1–3 and 4–7), olive ripeness had no influence on isotope distribution in any olive variety. Therefore, all olives for subsequent studies were collected at a ripeness index of 3. Despite their different origin, samples 68 (Syria) and 72 (Spain) exhibited a very similar isotope distribution. On the other hand, samples 25 and 72 had a very similar fatty

acid distribution (see Table 1), but differed in their isotope distributions probably as a result of them being from different varieties.²⁸ In addition, samples 26 and 42, which differed in their fatty acid distribution (Table 1), had a similar value for $\delta^{13}\text{C}$ but differed in those for the other two isotopes. No straightforward relationship therefore seems to exist

Table 5. Isotope abundance ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$) for samples of Cooperativa Hojiblanca harvested in the 2005/06 season (H2)

Series	No.	Prevailing variety	Origin	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$
H2	3	PICUAL	OBEJO (Córdoba)	24.5	-28.6	-137
H2	5	PICUAL	HINOJOSA DEL DUQUE (Córdoba)	25.1	-27.8	-142
H2	9	PICUAL	SANTAELLA (Córdoba)	24.3	-28.9	-144
H2	14	PICUAL	MONTORO (Córdoba)	23.9	-29.0	-140
H2	15	PICUAL	VILLANUEVA DEL REY (Córdoba)	24.4	-27.7	-143
H2	16	PICUAL	VALENZUELA (Córdoba)	24.5	-28.2	-142
H2	42	PICUAL	ESPEJO (Córdoba)	24.7	-28.6	-136
Mean		PICUAL		24.5	-28.4	-141
H2	18	HOJIBLANCA	ALOZAINA (Málaga)	25.0	-27.1	-142
H2	22	HOJIBLANCA	ARCHIDONA (Málaga)	23.9	-27.7	-146
H2	25	HOJIBLANCA	CAMPILLOS (Málaga)	23.6	-28.4	-143
H2	35	HOJIBLANCA	COLMENAR (Málaga)	23.3	-27.9	-138
H2	36	HOJIBLANCA	LUCENA (Córdoba)	23.5	-28.1	-135
Mean		HOJIBLANCA		23.7	-28.0	-140

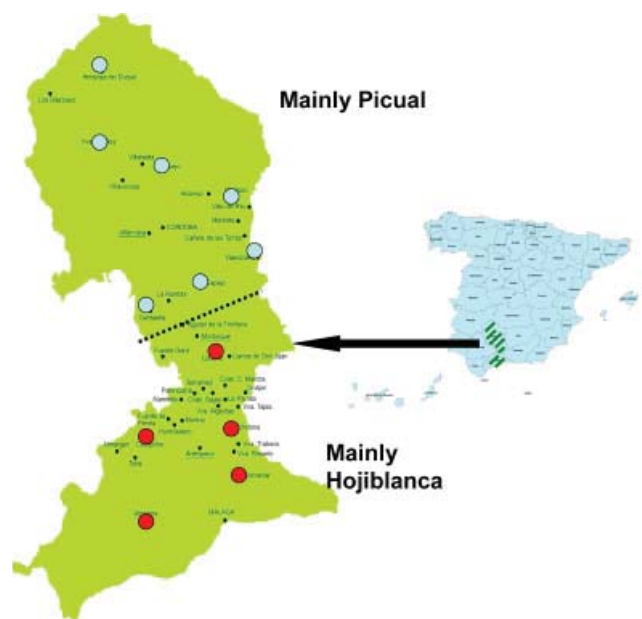
Table 6. $\delta^{13}\text{C}$ values for samples from irrigation- and dryland-grown Hojiblanca and Picual olives

Series	Variety	No.	Growing conditions	$\delta^{13}\text{C}$
G2	Picual	49	Drip irrigation	-30.2
G4	Picual	49	Drip irrigation	-29.9
G5	Picual	2	Drip irrigation	-29.8
A2	Picual	48	Dryland	-28.9
A3	Picual	48	Dryland	-28.9
H2	Picual	Mean	Dryland	-28.3
H3	Picual	Mean	Dryland	-29.2
G2	Hojiblanca	56	Drip irrigation	-28.8
G3	Hojiblanca	5	Drip irrigation	-28.9
H2	Hojiblanca	Mean	Dryland	-27.9
H3	Hojiblanca	Mean	Dryland	-28.4

between the isotope distribution and the fatty acid composition of olive oil although we decided to confirm this for olive oils from diverse fruit varieties obtained from the germplasm bank of Cordoba for the following season (2005/06, G2 series, Table 3). Samples 51, 55 and 56 which were obtained from different olive varieties and had similar fatty acid distributions (see Table 1) differed in their values for the three isotopes. This confirms the trend observed in the samples from the previous season (G1) and hence that the joint use of the three isotope distributions allows oils from different olive varieties to be distinguished. As previously found in wines,⁴⁶ differences in carbon isotope abundance between oils from a given production area are a result of differences in environmental conditions (e.g. water stress, atmospheric moisture, temperature) during plant growth. Because such conditions were invariable for the G2 samples, the differences exhibited by this series must have arisen from varietal differences. This confirms previous results²⁸ which revealed that $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ are influenced by olive variety and origin, but not by olive ripeness.

For samples from the 2005/06 season we also examined the potential influence of altitude on $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ for oil samples obtained from 'Picual' olives collected at heights from 165 to 935 m and similar latitudes, longitudes and distances from the sea (series A2, Table 4). The results, however, revealed no clear-cut variation pattern. As expected, $\delta^{18}\text{O}$ decreased with increasing altitude from 165 to 550 m. Above 550 m, however, the $\delta^{18}\text{O}$ values were similar irrespective of altitude. The $\delta^{13}\text{C}$ values ranged from -27.9 to -29.5‰ and varied in no definite manner with altitude. Finally, the $\delta^2\text{H}$ values ranged from -132 to -152‰. As expected, $\delta^2\text{H}$ decreased with increasing height from 165 to 436 m; above 436 m, however, the $\delta^2\text{H}$ values were higher but similar to one another except in the sample collected at 935 m, which exhibited a decreased value. Therefore, there is no clear tendency of isotopic values with altitude probably as a result of the influence of many variables that are difficult to fix such as soil type, use or not of irrigation, and climate.⁴⁷

The influence of other geographical coordinates such as distance to the sea on isotopic values was then studied for samples from the 2005/06 season, and for this we relied on the collaboration of Cooperativa Hojiblanca (H2 series). Table 5 shows the $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ values for the series H2 together with the corresponding prevailing olive variety and origin. Figure 3 shows the geographical distribution of the

**Figure 3.** Geographical origin of the studied samples from Cooperativa Hojiblanca. The 'Picual' variety prevails north of the dotted line and the 'Hojiblanca' variety south of it.

places of origin and bounds the area of prevalence of each variety. As can be seen, the areas lying closest to the sea were preferentially cultivated with the 'Hojiblanca' variety and their $\delta^{18}\text{O}$ values ranged from 23.3 to 23.9‰; by exception, sample 18 had $\delta^{18}\text{O} = 25.0$ ‰ caused by the effect of the presence of the 'Verdial' variety in the samples from Alosaina, as commented above. In the northern area it is the 'Picual' variety which is cultivated and these samples had $\delta^{18}\text{O}$ values from 23.9 to 25.1‰. One would expect that the further from the sea that the olives are grown (in this case, more to the north), the lower will be the isotope values obtained. Moreover, the northern areas have a colder climate, which again would result in lower isotope values. However, because olive variety and geographical origin are mutually related, their individual influence cannot be established. It does seem that the influence of olive variety masks that of both climate and distance to the sea. If samples corresponding to the same variety are considered, there is again no clear effect of geography on the isotopic values, probably because of the contribution of some other minor indigenous varieties as discussed above.

Finally, the effect of irrigation on isotopic values has also been studied. The 'Picual' and 'Hojiblanca' samples from drip-irrigated groves had lower $\delta^{13}\text{C}$ values than those grown on dry land (see Table 6).

Future prospects: towards PDO differentiation

Figure 4 compares the average $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ values for the olive varieties most widely grown in Andalusia ('Hojiblanca' and 'Picual', see Tables 4 and 5) corresponding to the 2005/2006 season with those previously found by Camin *et al.*²⁹ in oils from four different Italian regions. These authors distinguished four Italian regions (labeled as North, Centre, South 1 and South 2) which are identified in a map in Fig. 5 (see Supporting Information). From that map one could

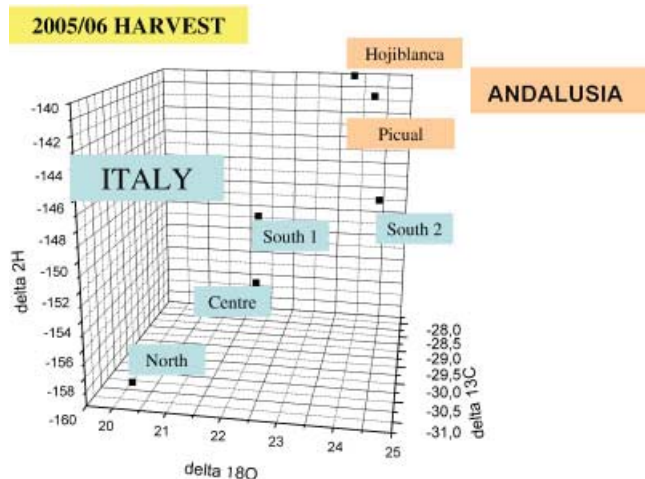


Figure 4. Comparison of Andalusian and Italian oils from olives harvested in the same season.

expect that Italian olive oils exhibiting the closest isotopic composition to Andalusian ones would be those produced in the South 2 region whereas, in contrast, Andalusian olive oils would be expected to differ to a large extent from those coming from northern regions of Italy. This is exactly what data in the 3D graphical representation in Fig. 4 indicate. Nevertheless, in this case, the hydrogen isotopic composition enables differentiation between the Italian and Spanish (Andalusian) olive oils. Once the different variables influencing the isotopic composition of olive oils have been considered, the next step in the project is the study of PDO samples and this part of the project is currently in progress. In principle, those PDO regions which seem particularly susceptible to differentiation through isotopic determination are those exhibiting a particular climatology (e.g. mountains) and/or presenting some indigenous olive varieties.

It could also happen that, as suggested by different authors and commented on in the Introduction, PDO differentiation requires the combination of several techniques (e.g. NMR or other spectroscopies and SIRMS). Since the 2004/05 season we have been compiling data on Andalusian olive oils from different techniques (NIR, Raman, ^1H and ^{13}C NMR and SIRMS) in order to create a database similar to that existing in wine. All the analyzed samples have been retained refrigerated in case some new techniques can be used in the future.

CONCLUSIONS

The results for the samples in the series G1 reveal that olive ripeness affects the abundance of none of the three studied isotopes. Based on the results for series G1 and G2, however, the olive variety does affect the three isotopes (particularly ^{18}O and ^2H , and, less markedly, ^{13}C). However, no clear-cut relationship between isotope distribution and fatty acid composition appears to exist in the studied oils.

The results obtained for the three isotopes are consistent with the expectations for plants following the C_3 cycle. Those for the series H2 ('Pical' and 'Hojiblanca' olives harvested in the provinces of Córdoba and Málaga in the 2005/06 season)

suggest that some samples include a local variety in addition to the major one, as reflected in both the fatty acid profiles and the isotope abundances. Such a result, together with the fact that the major olive oil variety changes with latitude ('Pical' in the north and 'Hojiblanca' in the south) did not allow us to observe any influence of the latitude itself on isotopic values. Moreover, the samples in series A2 did not display any clear-cut effect of altitude on any isotope. The olive variety is seemingly the main source of differences in isotope abundance; however, sample origin also has an important effect on the oxygen and hydrogen isotopes, which may be useful in distinguishing oils from different designations of origin. The oils from the 'Pical' and 'Hojiblanca' olives grown in drip-irrigated land have low $\delta^{13}\text{C}$ values relative to dryland-grown olives. A comparison of the $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ values for oils of the 2005/06 season from the two olive varieties prevailing in Andalusia ('Hojiblanca' and 'Pical') with those previously reported by Camin *et al.*²⁹ for oils from four different Italian regions reveals that oils from olives of the two countries grown in the same season can be easily distinguished (especially in terms of $\delta^2\text{H}$), and also that the oils from the South 2 Italian region are the most similar to the Spanish oils.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge funding by Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Projects FQM-3931, FQM-2695 and FQM-4781) and Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía and Spain's Ministerio de Educación y Ciencia (Projects CTQ2007-65754 and CTQ2008-01330, co-funded by FEDER). They are also grateful to Laboratorio Arbitral Agroalimentario (Madrid) for intercomparative studies on analyses of $\delta^{13}\text{C}$ in olive oil samples and to Cooperativa Hojiblanca for kindly supplying oil samples for analysis.

REFERENCES

- Lerma-García MJ, Ramis-Ramos G, Herrero-Martínez JM, Simó-Alfonso EF. *Food Chem.* 2010; **118**: 78.
- Lai YW, Kemsley EK, Wilson RH. *Food Chem.* 1995; **53**: 95.
- Šmejkalová D, Piccolo A. *Food Chem.* 2010; **118**: 153.
- Peña F, Cárdenas S, Gallego M, Valcárcel M. *J. Chromatogr. A* 2005; **1074**: 215.
- Gómez-Ariza JL, Arias-Borrego A, García-Barrera T, Beltran R. *Talanta* 2006; **70**: 859.
- Parcerisa J, Casals I, Boatella J, Codony R, Rafecas M. *J. Chromatogr. A* 2000; **881**: 149.
- Angerosa F, Camera L, Cumitini S, Gleixner G, Reniero F. *J. Agric. Food Chem.* 1997; **45**: 3044.
- Spangenberg JE, Ogrinc N. *J. Agric. Food Chem.* 2001; **49**: 1534.
- Guimet F, Ferré J, Boqué R. *Anal. Chim. Acta* 2005; **544**: 143.
- Flores G, Ruiz del Castillo ML, Blanch GP, Herraiz M. *Food Chem.* 2006; **97**: 336.
- Rezzi S, Axelson DE, Héberger K, Reniero F, Mariani C, Guillou C. *Anal. Chim. Acta* 2005; **552**: 13.
- Alonso-Salces RM, Héberger K, Holland MV, Moreno-Rojas JM, Mariani C, Bellan G, Reniero F, Guillou C. *Food Chem.* 2010; **118**: 956.

13. D'Imperio M, Mannina L, Capitani D, Bidet O, Rossi E, Bucarelli FM, Quaglia GB, Segre A. *Food Chem.* 2007; **105**: 1256.
14. Shaw AD, di Camillo A, Vlahov G, Jones A, Bianchi G, Rowland J, Kell DB. *Anal. Chim. Acta* 1997; **348**: 357.
15. López-Feria S, Cárdenas S, García-Mesa JA, Valcárcel M. *Talanta* 2008; **75**: 937.
16. Cerrato Oliveros C, Boggia R, Casale M, Armanino c, Forina M. *J. Chromatogr. A* 2005; **1076**: 7.
17. Araghipour N, Colineau J, Koot A, Akkermans W, Moreno Rojas JM, Beauchamp J, Wisthaler A, Märk TD, Downey G, Guillou C, Mannina L, van Ruth S. *Food Chem.* 2008; **108**: 374.
18. Rui Alves M, Cunha SC, Amaral JS, Pereira JA, M. Oliveira B. *Anal. Chim. Acta* 2005; **549**: 166.
19. Zunin P, Boggia R, Salvadeo P, Evangelisti F. *J. Chromatogr. A* 2005; **1089**: 243.
20. Ollivier D, Artaud J, Pinatel C, Durbec JP, Guérère M. *Food Chem.* 2006; **97**: 382.
21. Haddada FM, Manai H, Daoud D, Fernández X, Lizzani-Cuvelier L, Zarrouk M. *Food Chem.* 2007; **103**: 467.
22. Benincasa C, Lewis J, Perri E, Sindona G, Tagarelli A. *Anal. Chim. Acta* 2007; **585**: 366.
23. Busconi M, Foroni C, Corradi M, Bongiorno C, Cattapan F, Fogher C. *Food Chem.* 2003; **83**: 127.
24. Matos LC, Cunha SC, Amaral JS, Pereira JA, Andrade PB, Seabra RM, Oliveira BPP. *Food Chem.* 2007; **102**: 406.
25. Casale M, Casolino C, Oliveri P, Forina M. *Food Chem.* 2010; **118**: 163.
26. Royer A, Gerard C, Naulet N, Lees M, Martin GJ. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999; **76**: 357.
27. Angerosa F, Bréas O, Contento S, Guillou C, Reniero F, Sada E. *J. Agric. Food Chem.* 1999; **47**: 1013.
28. Aramendía MA, Marinas A, Marinas JM, Moreno JM, Moalem M, Rallo L, Urbano FJ. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007; **21**: 487.
29. Camin F, Larcher R, Perini M, Bontempo L, Bertoldi D, Gagliano G, Nicolini G, Versini G. *Food Chem.* 2010; **118**: 901.
30. Bontempo L, Camin F, Larcher R, Nicolini G, Perini M, Rossmann A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; **23**: 1043.
31. Guillén MD, Ruiz A. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2003; **105**: 688.
32. Mavromoustakos T, Zervou M, Theodoropoulos E, Panagiotopoulos G, Bonas G, Day M, Helmis A. *Magn. Reson. Chem.* 1997; **35**: S3.
33. Vlahov G. *Prog. Nucl. Mag. Res. Spectr.* 1999; **35**: 341.
34. Sacchi R, Addeo F, Paolillo L. *Magn. Reson. Chem.* 1997; **35**: 5133.
35. Mannina L, Luchinat C, Emanuele MC, Segre A. *Chem Phys. Lipid* 1999; **103**: 47.
36. Mannina L, Luchinat C, Patumi M, Emanuele MC, Rossi E, Segre A. *Magn. Reson. Chem.* 2000; **38**: 886.
37. Commission Regulation (EC) No 2729/2000, *Off. J. Eur. Comm.* N L316/16.
38. Martínez JM, Muñoz E, Alba J, Lanzón A. *Grasas y Aceites* 1975; **26**: 379.
39. Rial DJ, Falque E. *J. Sci. Food Agric.* 2003; **83**: 912.
40. Craig H. *Geochim. Cosmochim. Acta* 1957; **12**: 133.
41. Knothe G, Kenar JA. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2004; **106**: 88.
42. Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martín A, Tous J, Trujillo I. *Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, Spain*, 2005; 360.
43. Schmidt HL, Werner RA, Eisenreich W. *Phytochem. Rev.* 2003; **2**: 61.
44. Sternberg LDSL, DeNiro MJ, Ajie HO. *Planta* 1986; **169**: 320.
45. Schmidt HL, Eisenreich W. *Isot. Environ. Health Stud.* 2001; **37**: 253.
46. Rossmann A, Schmidt HL, Reniero F, Versini G, Moussa I, Merle MH. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1996; **203**: 293.
47. Aparicio R, Luna G. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2002; **104**: 614.

Publicación 2.

Química del aceite de oliva: trazabilidad y desarrollo sostenible.

**A. Marinas, E. Sánchez López, J. Hidalgo Carrillo, M.I.
Sánchez, M.A. Aramendía, J.M. Marinas, F.J. Urbano.**

**Alimentación, Equipos y Tecnología, Número 252, 2010, págs.
39-43.**

QUÍMICA DEL ACEITE DE OLIVA: TRAZABILIDAD Y DESARROLLO SOSTENIBLE

*A. Marrinas,
E. Sánchez López,
J. Hidelgo Carrillo,
M.I. Sánchez,
M.A. Aramendiá,
J.M. Marrinas,
E.J. Urbano*
Dpto. de Química Orgánica
Universidad de Córdoba

EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, DENTRO DEL GRUPO FQM-162 DEL PAIDI (PLAN ANDALUZ DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN), UN GRUPO DE INVESTIGADORES VIENE TRABAJANDO DESDE EL AÑO 2000 TRATANDO DE APORTAR SU EXPERIENCIA AL SECTOR DEL ACEITE DE OLIVA. RECIENTEMENTE, LA JUNTA DE ANDALUCÍA LES HA CONCEDIDO UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE EXCELENCIA, EN LA MODALIDAD DE JOVENES INVESTIGADORES, TITULADO "QUÍMICA DEL ACEITE DE OLIVA: TRAZABILIDAD Y DESARROLLO SOSTENIBLE". DE ESTA FORMA, SE APLICARÁ LA EXPERIENCIA DEL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN PARA ABORDAR DOS TEMAS FUNDAMENTALES ASOCIADOS AL SECTOR DEL ACEITE DE OLIVA, PRODUCTO ESTRELLA EN NUESTRA COMUNIDAD: A) POR UN LADO, SE INTENTARÁ ASEGURAR LA TRAZABILIDAD DEL MISMO MEDIANTE EL EMPLEO DE LA TÉCNICA DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ISÓTOPOS ESTABLES (FIGURA 1), ELABORANDO UNA BASE DE DATOS COMPLEMENTADA CON LAS ESPECTROSCOPÍAS NIR Y RAMAN Y CON LAS RMN DE PROTON Y CARBONO-13, CON VISTAS A PROTEGER DENOMINACIONES DE ORIGEN Y DETECTAR FRAUDES; B) POR OTRO, SE TRATARÁ DE DISMINUIR EL IMPACTO AMBIENTAL OCASIONADO EN LA PRODUCCIÓN DEL ACEITE, EMPLEANDO LUZ SOLAR



Figura 1. Los investigadores del proyecto con el equipo de espectrometría de masas de isótopos estables

La espectrometría de masas de isótopos estables (SIRMS, en inglés) es una variante de la espectrometría de masas que tiene por objeto la medida, con una alta exactitud y precisión, de las variaciones en la abundancia isotópica natural de los isótopos estables ligeros de C, O, H, N, y S en muy diversos tipos de muestra. Lo interesante, y lo que hace que esta técnica sea ideal para el estudio de denominaciones de origen, es que las pequeñas variaciones en composición isotópica de muestras naturales son debidas a cambios en temperatura, altitud, distancia al mar... Esto es, a factores claramente relacionados con condiciones geográficas.

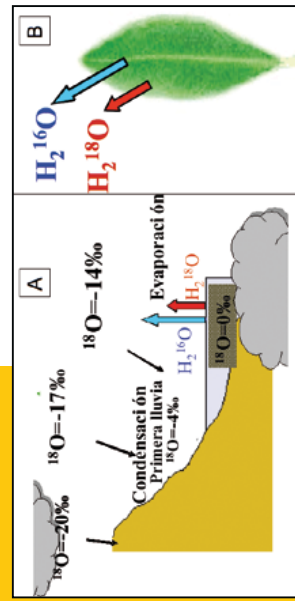


Figura 2. Influencia de factores como la altitud, la distancia al mar (A) y la temperatura (B) en la composición isotópica. La mayor longitud de las flechas indica una mayor evaporación. Los valores numéricos corresponden a la notación específica empleada en la técnica: un valor más negativo corresponde a una menor proporción en el isótopo más pesado

Trazabilidad del aceite de oliva

Para entenderlo bien, podemos tomar como ejemplo el análisis de una muestra de agua. Como sabemos, la composición química es siempre H₂O, pero si nos fijamos en el oxígeno podemos encontrarlos fundamentalmente dos isótopos diferentes el ¹⁶O y el ¹⁸O, pesando más el segundo. Si analizamos el agua de mar, tendrá un determinado número de moléculas con ¹⁶O y otro con ¹⁸O, siendo más ligeras las primeras, por lo que se evaporarán más fácilmente (véase flecha de mayor longitud en figura 2A). Por lo tanto, las primeras nubes que se forman, estarán constituidas, fundamentalmente, por el agua con el isótopo más ligero y, tanto más, cuanto a mayor altura sobre el nivel del mar se encuentre el punto considerado.

Por otro lado, una vez formadas en los océanos, las nubes se desplazan hacia zonas del interior (más continentales) pero, nuevamente, el agua con el isótopo más ligero se desplazará más fácilmente por lo que, cuanto más hacia el interior nos desplazemos, mayor será la proporción de H₂O con ¹⁶O que encontraremos.

Otro de los factores que influye en la composición isotópica es la temperatura (figura 2B). A través de la hoja, se produce pérdida de agua conocida como evotranspiración. Esa pérdida será tanto mayor, cuanto mayor sea la temperatura. Por otra parte, las moléculas de agua que se evaporarán con mayor facilidad serán las que contengan el isótopo de oxígeno que pesa menos (¹⁶O).

¿Cómo se relaciona esto con el aceite? Como se puede ver en la figura 3, el oxígeno que tiene el aceite proviene, en último término, del CO₂ que ha fijado el olivo mediante la fotosíntesis y del H₂O de lluvia (o riego, si lo hubiera), influyendo, asimismo, la pérdida a través de las hojas mediante la evotranspiración por lo que, analizando el oxígeno de una muestra de aceite, podremos ver la influencia en su composición isotópica de factores geográficos y de climatología.

Un razonamiento similar podría aplicarse a la medida de la composición isotópica en carbono (que depende de la del CO₂) o el hidrógeno (que guardará relación con el agua de lluvia y la del posible riego).

A la vista de lo anteriormente expuesto, cabría esperar, por ejemplo, que analizando por esta técnica muestras de aceite de Andalucía e italianas procedentes de diferentes regiones, las que presentarán valores más similares a las andaluzas serán las mostradas en la figura 4A como región Sur 2, mientras que las más alejadas serán las del norte de Italia. Esto es exactamente lo que se observa en la figura 4B en la que se comparan los valores isotópicos medios de muestras andaluzas de las variedades 'picual' y 'hojiblanca' con los de muestras italianas [1] para la campaña 2005/06. El estudio se está ampliando ahora a la diferenciación entre denominaciones de origen andaluzas.

Al mismo tiempo, a todas las muestras se les están haciendo análisis por otras técnicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C y ¹H, Espectroscopias Infrarroja y Raman, que permitan obtener información complementaria con vistas a constituir la base de datos sobre aceites de oliva virgen andaluces.

Tras varios años de estudio, aplicando métodos cuantitativos, esperamos que, los resultados de todas las técnicas (figura 5) contribuyan a confeccionar el puzle que permita diferenciar denominaciones de origen andaluzas.

Detección de fraudes

Por otro lado, la técnica puede ser empleada para la detección de fraudes por venta como aceite de oliva virgen de aceite de oliva mezclado con otros aceites vegetales más baratos (como el de avellana). En este caso, la diferenciación se basa en diferencias entre las distintas especies vegetales en la manera como fijan el CO₂ en la fotosíntesis.

LAS PEQUEÑAS VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN ISOTÓPICA DE MUESTRAS NATURALES SON DEBIDAS A CAMBIOS EN LA TEMPERATURA, LA ALTITUD, LA DISTANCIA AL MAR... ES DECIR, FACTORES CLARAMENTE RELACIONADOS CON LAS CONDICIONES GEOGRÁFICAS

Desarrollo sostenible en la producción de aceite

Por otra parte, el Grupo de Investigación FQM-162 ha trabajado desde el año 2001 en el empleo de la luz como fuente de energía bien para destruir contaminantes bien para transformar compuestos orgánicos en otros más benéficos con el medio ambiente mediante la fotocatalisis [2].

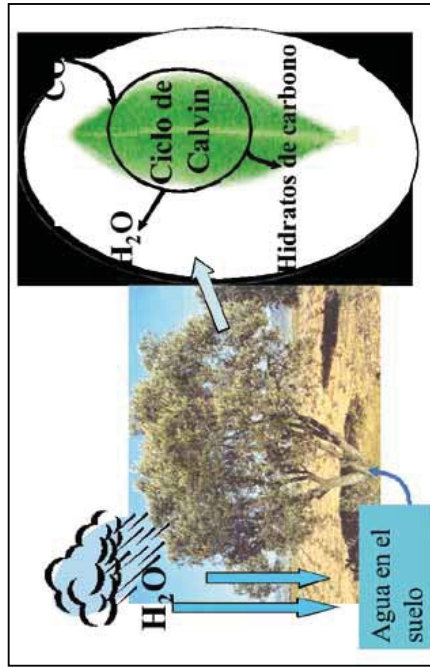


Figura 3. Representación esquemática del origen del oxígeno, hidrógeno y carbono presentes en una muestra de aceite. El llamado ciclo de Calvin es el ciclo fotosintético mediante el cual la planta produce sus nutrientes

TRAS VARIOS AÑOS DE ESTUDIO ESTOS MÉTODOS PERMITEN CONFECCIONAR EL PUZLE QUE PERMITA DIFERENCIAR LAS DENOMINACIONES DE ORIGEN ANDALUZAS

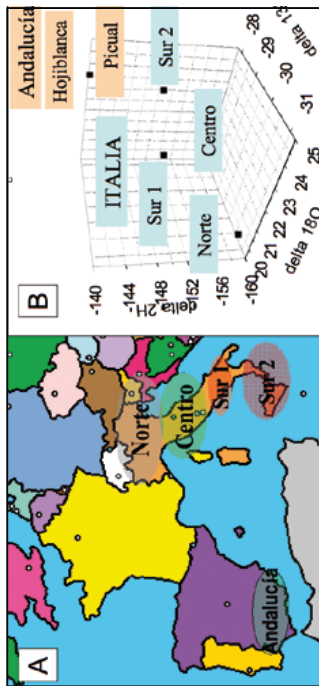


Figura 4. A) Distribución geográfica de las muestras andaluzas analizadas, así como de otras estudiadas por investigadores italianos. B) Resultados encontrados por la técnica de espectrometría de masas de isótopos estables para muestras correspondientes a la campaña 2005/2006

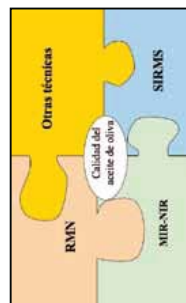


Figura 5. Las diferentes técnicas empleadas aportarán datos complementarios que contribuirán a crear la base de datos sobre aceites andaluzes que, en último término, redundará en el aseguramiento de su calidad, protegiendo a las denominaciones de origen y evitando fraudes

A lo largo de estos años ha descrito, por ejemplo, la destrucción fotocatalítica de residuos en aguas de fluoxypyr (3), herbicida empleado en el olivar. El proceso condujo a la total destrucción del contaminante con lo que no originó residuos tóxicos.

En la fotocatalisis se parte del agua contaminada y se le agrega una sustancia sólida (como el TiO₂) o líquida (iones Fe²⁺ y agua oxigenada). La luz es "captada" por esa sustancia, llamada fotocatalizador y su energía "empleada" para destruir el contaminante. Ahora se está

tratando de aplicar para la limpieza del agua de lavado de las aceitunas.

En la Figura 6 se muestra, esquemáticamente, el proyecto a realizar con la planta piloto de fotocatalisis que opera con luz solar. Se solicitarán muestras de agua procedentes del lavado de las aceitunas a la Asociación Cordobesa de Industrias de Almazaras. A dichas muestras se les realizará, en primer lugar, un análisis mediante método multirresiduo para detectar los posibles agentes contaminantes presentes en ella.

Una vez efectuados esos ensayos sobre el agua de partida, se procederá a estudiar su descontaminación mediante luz solar, empleando uno de los fotocatalizadores antes descrito. La degradación se lleva a cabo en un reactor que opera con un volumen de líquido de 25-50L equipado con sensores que estudian en línea la variación de pH, potencial redox, y oxígeno disuelto permitiendo, de este modo, obtener información muy útil para conocer qué es lo que

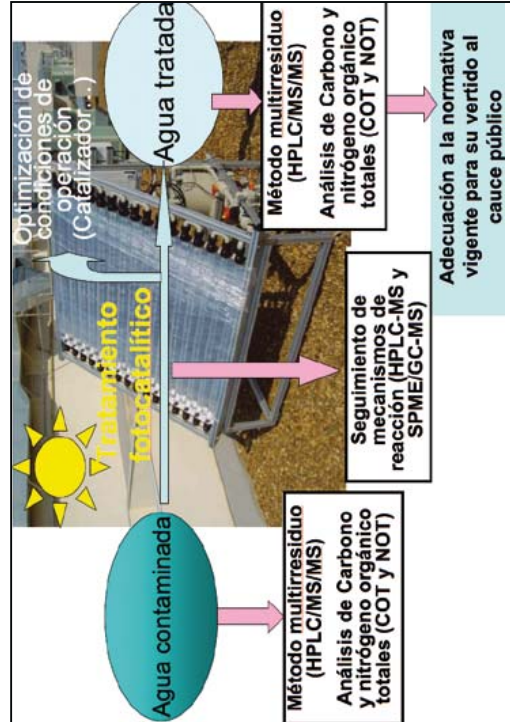


Figura 6. Representación esquemática del proceso de descontaminación de las aguas de lavado de las aceitunas empleando luz solar, mediante fotocatalisis

está ocurriendo. Asimismo, la medición de la irradiación solar es llevada a cabo mediante un radiómetro, siendo transferidos todos estos datos a un ordenador. Se optimizarán las condiciones de operación de modo que el proceso sea lo más rápido y seguro posible. Para ello se llevará a cabo un estudio de intermedios de reacción mediante HPLC-MS y SPME-GC-MS. Esto es muy importante para asegurarse de que los contaminantes se están transformando en otras sustancias menos tóxicas. Dependiendo de la composición del agua a descontaminar, se podrán seleccionar diferentes contaminantes como productos modelo con objeto de estudiar su desfofocación mediante luz solar. En último término se comprobará la adecuación de la composición de las aguas para su vertido al cauce público según la normativa vigente.

Finalmente indicar que el Prof. Alberto Marinas es Vice-Chairman de una Acción COST de la Unión Europea denominada UBIOCHEM que versa sobre la utilización de la biomasa para la obtención sostenible de combustibles y productos químicos. En este sentido, los días 13 a 15 del próximo mes de mayo tendrá lugar en Córdoba un Congreso al que asistirán 120 científicos de más de 20 países disintos, y en el que se tratarán temas relacionados con la valorización de la biomasa. En este contexto, nos plantearemos una nueva línea sobre aprovechamiento de residuos agrícolas del olivar.

AGRADECIMIENTOS:
Los autores agradecen la financiación por parte de la Junta de Andalucía (Proyecto FQM-3931)

• **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA DE AUTORES:**
La información bibliográfica solicitada puede ser solicitada en alimentacion@chi.es

Publicación 3.

New insights into evaluation of regression models through a decomposition of the prediction errors: application to near-infrared spectral data.

M.I. Sánchez-Rodríguez, E. Sánchez-López, J.M. Caridad, A. Marinas, J.M. Marinas, F.J. Urbano.

**Statistics and Operations Research Transactions, SORT 37 (1)
January-June 2013, 57-78.**

New insights into evaluation of regression models through a decomposition of the prediction errors: application to near-infrared spectral data

María Isabel Sánchez-Rodríguez^{1,*}, Elena Sánchez-López², José M^a Caridad¹, Alberto Marinas², Jose M^a Marinas² and Francisco José Urbano²

Abstract

This paper analyzes the performance of linear regression models taking into account usual criteria such as the number of principal components or latent factors, the goodness of fit or the predictive capability. Other comparison criteria, more common in an economic context, are also considered: the degree of multicollinearity and a decomposition of the mean squared error of the prediction which determines the nature, systematic or random, of the prediction errors. The applications use real data of extra-virgin oil obtained by near-infrared spectroscopy. The high dimensionality of the data is reduced by applying principal component analysis and partial least squares analysis. A possible improvement of these methods by using cluster analysis or the information of the relative maxima of the spectrum is investigated. Finally, obtained results are generalized via cross-validation and bootstrapping.

MSC: 62H25, 62J05, 62Q99.

Keywords: Principal components, partial least squares, multivariate calibration, near-infrared spectroscopy.

1. Introduction

Principal component analysis (PCA) and *partial least squares (PLS)* are widely used in linear modelling when the number of explanatory variables greatly exceeds the number of observations. PCA and PLS calculate, from the explanatory variables, a reduced

* Corresponding author e-mail: td1sarom@uco.es

¹ Dep. Estadística, Econometría, I.O., Org. Empresas y Ec. Aplicada. Avda. Puerta Nueva, s/n. 14071. University of Córdoba. Córdoba. Spain.

² Dep. Química Orgánica. Campus de Excelencia Agroalimentario ceiA3. Edificio C-3 (Marie Curie-Anexo). Campus de Rabanales. 14014. University of Córdoba. Córdoba. Spain.

Received: April 2012

Accepted: October 2012

number of components or latent factors orthogonal among themselves. These components or factors are obtained as linear combinations of the explanatory variables, for PCA explaining the variability among these variables and, for PLS maximizing the covariance between each explanatory variable and the response one. Both methodologies reduce the dimensionality of the space of explanatory variables as the information provided by these variables is summarized in only a few ones.

PCA and PLS have been used in the last decades in some chemometric areas such as, for example, in pattern recognition (in this context, PCA or PLS linear discriminant analyses establish classification models based on experimental data in order to assign unknown samples to a sample class) and in multivariate calibration, in which PCA or PLS regression models predict a numeric variable as a function of several explanatory ones. Although papers comparing the goodness between PCA and PLS are well-known, most of them even considering PLS preferable to PCA for both regression and discrimination (see, for example, Frank and Friedman (1993) or Barker and Rayens (2003)), the fact is that PCA (besides PLS) is still widely used nowadays in chemometrics. Papers such as Gurdeniz and Ozen (2009), López-Negrete de la Fuente, García-Muñoz and Blegler (2010), Mevik and Cederkvist (2004), Nelson, MacGregor and Taylor (2006) and Yamamoto et al. (2009) can be cited as examples of using PCA in discrimination and calibration. For this reason, this paper revisits the comparison between PCA and PLS regressions in new terms. Firstly, the possible improvement of the regression models incorporating causal additional information of data is analyzed. Secondly, a proposed decomposition of the prediction errors makes it possible to determine the nature of these errors and evaluate their predictive capacity.

In this paper, the described methodology is applied to data obtained by near-infrared (NIR) spectroscopy. The NIR methods are used in food chemistry providing fast, reliable and cost-effective analytical procedures which, contrary to some others – such as gas chromatography – require no or little sample manipulation. Even though the data acquisition process is relatively easy for all spectral techniques, interpretation of spectra can be difficult. Separation techniques, such as gas chromatography, lead to discrete information including several usually well-defined, separated peaks from which, on proper integration, the content of various chemical components in the sample can be determined. On the contrary, spectroscopy generates continuous information, rich in both isolated and overlapping bands attributed to vibration of chemical bonds in molecules, which leads to the availability of multivariate data matrices. In this context, the use of mathematical and statistical procedures allows us to extract the maximum useful information from data (Berrueta, Alonso-Salces and Héberger, 2007).

There are many chemometric papers establishing comparison criteria of models. Thus, for example, Gowen et al. (2010) or Li, Morris and Martin (2002) propose some measures to determine the optimal number of latent factors in PLS regression models; Anderson (2009) compares diverse models of PLS regression as a function of their stability; Andersen and Bro (2010) or Reinaldo, Martins and Ferreira (2008) propose several selection criteria for variables in multiple calibration models; and Mevik and

Cerderkvist (2004) provide estimators of the mean squared error of prediction (MSEP) in PCA and PLS regression models. The aim of this paper is to compare PCA and PLS regression models on the basis of some criteria such as the number of latent factors or components, the goodness of fit and the predictive capability. However, this study goes a step further, incorporating an approach usually associated with an economic context. The degree of multicollinearity (absent when the regressors of the model are uncorrelated among themselves) is considered. Moreover, a decomposition of MSEP is proposed in order to point out the nature, systematic or random, of the prediction errors. As a final conclusion, the development of the study highlights the potential of the PLS regression.

There are several examples in the literature on the application of PCA and PLS regression models to near-infrared spectral data from oils and fats. For instance, Dupuy et al. (1996), Gurdeniz and Ozen (2009), Kasemsumran et al. (2005) and Öztürk, Yalçın and Özdemir (2010) use these multivariate calibration models to predict the content of some olive oil compounds in order to detect possible adulteration with some other vegetable oil. In the present study, the application is carried out by using NIR spectral data of extra-virgin olive oil and estimates the capability of the models to predict the oleic acid content. However, our approach could be used to estimate some other chemicals or features of importance in food chemistry from spectral data (see Mevik and Cederkvist (2004)). Firstly, the regression models are fitted by applying PCA and PLS from all the variables associated to different wavelengths of the spectrum (considering the matrix of data as a black box). Later on, models incorporating information provided by the relative maxima of the curve are estimated, because the principal components and the factors are obtained, in an independent manner, in each spectral peak. Then, PCA and PLS regressions are applied in combination with cluster analysis, a multivariate statistical technique that uses a measure of distance or similarity to classify a set of variables or cases in clusters of variables or cases, respectively, similar among themselves; in this case, components and factors are obtained independently in each cluster of wavelengths. The above-mentioned criteria are calculated for each model in order to evaluate their performance. For models in which PCA or PLS are carried out in an independent manner in different parts of the spectrum and so the resulting components or factors are not orthogonal among themselves, the degree of multicollinearity is also considered. Finally, techniques of cross-validation and bootstrapping are incorporated to extend the previous results to more general applications.

2. Review of selection criteria in regression models

2.1. Common comparison criteria

- a) *Goodness of fit.* Let s_Y^2 and $s_{\hat{Y}}^2$ be the respective variances of the observations, y_1, y_2, \dots, y_n , of the dependent variable Y , and the corresponding predictions,

$\hat{y}_1, \hat{y}_2, \dots, \hat{y}_n$, in a regression model. The coefficient of determination, $R^2 = s_{\hat{y}}^2 / s_y^2$, ranges in the interval $[0, 1]$ by definition and, expressed as a %, indicates the percentage of variability of the dependent variable explained by the regression model. Obviously, a model is better as the coefficient of determination approaches 1. The adjusted coefficient of determination, \bar{R}^2 , is calculated from R^2 , taking into account the number of observations and the number of the regressors in the regression, in such a way that the goodness of fit is not overestimated.

The mean squared error of calibration, $MSEC = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 / n$, takes values nearer to 0 for a good fit, but it is non-dimensionless, that is, it depends on the units of measure of the variable.

There are other measures of the goodness of fit, that are not contemplated in this study, based on the likelihood criterion (see Burnham and Anderson (2004)).

- b) **Predictive capability.** Given the predictions for the future t observations, $\hat{y}_{n+1}, \hat{y}_{n+2}, \dots, \hat{y}_{n+t}$, of a certain regression model, the mean squared error of the prediction, $MSEP = \sum_{j=1}^t (y_{n+j} - \hat{y}_{n+j})^2 / t$, evaluates the predictive capability of a regression model. The predictive capability of a model is obviously better as MSEP approaches 0, taking into account that it also depends on the measurement units.

As is indicated by Berrueta et al. (2007), the ideal situation is when there are enough data available to create separate test set completely independent from the model building process (this validation procedure is known as external validation). When an independent test set is not available (e.g., because cost or time constraints make it difficult to increase the sample size), MSEP has to be estimated from the learning data, that is, the data used to train the regression. In this context, Mevik and Cederkvist (2004) present several estimators for MSEP, based on cross-validation or bootstrapping: Let $\mathbf{X} = [X_1 | X_2 | \dots | X_p]$ be the matrix containing the explanatory variables in a regression model and let Y be the dependent variable. For a set of n observations, it is assumed that $L = \{(\mathbf{x}_i, y_i) : i = 1, \dots, n_L\}$ is a learning data set (of n_L observations) and $T = \{(\mathbf{x}_{n_L+i}, y_{n_L+i}) : i = 1, \dots, n_T\}$ is a test data set (of size n_T). Besides, f_L is a predictor trained on L . When L is divided randomly into K segments, L_1, L_2, \dots, L_K , of roughly equal size (n_1, n_2, \dots, n_K), f_k is a predictor trained on $L \setminus L_k$. Finally, R bootstrap samples are drawn in L , $L_1^*, L_2^*, \dots, L_R^*$, and f_r^* is a predictor trained on L_r^* . In the described context, Mevik and Cederkvist (2004) present the MSEP estimators shown in Table 1.

- c) **Number of regressors.** Attending to the parsimony principle, if some regression models present similar characteristics in terms of goodness of fit, predictive capacity and multicollinearity, the simplest among them, i.e. the one with the smallest number of regressors, is considered the best.

Table 1: MSEP estimators adopted from Mevik and Cederkvist (2004).

MSEP Estimator	Definition
Test set estimate	$MSEP_{\text{test}} = \frac{1}{n_T} \sum_{i=1}^{n_T} (f_L(\mathbf{x}_{n_L+i}) - y_{n_L+i})^2 (= \text{MSEP})$
Apparent MSEP	$MSEP_{\text{app}} = \frac{1}{n_L} \sum_{i=1}^{n_L} (f_L(\mathbf{x}_i) - y_i)^2 (= \text{MSEC})$
Cross-validation	$MSEP_{\text{cv},K} = \frac{1}{n_L} \sum_{k=1}^K \sum_{i \in L_k} (f_k(\mathbf{x}_i) - y_i)^2$
Adjusted cross-validation	<p>$MSEP_{\text{adj},\text{cv},K} = MSEP_{\text{cv},K} + MSEP_{\text{adj}}$, where</p> $MSEP_{\text{adj}} = MSEP_{\text{app}} - \frac{1}{n_L} \sum_{k=1}^K \frac{n_k}{n_L} \sum_{i \notin L_k} (f_k(\mathbf{x}_i) - y_i)^2$
Naive bootstrap estimate	$MSEP_{\text{naive}} = \frac{1}{R} \sum_{r=1}^R \frac{1}{n_L} \sum_{i=1}^{n_L} (f_r^*(\mathbf{x}_i) - y_i)^2$
Ordinary bootstrap estimate	<p>$MSEP_{\text{boot}} = MSEP_{\text{app}} + \text{Bias}_{\text{app}}$, where</p> $\text{Bias}_{\text{app}} = \frac{1}{R} \sum_{r=1}^R \left(\frac{1}{n_L} \sum_{i=1}^{n_L} (f_r^*(\mathbf{x}_i) - y_i)^2 - \frac{1}{n_L} \sum_{i=1}^{n_L} (f_r^*(\mathbf{x}_i^r) - y_i^r)^2 \right),$ <p>where (\mathbf{x}_i^r, y_i^r) is the ith observation of the rth bootstrap sample</p>
Bootstrap smoothed cross-validation	$MSEP_{\text{BCV}} = \frac{1}{n_L} \sum_{i=1}^{n_L} \frac{1}{R_{-i}} \sum_{r: i \notin L_r^*} (f_r^*(\mathbf{x}_i) - y_i)^2,$ <p>where R_{-i} is the number of bootstrap samples excluding observation i</p>
The 0.632 estimate	<p>$MSEP_{0.632} = 0.632 \cdot MSEP_{\text{BCV}} + (1 - 0.632) \cdot MSEP_{\text{app}}$,</p> <p>where $0.632 \approx 1 - e^{-1}$ is approximately the average fraction of distinct observations in each bootstrap data set</p>

In PCA, the Kaiser criterion is the default in SPSS and most statistical software (but many authors do not recommend to use it as the only cut-off criterion as it tends to extract too many factors): Let $X_1^*, X_2^*, \dots, X_p^*$ be the standardized variables of the explanatory variables, X_1, X_2, \dots, X_p . When a random sample of dimension n is considered, $\mathbf{X}^* = [X_1^* | X_2^* | \dots | X_p^*]$ is a matrix of dimension $n \times p$. Then, $\mathbf{X}^{*\top} \mathbf{X}^*$ is a square $p \times p$ matrix and has p eigenvalues, $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p$. The eigenvalue λ_k represents the variance of the k -th principal component (or factor), $k = 1, \dots, p$. The Kaiser criterion suggests that those factors with eigenvalues equal or higher than 1

should be retained (taking into account that the variables are standardized and so the average of the eigenvalues is precisely 1).

In PLS analysis, the criterion of the first increase of the mean squared error of prediction is considered: the number of latent factors taken into account is $h^* = \min\{h > 1 : MSEP(h+1) - MSEP(h) > 0\}$, where $MSEP(h)$ the mean squared error of prediction of the regression model with h factors.

Gowen et al. (2010) show that the over-fitting in a regression model entails some additional problems, such as the introduction of noise in the regression coefficients. More specifically, their paper presents some measures for preventing the over-fitting in PLS calibration models of NIR spectroscopy data, investigating the use of both model bias and variance simultaneously in selecting the number of latent factors to include in the model. Initially, the authors consider the Durbin-Watson statistic:

$$DW = \frac{\sum_{i=1}^p (b_i - b_{i-1})^2}{\sum_{i=0}^p b_i^2},$$

being p the number of the regressors and b_0, b_1, \dots, b_p the coefficients of the multiple regression model. The named regression vector measure, RVM, is calculated by rescaling DW from 0 to 1. Then, a bias measure, BM, is obtained once the root of the mean squared error of calibration, RMSEC, is rescaled from 0 to 1. Gowen et al. (2010) propose to obtain the measures RVM_j and BM_j for models with j latent factors or components, varying j . Finally, the optimal number of latent factor to consider in a PLS regression model is j^* if the minimum of the sum $RVM_j + BM_j$ is obtained for $j = j^*$.

2.2. Other comparison criteria

In this section, other comparison criteria, more frequent in economics research, are proposed. Thus, for example, the decomposition of MSEP provided in d) below is developed in EViews, a program of econometric analysis. Similarly, Essi, Chukuigwe and Ojekudo (2011), Greenberg and Parks (1997), Mynbaev (2011), Spanos and McGuirk (2002) and Yamagata (2006) deal with the multicollinearity under different hypotheses in an economic context. These new criteria establish additional arguments to the ones proposed in a)-c) and can assist in selecting the most adequate model.

- d) **Decomposition of MSEP.** In Section 2.1.b, MSEP has been established as a criterion for evaluating the predictive capability of a model which, in general terms, is better as MSEP approaches 0. But this issue can be dealt more in depth, trying to determine the causes of the prediction errors.

Around 1920, Fisher introduced analysis of variance (ANOVA), a collection of statistical procedures in which the observed variance in a particular variable is partitioned into components attributable to different sources of variation. Diverse authors, e.g. Climaco-Pinto et al. (2009), Mark (1986), Mark and Workman (1986), Zwanenburg et al. (2011) have used the ANOVA in a chemometric context. We use this technique to decompose MSEP into three components, with the aim of investigating if there is any systematic cause that produces the prediction errors or if they are randomly distributed.

Given the predictions for the future t observations, $\hat{y}_{n+1}, \hat{y}_{n+2}, \dots, \hat{y}_{n+t}$, of a certain regression model, \bar{y} and $\hat{\bar{y}}$ are the means of the observations and the predictions, respectively, s_Y and $s_{\hat{Y}}$ are the corresponding standard deviations and $s_{Y\hat{Y}}$ is the covariance. Then, the MSEP,

$$MSEP = \frac{1}{t} \sum_{j=1}^t (y_{n+j} - \hat{y}_{n+j})^2 = \frac{1}{t} \sum_{j=1}^t y_{n+j}^2 + \frac{1}{t} \sum_{j=1}^t \hat{y}_{n+j}^2 - \frac{2}{t} \sum_{j=1}^t y_{n+j} \hat{y}_{n+j},$$

can be decomposed, once the terms $(\bar{y} - \hat{\bar{y}})^2$ and $2s_{Y\hat{Y}}$ are added and subtracted, in the following way

$$MSEP = (\bar{y} - \hat{\bar{y}})^2 + (s_Y - s_{\hat{Y}})^2 + 2(s_Y s_{\hat{Y}} - s_{Y\hat{Y}}) = E_B + E_V + E_R,$$

or, equivalently, by the identity

$$1 = \frac{E_B}{MSEP} + \frac{E_V}{MSEP} + \frac{E_R}{MSEP} = U_B + U_V + U_R,$$

where U_B is the part of MSEP corresponding to the bias, representing systematic errors in the prediction; U_V indicates the difference between the variability of the real values and the variability of the observed ones; finally, U_R shows the random variability in the prediction errors.

The decomposition of MSEP evidences that the predictions are affected by systematic and random errors. Random errors are, in general, low in absolute value, resulting from the additive effect of many insignificant events (detected with difficulty) and so inherent to a process. This kind of error can only be reduced with the increasing of the sample size, and fluctuate around a constant value, being distributed as a *white noise*. However, systematic errors are usually associated with an identifiable cause, such as an interference in the observation process or a defect of calibration in the instrument of measurement. They usually originate in a great fluctuation in the evolution of a process and must be detected and eliminated (for

example, this is the objective of statistical quality control or the aim of papers such as Guldberg et al. (2005) or Vasquez and Whiting (2006)).

A model is obviously better as MSEP approaches 0 (taking into account that MSEP is not upperly bounded and depends on the unit of measurement). But, using the proposed decomposition, if MSEP shows a great percentage attributable to systematic errors, this aspect indicates that there is some detectable cause originating these deviations in the predictions. This cause must be detected in order to eliminate systematic errors. Thus, a great percentage of MSEP attributable to systematic prediction errors indicates that the fit model can be improved in some sense. Nevertheless, this improvement is difficult if the predictions generated by a model have a random nature.

However, the study of the statistical general linear model (in particular, the multivariate linear regression model) assumes the random nature of its perturbations (which must be, by hypotheses, centered, homoscedastic, uncorrelated and normally distributed random variables). And so the presence of systematic errors in the predictions (represented by a high U_B ratio) or the discrepancy between the variability of the real and the observed values (represented by a high U_V ratio) prevent the validation of the fitted model, since these facts point out the absence of the hypotheses of randomness and homoscedasticity.

Definitively, the ideal situation for evaluating the predictive capability of a model is presented when MSEP has a value nearer to 0 and besides $U_B = 0$, that is, systematic errors do not exist in the prediction; $U_V = 0$, which indicates that the variability of the real values is the same as that of the predictions; and $U_R = 1$, which corresponds to random prediction errors.

- e) **Possible existence of multicollinearity**¹. In the fit of a regression model, it is frequent the appearance of a certain linear relationship among the regressors, which can be even exact (for example, when the number of cases is lower than the number of explanatory variables). The presence of multicollinearity in the regression makes that the least squares estimators obtained are not, in general, very precise. Although these estimators are still linear, unbiased and efficient (Gauss-Markov theorem), the multicollinearity complicates the precise quantification of the effect of each regressor on the dependent variable, because the variances of the estimators are high.

1. In PCA and PLS regressions, the orthogonal character of the components or factors guarantees the absence of multicollinearity in the model. In this paper, multicollinearity is evaluated in models whose components or factors are obtained applying PCA or PLS to different parts of the spectrum, in an independent manner. Thus, these components or factors are uncorrelated only in the corresponding spectral part.

In a multiple linear regression model, the estimator of the variance of a certain coefficient, $\widehat{\beta}_j$, is given by the expression

$$\text{Var}(\widehat{\beta}_j) = \frac{\widehat{\sigma}^2}{p(1-R_j^2)s_j^2}, \quad j = 1, \dots, p,$$

where $\widehat{\sigma}^2$ is the estimation of the disturbance variance, assumed to be constant by the hypothesis of homoscedasticity; p is the number of explanatory variables in the model; R_j^2 is the coefficient of determination of the regression of the variable X_j on the rest of the explanatory variables; and s_j^2 is the observed variance of X_j .

The *variance inflation factor*, VIF, is defined as the ratio between the observed variance and the variance existing when X_j is uncorrelated to the rest of the regressors of the model (and, then, $R_j^2 = 0$). Some authors consider that there is a grave multicollinearity when $\text{VIF}(\widehat{\beta}_j) > 10$ for any $j = 1, \dots, p$, that is, when $R_j^2 > 0.90$. Some computational programs (SPSS, for example) define the term “tolerance” as $T_j = 1 - R_j^2$; in this case, a serious multicollinearity is identified when $T_j < 0.10$ for any $j = 1, \dots, p$.

Then, let $\mathbf{X}^*\mathbf{X}^*$ be the matrix defined in Section 2.1.c (\mathbf{X}^* contains the standardized observations). As indicated in that section, it is a square matrix of dimension p and, therefore, has p eigenvalues. In this case, its condition number, κ , is defined as the root of the ratio between the highest eigenvalue (λ_{max}) and the lowest one (λ_{min}). The condition number measures the sensitivity of the least-squares estimates to small changes in the data. The multicollinearity can be considered as serious if κ (which is not affected by the measurement units because it is calculated, as stated above, from standardized variables) ranges between 20 and 30; if κ is greater than 30, the multicollinearity is very serious.

3. Materials and methods

3.1. Acquisition of spectral data

This work is based on data obtained from olive oil from different olive varieties (mainly ‘Zaity’, ‘Arbequina’, ‘Frantoio’, ‘Picual’ and ‘Hojiblanca’) harvested in the 2005/06, 2006/07, 2007/08 and 2008/09 seasons. Samples correspond to Andalusian olive oils principally, though some others from Tarragona and Edleb (Syria) have also been included. There are 302 cases in total. Olive oil was either extracted by the producers through a two-phase centrifugation system or by the staff of the Agronomy Department of University of Córdoba via the Abencor System. This system reproduces the industrial

process on the laboratory scale and follows the same stages of grinding, beating, centrifugation and decantation.

¹H-NMR analyses were carried out at the NMR Service of the University of Sevilla on a Bruker Avance spectrometer (Kahlsruhe, Germany), by using a resonance frequency of 500.2MHz and a direct-detection 5mm QNP 1H/15N/13C/31P probe. Determination of oleic acid content was carried out following the method suggested by Guillén and Ruiz (2003). NIR spectra were obtained by the staff of the Organic Chemistry Department of the University of Córdoba within 15 days after reception of the samples, which were kept in the fridge so that properties were not modified (Baeten et al., 2003). The instrument employed for spectra collection was available at the Central Service of Analyses (SCAI) at the University of Córdoba. It consisted of a Spectrum One NTS FT-NIR spectrophotometer (Perkin Elmer LLC, Shelton, USA) equipped with an integrating sphere module. Samples were analyzed by transmittance by using a glass petri dish and a hexagonal reflector with a total transmittance pathlength of approximately 0.5 mm. A diffuse reflecting stainless steel surface placed at the bottom of the cup reflected the radiation back through the sample to the reflectance detector. The spectra were collected by using Spectrum Software 5.0.1 (Perkin Elmer LLC, Shelton, USA). The reflectance (log 1/R) spectra were collected with two different reflectors. Data correspond to the average of results with both reflectors, thus ruling out the influence of them on variability of the obtained results. Moreover, spectra were subsequently smoothed using the Savitzky-Golay technique (that performs a local polynomial least squares regression in order to reduce the random noise of the instrumental signal). Once pre-treated, NIR data of 1237 measurements for each case (representing energy absorbed by olive oil sample at 1237 different wavelengths, from 800.62 to 2499.64 nm) were supplied to the Department of Statistics (University of Córdoba) in order to be analyzed.

3.2. Calibration models

As stated above, the aim of this study is to compare PCA and PLS regression models following the criteria described in Section 2. In this application, the regression models predict the content in monounsaturated acids (fundamentally, oleic acid, fatty acid of the omega 9 series with beneficiary cardiovascular and hepatic effects) of extra-virgin olive oil by using NIR spectral data. For each statistical case, that is, for each oil sample $n = 302$, in total – the observations corresponding to $p = 1237$ wavelengths of the spectrum – varying from 800.62 to 2499.64 nm – are available. Therefore, a statistical approach considers a matrix of data, \mathbf{X} , of dimensions $n = 302 \times p = 1237$, whose rows are referred to the cases studied and the columns are associated to the different explanatory variables in the regression. The dependent variable, Y , is given by the content in oleic acid of olive oil, in percentage, observed by using proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR). The information provided by the potential explanatory variables (1237 in total, corresponding to the different wavelengths), will be summarized

in a reduced number of uncorrelated factors in order to avoid multicollinearity, due to the high dimensionality of the space of the explanatory variables. The factors are obtained by using the procedures described as follows:

Method 1. *Extraction of latent factors from the whole space of explanatory variables*

Firstly, a small number of latent factors or components are determined from the whole space of 1237 explanatory variables. The factors are obtained as linear combinations of the explanatory variables and summarize the information provided by these variables. The components are extracted by PCA and, later on, by using PLS. In PCA, the factors initially considered are associated to the eigenvalues of the correlation matrix of the explanatory variables greater than 1 (Kaiser criterion), resulting 6 components (as $\lambda_6=1.706$ and $\lambda_7=0.941$). In PLS analysis, the criterion of the first increase of MSEP (see Section 2.1.c) is considered; as shown in Table 2, $h^* = 9$ in this case. Then, the number of factors is increased to 15, number of components closer to the ones considered by next Methods 2 and 3. For subsequent comparisons, the results for 6, 9 and 15 latent factors in PCA and PLS are considered. The percentage of the explanatory variables explained, in each case, by the extracted factors is greater than 99%.

Table 2: *Optimal number of factors in PLS analysis.*

Nr. components	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$MSEP(h)$	20.68	20.14	13.87	9.22	8.41	6.49	2.07	1.42	0.79	0.89
$MSEP(h+1) - MSEP(h)$	-0.54	-6.27	-4.65	-0.81	-1.92	-4.42	-0.65	-0.63	0.10	

Table 3: *Optimal number of factors (according to criterion by Gowen et al. (2010)).*

Model	No. factors (j)	DW_j	RVM_j	$RMSEC_j$	BM_j	$RVM_j + BM_j$
1.1.1 (6 PCA)	6	1.004	0.326	3.673	1	1.326
1.1.2 (9 PCA)	9	1.001	0	3.323	0.806	0.806
1.1.3 (15 PCA)	15	1.010	1	1.868	0	1
2.1.1 (6 PLS)	6	1	1	2.363	1	2
2.1.2 (9 PLS)	9	0.999	0.568	1.252	0.329	0.897
2.1.3 (15 PLS)	15	0.998	0	0.707	0	0

Once the components summarizing the sample information have been obtained, PCA regression models (Models 1.1.1, 1.1.2 and 1.1.3 with 6, 9 and 15 factors, respectively) and PLS regression models (Models 2.1.1, 2.1.2 and 2.1.3 with 6, 9 and 15 factors, respectively) are proposed. These models consider the content in oleic acid by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy as explained variable (Y) and the previously obtained factors as regressors. The last column of Table 3 shows that, based on the criterion presented in Gowen et al.

(2010) (see the measures defined in Section 2.1.c), the optima models among PCA and PLS regression ones are those with 9 and 15 components, respectively.

Method 2. *Extraction of latent factors from the different spectral peaks*

NIR spectroscopy yields spectra presenting both isolated and overlapping bands assigned to vibrations of one or more chemical bonds in molecules. For this reason, the explanatory variables associated to wavelengths corresponding to NIR spectral peaks could contain valuable information to predict the content in oleic acid of olive oil. Thus, wavelength intervals associated to spectral peaks are determined (Figure 1 shows six regions corresponding to wavelengths 800.62-936.74 nm, 1142.99-1280.49 nm, 1349.24-1486.74 nm, 1658.62-1899.24 nm, 2105.49-2208.62 nm, 2242.99-2499.64 nm, approximately). Therefore, if \mathbf{X} is the matrix containing the 1237 explanatory variables, \mathbf{X} can be divided into six boxes, $\mathbf{X}_{(1)}^p, \mathbf{X}_{(2)}^p, \dots, \mathbf{X}_{(6)}^p$, each one containing the explanatory variables associated to the corresponding region and a seventh box, with residual character, $\mathbf{X}_{(r)}^p$, containing the remaining explanatory variables: $\mathbf{X} = [\mathbf{X}_{(1)}^p | \mathbf{X}_{(2)}^p | \dots | \mathbf{X}_{(6)}^p | \mathbf{X}_{(r)}^p]$.

Then, PC and PLS analyses are applied to each of the seven boxes previously considered, in an independent manner, with the aim of determining factors summarizing the information associated to each region of the spectrum (Table 4). Afterwards, a PCA regression model (Model 1.2, Peaks PCA) and a PLS regression model (Model 2.2, Peaks PLS) are proposed to predict the content in oleic acid of olive oil, Y , considering the above-mentioned factors as regressors. The regressors (principal components or factors) in these last models are not uncorrelated among themselves; they are only orthogonal for each of the defined boxes: $\mathbf{X}_{(1)}^p, \mathbf{X}_{(2)}^p, \dots, \mathbf{X}_{(6)}^p, \mathbf{X}_{(r)}^p$. This fact introduces any degree of multicollinearity in the models.

Method 3. *Extraction of latent factors from the different clusters of spectral wavelengths*

Cluster analysis is applied to determine ten groups of similar explanatory variables, in terms of the squared Euclidean distance, in order to predict the composition in oleic acid of the olive oil. Therefore, the matrix of the explanatory variables, \mathbf{X} , is expressed as $\mathbf{X} = [\mathbf{X}_{(1)}^c | \mathbf{X}_{(2)}^c | \dots | \mathbf{X}_{(10)}^c]$, where $\mathbf{X}_{(i)}^c$ contains the explanatory variables classified in the i -th cluster, $i = 1, \dots, n$, after the application of the procedure. The graphical and analytical results obtained, in this case, are shown in Figure 2 and Table 5, respectively.

As in Method 2, PCA and PLS are applied to summarize in a reduced number of components or factors the information of the explanatory variables associated to each cluster, in an independent manner (which also introduces a certain degree of multicollinearity among components or factors). Subsequently, a PCA regression model (Model 1.3, Clusters PCA) and a PLS regression model (Model 2.3, Clusters PLS) are proposed considering the estimated factors as explanatory variables and the content in oleic acid, as determined by $^1\text{H-NMR}$, as dependent variable.

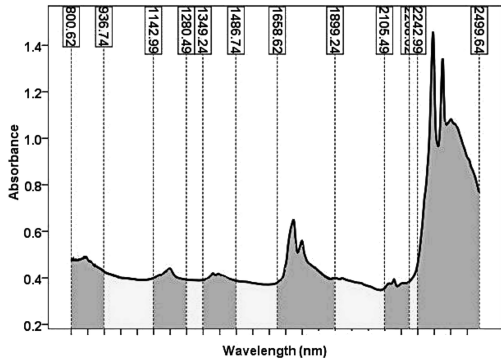


Figure 1: Wavelength intervals associated to spectral peaks.

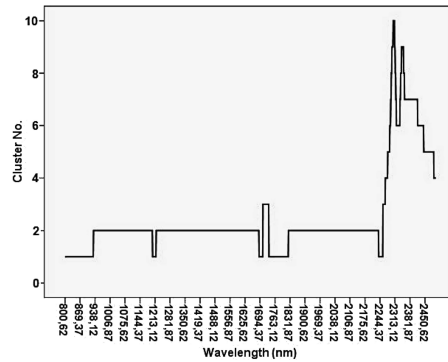


Figure 2: Clusters of wavelength.

Table 4: Factors in wavelength intervals associated to spectral peaks.

Wavelength interval	Nr. int. var.	X Box	% Y var. ^(a)	Nr. fac. ^(b)	% int. var. ^(c) (PCA)	% int. var. ^(c) (PLS)
800.62-936.74	100	$\mathbf{X}_{(1)}^P$	50.8	2	98.49	98.2
1142.99-1280.49	101	$\mathbf{X}_{(2)}^P$	52.1	1	99.30	99.2
1349.24-1486.74	101	$\mathbf{X}_{(3)}^P$	35.0	1	99.03	98.8
1658.62-1899.24	176	$\mathbf{X}_{(4)}^P$	91.4	3	99.61	99.4
2105.49-2208.62	76	$\mathbf{X}_{(5)}^P$	81.7	1	99.32	99.4
2242.99-2499.64	188	$\mathbf{X}_{(6)}^P$	95.3	2	99.32	97.9
Rest of wavelengths	495	$\mathbf{X}_{(e)}^P$	82.2	3	99.49	99.4

(a) Percentage of Y variance explained by $\mathbf{X}_{(i)}^P$

(b) Number of factors according to Kaiser criterion in PCA

(c) Percentage of $\mathbf{X}_{(i)}^P$ variance explained by interval factors

4. Results and discussions²

Taking into account the results shown in Table 6 and Table 7, the comparison among the values \bar{R}^2 , $MSEP$ and κ allows us to conclude that all the PLS regression models clearly provide better results in terms of goodness of fit, predictive capability and multicollinearity than the corresponding to PCA regressions with the same number of latent factors.

2. The chemometric applications can be developed using different software. Some packages of statistical or mathematical analysis have implemented the principal techniques usual in chemometrics, such as PASW Statistics – formerly SPSS, currently belonging to IBM, UNSCRAMBLER from CAMO, the PLS Toolbox of MatLab from MathWorks, or the free package “pls” in R.

Table 5: Factors in clusters of NIR spectrum.

Cluster	Nr.clus. var.	X Box	% Y var. ^(a)	Nr. fac. ^(b)	% clus. var. ^(c) (PCA)	% clus. var. ^(c) (PLS)
1	119	$\mathbf{X}_{(1)}^c$	93.4	4	99.02	98.2
2	191	$\mathbf{X}_{(2)}^c$	95.2	4	99.65	99.5
3	12	$\mathbf{X}_{(3)}^c$	86.0	1	98.33	98.0
4	13	$\mathbf{X}_{(4)}^c$	44.4	1	98.92	98.5
5	41	$\mathbf{X}_{(5)}^c$	88.3	1	99.42	99.3
6	35	$\mathbf{X}_{(6)}^c$	80.3	1	99.50	98.7
7	50	$\mathbf{X}_{(7)}^c$	85.4	1	99.81	99.8
8	10	$\mathbf{X}_{(8)}^c$	72.2	1	99.60	99.6
9	13	$\mathbf{X}_{(9)}^c$	49.4	1	99.59	99.6
10	5	$\mathbf{X}_{(10)}^c$	5.0	1	99.84	99.8

(a) Percentage of Y variance explained by $\mathbf{X}_{(i)}^c$

(b) Number of factors according to Kaiser criterion in PCA

(c) Percentage of $\mathbf{X}_{(i)}^c$ variance explained by cluster factors

Table 6: Comparison of models.

Model	Nr. fac.	R^2	\bar{R}^2	MSEP	κ
1.1.1 (6 PCA)	6 ^(a)	0.023	-0.004	19.094	— ^(c)
1.1.2 (9 PCA)	9 ^(b)	0.200	0.166	13.770	— ^(c)
1.1.3 (15 PCA)	15	0.748	0.729	1.839	— ^(c)
1.2 (Peaks PCA)	13	0.349	0.308	7.662	195.698
1.3 (Clusters PCA)	16	0.619	0.591	4.156	301.477
2.1.1 (6 PLS)	6 ^(a)	0.596	0.584	6.490	— ^(c)
2.1.2 (9 PLS)	9 ^(b)	0.887	0.882	0.792	— ^(c)
2.1.3 (15 PLS)	15	0.964	0.961	0.307	— ^(c)
2.2 (Peaks PLS)	13	0.692	0.672	2.557	183.837
2.3 (Clusters PLS)	16	0.859	0.847	0.382	370.059

(a) Number of factors according to Kaiser criterion in PCA

(b) Number of factors according to the first increase of the MSEP in PLS regression

(c) Orthogonal factors

Focusing on PCA regression, the model with 15 latent factors calculated from the explanatory variables directly, neither extracting the components in each interval of wavelengths associated to spectral peaks nor applying cluster analysis, is the one that provides the best results in fit and prediction. This model is named Model 1.1.3 (15 PCA) and has associated values $\bar{R}_{113}^2=0.729$ and $MSEP_{113}=1.840$. Besides, the orthogonal

Table 7: Decomposition of MSEP.

Model	\bar{y}	$s_{\bar{y}}$	$s_{y\bar{y}}$	MSEP	E_B	E_V	E_R	U_B	U_V	U_R
1.1.1 (6 PCA)	80.902	0.493	0.557	19.094	0.834	15.061	3.200	0.044	0.789	0.168
1.1.2 (9 PCA)	81.189	1.811	4.516	13.770	0.392	6.570	6.808	0.028	0.477	0.494
1.1.3 (15 PCA)	81.268	3.569	15.164	1.840	0.299	0.648	0.892	0.163	0.352	0.485
1.2 (Peaks PCA)	81.115	2.387	8.830	7.662	0.490	3.946	3.227	0.064	0.515	0.421
1.3 (Clusters PCA)	80.860	3.251	13.229	4.156	0.912	1.261	1.983	0.220	0.303	0.477
2.1.1 (6 PLS)	80.775	3.015	11.406	6.490	1.083	1.848	3.560	0.167	0.285	0.549
2.1.2 (9 PLS)	81.228	3.996	17.328	0.792	0.346	0.143	0.303	0.436	0.180	0.383
2.1.3 (15 PLS)	81.625	4.397	19.098	0.307	0.036	0.001	0.270	0.118	0.002	0.881
2.2 (Peaks PLS)	81.407	3.537	14.627	2.556	0.167	0.700	1.689	0.065	0.274	0.661
2.3 (Clusters PLS)	81.746	4.039	17.533	0.382	0.005	0.112	0.265	0.013	0.295	0.693

Note: $\bar{y} = 81.8153$, $s_y = 4.3740$

character of the components guarantees the absence of multicollinearity in the model. Finally, the decomposition of MSEP according to expression given in Section 2.2.d (see Table 7) points out that the last term, $U_{R,113}=0.485$, is the highest one, thus indicating that the prediction errors are random, ideal situation for the predictions of a model.

As regards PLS regression, the model in which the sample information is summarized directly from the explanatory variables in 15 PLS components (Model 2.1.3, 15 PLS) shows the best results: $\bar{R}_{213}^2=0.961$, $MSEP_{213} = 0.307$ and absence of multicollinearity because of the uncorrelated character of the latent factors. Likewise, this model has the highest value for the term U_R in the decomposition of MSEP ($U_{R,213}=0.881$ in Table 7); which again confirms the random nature of the prediction errors.

Taking into account the two previous conclusions, neither the distinction of the information associated to the spectral peaks nor the previous application of cluster analysis improve the results of the regression on the PC or PLS latent factors obtained directly (Method 1). In fact, the results are worse because of the appearance of multicollinearity, as the values of κ contained in Table 6 evidence.

Finally, in view of the above-mentioned considerations, Model 2.1.3 (15 PLS) is the best among all the fit models, presenting optimal characteristics regarding number of latent factors (Table 6 and Table 7), goodness of fit, predictive capability (and causes of prediction errors) and obviously absence of multicollinearity.

4.1. Cross-validation and bootstrapping

In this section, the attention is focused on the PLS regression model with 15 latent factor (Model 2.1.3, 15 PLS) as it has been considered the best among all the models studied above. This model will be compared to the PCA regression model with 15 components (Model 1.1.3, 15 PCA) in terms of cross-validation and bootstrapping with the aim of generalizing the previously obtained results.

Table 8: MSEP estimations.

MSEP Estimation	PCA regression (Model 1.1.3)	PLS regression (Model 2.1.3)
$MSEP_{\text{test}}$	1.838	0.308
$MSEP_{\text{app}}$	3.486	0.500
$MSEP_{\text{cv},K}$	20.119	2.360
$MSEP_{\text{adj.cv},K}$	22.539	5.609
$MSEP_{\text{naive}}$	3.672	0.492
$MSEP_{\text{boot}}$	4.224	0.569
$MSEP_{\text{BCV}}$	3.273	0.480
$MSEP_{0.632}$	3.352	0.487

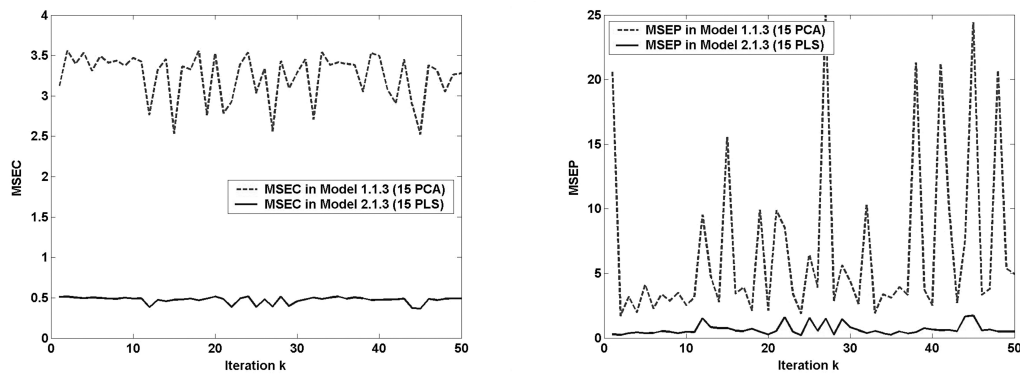


Figure 3: $MSEC_i$ and $MSEP_i$ for Model 1.1.3 (15 PCA) and Model 2.1.3 (15 PLS) $-i = 1, 2, \dots, 50-$.

Firstly, Table 8 shows the estimations of MSEP obtained, in this case, from the different estimators considered in Mevik and Cederkvist (2004) and presented in Table 1 (see Section 2.1.b). The corresponding algorithms divide the learning data set, L , into $K = 6$ segments, L_1, L_2, \dots, L_6 , of equal size ($n_k = 39$) for cross-validation; so, 6 regression models, f_1, f_2, \dots, f_6 , are fit (where each model f_k uses the observations not contained in L_k). Regarding the bootstrapping, $R = 50$ bootstrap samples (of size 25), $L_1^*, L_2^*, \dots, L_{50}^*$, are drawn from the learning data set, L . For $r = 1, 2, \dots, 50$, f_r^* is the regression model trained on L_r^* . Table 8 shows that all the estimations of MSEP obtained by using the different algorithms described are greater for Model 1.1.3 (15 PCA) than for Model 2.1.3 (15 PLS). Again, this fact points out that the predictive capability is higher for the PLS model than for the PCA one.

Afterwards, also in the context of bootstrapping, another algorithm is programmed to compare MSEP in both models. Now, the objective is to change, in each iteration i of the algorithm ($i = 1, 2, \dots, 50$), the learning data set, L_i , and the test data set, T_i .

Then, $MSEC_i (= MSEP_{app,i})$ and $MSEP_i (= MSEP_{test,i})$ are calculated and compared for each iteration i . Besides, $MSEP_i$ is decomposed (Section 2.2.d) in the components $U_{B,i}$, $U_{V,i}$ and $U_{R,i}$, in order to determine the nature of the prediction errors, investigating if they are randomly distributed or they respond to a systematical cause. In this context, Figure 3 shows that $MSEC_i$ and $MSEP_i$ –calculated for Model 1.1.3 (15 PCA) and Model 2.1.3 (15 PLS)– are clearly higher in PCA regression than in PLS regression, for each iteration $i = 1, 2, \dots, 50$. Furthermore, the variability of both goodness of fit and predictive capability is higher in PCA regression, appearing for PLS regression as a *white noise*. Regarding the decomposition of MSEP, Figures 4 and 5 depict that, although the component $U_{R,i}$ is the highest in both PCA and PLS models for $i = 1, 2, \dots, 50$, in PLS one $U_{R,i}$ represents a percentage of the variability of the prediction errors higher than in PCA one.

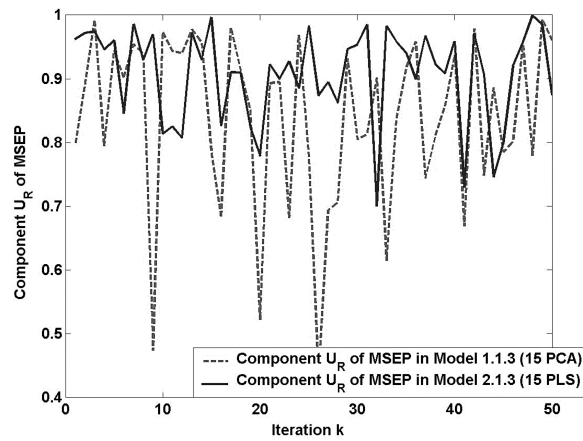


Figure 4: Component $U_{R,i}$ of $MSEP_i$, $-i = 1, 2, \dots, 50-$, for Model 1.1.3 (15 PCA) and Model 2.1.3 (15 PLS).

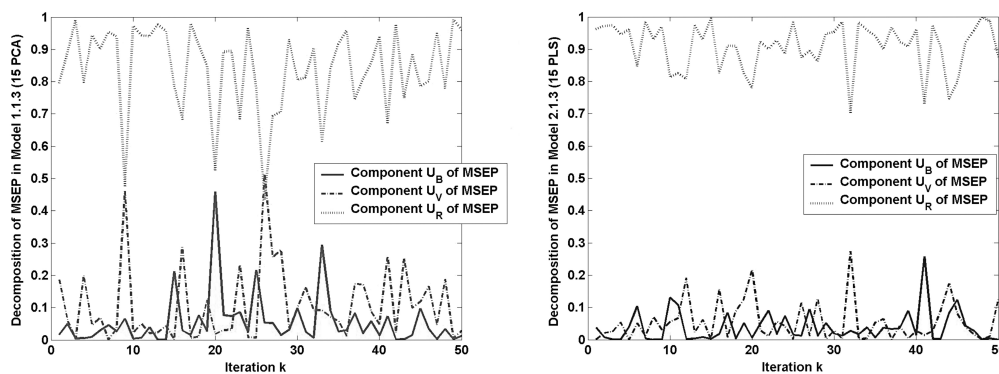


Figure 5: Decomposition of $MSEP_i$ $-i = 1, 2, \dots, 50-$, for Model 1.1.3 (15 PCA) and Model 2.1.3 (15 PLS).

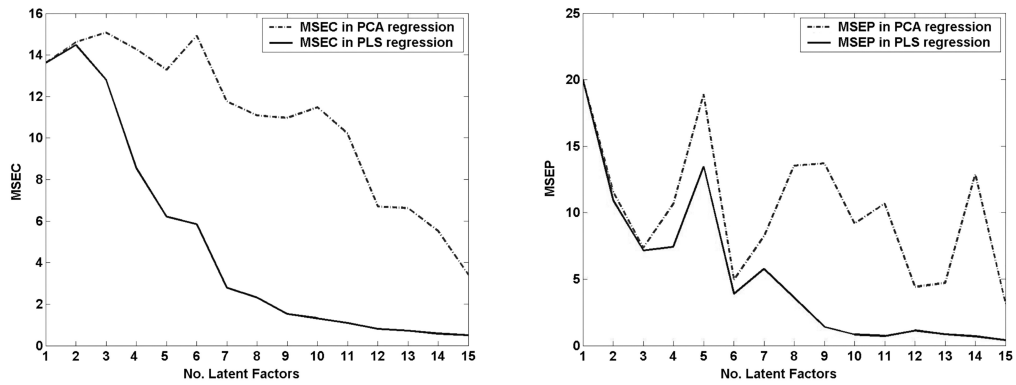


Figure 6: MSEC and MSEP for PCA and PLS regression as a function of the number of latent factors.

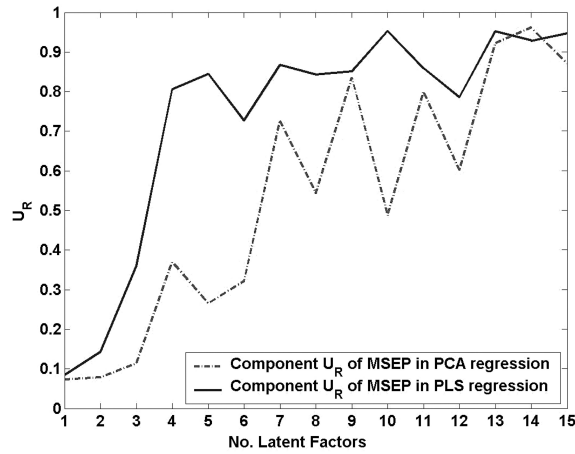


Figure 7: Component U_R of MSEP in PCA and PLS regression as a function of the number of latent factors.

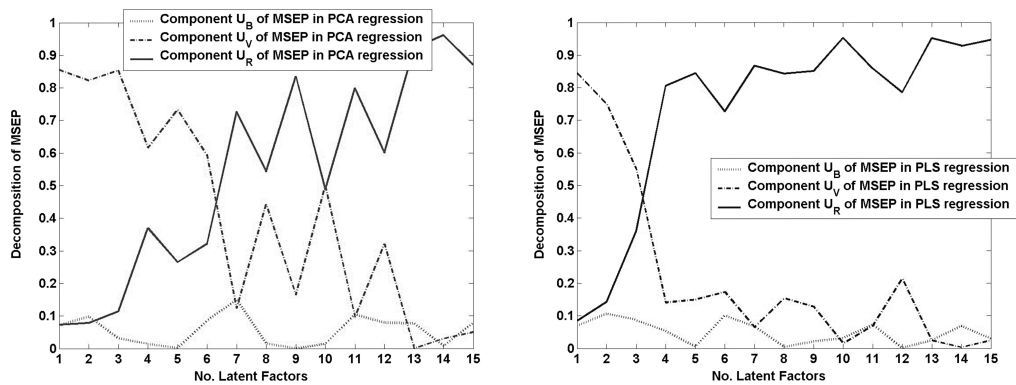


Figure 8: Decomposition of MSEP in PCA and PLS regression as a function of the number of latent factors.

Finally, the evolution of MSEC and MSEP (and their components U_B , U_V , U_R) is studied as a function of the number of latent factors or components (from 1 to 15) in PCA and PLS regression models, the learning and the test data set being changed for each number of latent factors. Figure 6 shows that obviously MSEC and MSEP tend to decrease with the inclusion of latent factors in the model. However, the decrease is more pronounced for PLS regression. Figure 7 illustrates that the component U_R , which is associated to the random variability in the prediction errors, increases with the number of latent factors. Nevertheless, U_R represents a percentage of MSEP higher in PLS regression than in PCA regression. Figure 8 shows that, on average, the component U_B of MSEP – which represents the systematic prediction errors – stay invariant with the inclusion of new latent factors in the regression models; U_V is higher when there are few components in the model and the random component U_R increases with the inclusion of latent factors in the model. The improvement is clearly higher for PLS regression than for PCA regression as evidenced by these figures.

5. Conclusions

This paper presents linear regression models explaining the oleic acid chemical composition of olive oil through factors extracted by principal components and partial least squares regression analyses from NIR spectral data. Relative maxima of the spectrum and cluster analysis are used to previously classify the explanatory variables. The different proposed models are compared on the basis of several criteria such as the number of latent factors or components, the goodness of fit and the mean squared error of prediction. The comparison among the models is improved by the consideration of some issues more commonly used in an economic context. More specifically, an exhaustive study about the multicollinearity is developed and a decomposition of MSEP is set up in order to analyze the nature of the prediction errors. In conclusion, the PLS regression model (of 15 latent factors) directly obtained from the data matrix (considered as a black box), applying neither additional information about the spectral peaks nor cluster analysis, is the best among all the considered models and exhibits optimal features on the basis of the diverse comparison criteria previously established. Besides, the decomposition of MSEP of this model points out the absence of systematic causes in the predictive errors, that are randomly distributed. Finally, cross-validation and bootstrapping allow us to confirm and generalize the previously obtained results, highlighting the potential of the PLS regression.

Acknowledgements

The authors thank the financial support by ‘Junta de Andalucía’ (Project P08-FQM-03931) and FEDER funds. Cooperativa Hojiblanca and Andalusian Protected Designations of

Origin (PDOs) are also gratefully acknowledged for providing the olive oil samples whereas the access to samples from germplasm bank of Córdoba is also thanked to IFAPA. Finally, the authors wish to thank Drs Rallo and Moalem for their kind scientific assistance.

References

- Andersen, C. M. and Bro, R. (2010). Variable selection in regression—a tutorial. *Journal of Chemometrics*, 24, 728–737.
- Anderson, M. (2009). A comparison of nine PLS1 algorithms. *Journal of Chemometrics*, bf 23, 518–529.
- Baeten, V., Aparicio, R., Marigheto, N. and Wilson, R. (2003). *Manual del aceite de oliva*. AMV ediciones, Mundi-Prensa.
- Barker, M. and Rayens, W. (2003). Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, 17, 166–173.
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M. and Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158, 196–214.
- Burnham, K. P. and Anderson, D. R. (2004). Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological Methods & Research*, 33, 261–304.
- Climaco-Pinto, R., Barros, A. S., Locquet, N., Schmidtke, L. and Rutledge, D. N. (2009). Improving the detection of significant factors using ANOVA-PCA by selective reduction of residual variability. *Analytica Chimica Acta*, 653, 131–142.
- Dupuy, N., Duponchel, L., Huvenne, J. P., Sombret, B. and Legrand, P. (1996). Classification of edible fats and oils by principal component analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, 57(2), 245–251.
- Essi, I. D., Chukuigwe, E. C. and Ojekudo, N. A. (2011). On multicollinearity in nonlinear econometric models with mis-specified error terms in large samples. *Journal of Economics and International Finance*, 3(2), 116–120.
- Frank, I. E. and Friedman, J. H. (1993). A statistical view of some chemometrics regression tools. *Technometrics*, 35(2), 109–135.
- Gowen, A. A., Downey, G., Esquerre, C. and O'Donnell, C. P. (2010). Preventing over-fitting in PLS calibration models of near-infrared (NIR) spectroscopy data using regression coefficients. *Journal of Chemometrics*, 25, 375–381.
- Greenberg, E. and Parks, R. P. (1997). A predictive approach to model selection and multicollinearity. *Journal of Applied Econometrics*, 12, 67–75.
- Guillén, M. D. and Ruiz, A. (2003). Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(11), 688–696.
- Guldberg, A., Kaas, E., Déqué, M., Yang, S. and Vester Thorsen, S. (2005). Reduction of systematic errors by empirical model correction: impact on seasonal prediction skill. *Tellus*, 57(A), 575–588.
- Gurdeniz, G. and Ozen, B. (2009). Detection of adulteration of extra-virgin oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. *Food Chemistry*, 116, 519–525.
- Kasemsumran, S., Kang, N., Christy, A. and Ozaki, Y. (2005). Partial least squares processing of near-infrared spectra for discrimination and quantification of adulterated olive oils. *Spectroscopy Letters*, 38(6), 839–851.
- Li, B., Morris, J. and Martin, E. B. (2002). Model selection for partial least squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 64, 79–89.

- López-Negrete de la Fuente, R., García-Muñoz, S. and Blegler, L. T. (2010). An efficient nonlinear programming strategy for PCA models with incomplete data sets. *Journal of Chemometrics*, 24, 301–311.
- Mark, H. (1986). Comparative study of calibration methods for near-infrared reflectance analysis using a nested experimental design. *Analytical Chemistry*, 58, 2814–2819.
- Mark, H. and Workman, J. (1986). Effect of repack on calibrations produced for near-infrared reflectance analysis. *Analytical Chemistry*, 58, 1454–1459.
- Mevik, B. H. and Cerderkvist, H. R. (2004). Mean squared error of prediction (MSEP) estimates for principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR). *Journal of Chemometrics*, 18(9), 422–429.
- Mynbaev, K. T. (2011). Regressions with asymptotically collinear regressors. *Econometrics Journal*, 14, 304–320.
- Nelson, P. R. C., MacGregor, J. F. and Taylor, P. A. (2006). The impact of missing measurements on PCA and PLS prediction and monitoring applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 80, 1–12.
- Öztürk, B., Yalçın, A. and Özdemir, D. (2010). Determination of olive oil adulteration with vegetable oils by near infrared spectroscopy coupled with multivariate calibration. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 18, 191–201.
- Reinaldo, F. T., Martins, J. P. A. and Ferreira, M. M. C. (2008). Sorting variables using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. *Journal of Chemometrics*, 23, 32–48.
- Spanos, A. and McGuirk, A. (2002). The problem of near-multicollinearity revisited: erratic vs systematic volatility. *Journal of Econometrics*, 108, 365–393.
- Vasquez, V. R. and Whiting, W. B. (2006). Accounting for both random errors and systematic errors in uncertainty propagation analysis of computer models involving experimental measurements with Monte Carlo methods. *Risk Analysis*, 25(6), 1669–1680.
- Yamagata, T. (2006). The small sample performance of the Wald test in the sample selection model under the multicollinearity problem. *Economics Letters*, 93, 75–81.
- Yamamoto, H., Yamaji, H., Abe, Y., Harada, K., Waluyo, D., Fukusaki, E., Kondo, A., Ohno, H. and Fukuda, H. (2009). Dimensionality reduction for metabolome data using PCA, PLS, OPLS, and RFDA with differential penalties to latent variables. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 98, 136–142.
- Zwanenburg, G., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Jansen, J. J. and Smilde, A. K. (2011). ANOVA-principal component analysis and ANOVA-simultaneous component analysis: a comparison. *Journal of Chemometrics*, 25(10), 561–567.

Publicación 4.

New approaches in the chemometric analysis of IR spectra of extra-virgin olive oils.

M.I. Sánchez-Rodríguez, E. Sánchez-López, A. Marinas, J.M.

Caridad, J.M. Marinas, F.J. Urbano.

**Statistics and Operations Research Transactions, SORT, en
prensa.**

New approaches in the chemometric analysis of IR spectra of extra-virgin olive oils

M.I. Sánchez-Rodríguez^{1}, E.M. Sánchez-López², A. Marinas²,
J.M. Caridad¹, F.J. Urbano², J.M. Marinas²*

¹ Dep. Estadística, Econometría, I.O., Org. Empresas y Ec. Aplicada. University of Córdoba

* Corresponding author e-mail: td1sarom@uco.es

² Dep. Química Orgánica. University of Córdoba

Abstract

The aim of this paper is to apply new chemometric approaches to obtain quantitative information from near and mid infrared spectra (NIR and MIR) of Andalusian extra-virgin olive oils, using gas chromatography (GC) as a classical reference analytical technique. Estimations of the content in saturated (SAFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids are given using partial least squares (PLS) regression from the NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices of data. The different estimations are evaluated in terms of goodness of fit (calibration) and prediction (validation), as a function of the number of PLS factors in the regression model and the used matrix of data. Besides, the nature, systematic or random, of the prediction errors is studied by a decomposition of their mean squared error. Finally, procedures of cross-validation are implemented in order to generalize the previous results.

Keywords: Extra-virgin olive oil, infrared spectroscopy, partial least squares regression, cross-validation

AMS: 62H25, 62J05, 62Q99

1. Introduction

The extra-virgin olive oil is an edible oil very estimated by its taste and benefits on health. Mediterranean countries (Spain, Italy, Greece, Turkey, Tunisia and Morocco) and Portugal cover the 90% of the world production, Spain and Italy being the major producers and consumers. In Spain, Andalusia produces the 80% of the national product. The composition of olive oil depends on the type and the distribution of the fatty acids present in the triglycerides and on the positions in which these fatty acids are esterified to hydroxyl groups in glycerol backbone. The principal fatty acids of vegetable oils are oleic, linoleic, linolenic, myristic, palmitic and stearic. The last three types are classified as saturated (SAFA), the oleic is monounsaturated (MUFA) and the linoleic and linolenic acids are polyunsaturated (PUFA).

Extra-virgin oil is by definition obtained only from the olive, using solely mechanical or other physical means, in conditions, particularly thermal conditions, which do not alter the oil in any way. It presents a high price of commercialization, which makes it susceptible to adulteration with other cheaper oils, such as hazelnut, sunflower, soybean, maize or refined olive oils (see, for example, Baeten et al. (2005), Gurdeniz and Ozen (2009) and Öztürk et al. (2010)), considerably modifying its quality indexes. This makes necessary to provide fast, reliable and cost-effective analytical procedures which require no or little sample manipulation. In this sense, for several years we have elaborated an extra-virgin olive oils database using diverse spectroscopic techniques such as near and mid infrared (NIR and MIR, respectively). IR techniques provide, in general lines, continue information (spectra) that is rich in both isolated and overlapping bands and not so clearly solved as in the case of gas chromatography (GC). Nevertheless, the application of the Multivariate Statistics to the above-mentioned spectra allows to obtain quantitative information (as the content of oil in diverse compounds) or qualitative (as the geographical origin or the protected designation of origin, PDO) about the olive oil.

There are in the literature diverse examples of application of NIR, MIR or concatenated NIR-MIR spectroscopic techniques to the quantitative and qualitative analysis of olive oils. Thus, for example, Bertran et al. (2000) and Galtier et al. (2007, 2011) classify several olive oils according to different geographical zones and determine the composition in fatty acids and triacylglycerols by using NIR spectra. Baeten et al. (2005) and Gurdeniz and Ozen (2009) study the possible adulteration of olive oils with lower quality oils (such as hazelnut, sunflower or maize) by MIR spectroscopy. Dupuy et al. (2010a, 2010b) and Sinelli et al. (2008) use NIR, MIR and concatenated NIR-MIR spectra to develop quantitative and qualitative studies of olive oil. Sinelli et al. (2010) apply NIR and MIR spectroscopies as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity. Casale et al. (2012) use NIR and MIR spectroscopical data, individually and jointly, to characterize olive oils from an Italian protected designation of origin.

Some of these works determine, using correlation, specially significant IR spectral bands to fit regression models to predict some components of olive oil (see Guillén and Cabo (1997) or Zhang et al. (2012)). Other works, such as Maggio et al. (2011), use partial least squares (PLS) regression to avoid the presence of multicollinearity in the model. The PLS regression summarizes the information of a spectral band in some components or latent factors being orthogonal among them and so avoiding multicollinearity, incompatible with the hypothesis of uncorrelation in the general linear model. Other authors, such as Casale et al. (2012) or Dupuy et al. (2010a, 2010b), extract the PLS components from the complete NIR, MIR or concatenated NIR-MIR spectra, not from the previously selected spectral bands.

The aims of this paper are to revisit the procedures used in the literature to obtain quantitative information of olive oil from the near and mid zones of the infrared spectra and propose new approaches. The goal is to determine the profile in SAFA, MUFA and PUFA fatty acids of diverse extra-virgin olive oils by using the information provided by the NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices of data, using the values obtained from GC as a reference. The estimations are provided by partial least squares regression models and are compared in terms of goodness of fit (calibration) and prediction (validation), that is, measuring errors that correspond to data used or not used to train the regression model. In addition, a decomposition of the mean squared error of prediction is provided to evaluate the character, systematic or random, of prediction errors (see Sánchez-Rodríguez et al. (2013)). The obtained results are generalized using procedures of cross-validation, based on the design of repetitive algorithms that, for each iteration, modify the partition of the available data set in subsets of calibration and validation. Finally, three-dimensional scatterplots give a global vision for the three types of fatty acids and matrices of data, simultaneously.

The computer programs commonly used in Chemometrics have internally implemented a stopping criterion to determine the number of PLS latent factors to retain in the regression model. But, in this work, the PLS factors are progressively introduced in the model, with the aim of determining the evolution of calibration and validation errors as a function of the number of factors and the estimated fatty acid type. The chemometric software has also cross-validation procedures implemented that change, at each iteration, the learning and the test data sets, and provide a global mean of the calibration and validation errors. On the contrary, in the present work, the procedures of cross-validation have been programmed and show the results corresponding to each iteration. Therefore, the evolution and the variability of the fit and prediction errors can be studied for the successive iterations.

2. Acquisition of data

The studied samples include 128 Andalusian extra-virgin olive oils, collected for four consecutive seasons (from 2007 to 2011) with a ripeness index of 3. The varieties studied are, mainly, 'Arbequina', 'Hojiblanca', 'Picual', 'Lechín', 'Manzanilla', 'Picudo' and 'Royal'. Olive oil was extracted by the producers through a two-phase centrifugation system. The data for the subsequent statistical treatment have been provided by the following analytical chemical procedures:

- **Gas chromatography.** Classical separation technique that leads to discrete information including several usually well-defined, separated peaks from which, on proper integration, the content of various chemical components (for example, SAFA, MUFA and PUFA fatty acids) can be determined. It will be considered as reference technique in the next studies.
- **Spectroscopical techniques.** Infrared techniques, such as NIR and MIR, generate continuous information, rich in both isolated and overlapping bands attributed to vibration of chemical bonds in different molecules. The use of mathematical and statistical procedures allows us to extract the maximum useful information from data (Berrueta et al. (2007)).

2.1. Gas Chromatography (GC)

The determinations of fatty acid composition by GC-FID, according to the official methods for olive and pomace oil control in the European Union, EU (2011) and the International Olive Council, COI (2001a, 2001b), were performed by the staff of Organic Chemistry of University of Córdoba, using an Agilent 7890A gas chromatograph with a capillary column (SGE FORTE BPX-70 de $50\text{m} \times 220\mu\text{m} \times 0.25\mu\text{m}$). The conditions of analysis were as follows: 250°C of injector temperature, $2\mu\text{L}$ of injection volume, 260°C of detector temperature. The oven temperature was programmed to remain at 180°C for 15 min and then raised to 240°C at a rate of $4^\circ\text{C}/\text{min}$ and maintained at this temperature for 5 min.

The triacylglycerol samples (olive oil samples), were initially submitted to a cold transesterification procedure to convert the triacylglycerol into fatty acid methyl esters. This method is indicated for edible oils with acidity index lower than 3.3° . In this process, 0.1 g of olive oil are transferred into a 5 mL volumetric flask. Next, 2 mL n-heptane and 0.2 mL of a 2N KOH solution in methanol were added and reaction mixture was vigorously stirred. Finally, the methyl esters were extracted and subject to GC analyses.

2.2. NIR and MIR spectra

NIR and MIR spectra were obtained by the staff of the Organic Chemistry Department of the University of Córdoba within 15 days after reception of the samples which were kept in the fridge so that properties were not modified [Baeten et al. (2003)]. The instruments employed for spectra collection were available at the Central Service of Analyses (SCAI) at the University of Córdoba.

As for NIR instrument, it consisted in a Spectrum One NTS FT-NIR spectrophotometer (Perkin Elmer LLC, Shelton, USA) equipped with an integrating sphere module. Samples were analyzed by transmittance by using a glass petri dish and a hexagonal reflector with a total transmittance pathlength of approximately 0.5 mm. A diffuse reflecting stainless steel surface placed at the bottom of the cup reflected the radiation back through the sample to the reflectance detector. The spectra were collected by using Spectrum Software 5.0.1 (Perkin Elmer LLC, Shelton, USA). The reflectance ($\log 1/R$) spectra were collected with two different reflectors. Data correspond to the average of results with both reflectors, thus ruling out the influence of them on variability of the obtained results. Moreover, spectra were subsequently smoothed using the Savitzky-Golay technique (that performs a local polynomial least squares regression in order to reduce the random noise of the instrumental signal). Once pre-treated, NIR data

of 1237 measurements for each case (representing energy absorbed by olive oil sample at 1237 different wavelengths, from 800.62 to 2499.64 nm) were supplied to the Department of Statistics (University of Córdoba) in order to be analyzed.

Regarding MIR spectra of olive oil samples, they contain both well-resolved ($3100\text{-}1721\text{cm}^{-1}$) and overlapping peaks ($1500\text{-}700\text{cm}^{-1}$). Spectra were registered at room temperature in the $600\text{ to }4000\text{ cm}^{-1}$ range on a Tensor 27 FTIR Spectrometer (Bruker Optics, Milano, Italy) coupled to an ATR (Attenuated total reflectance) device consisting in several reflection crystals (ZnSe). Software used was OPUS r. 5,0 (Bruker Optics), the resolution 2 cm^{-1} and 50 scan per sample. The number of measurements for each case was 1843 which were supplied to the Department of Statistics (University of Córdoba) for analysis.

Figure 1: NIR spectrum of an extra-virgin olive oil

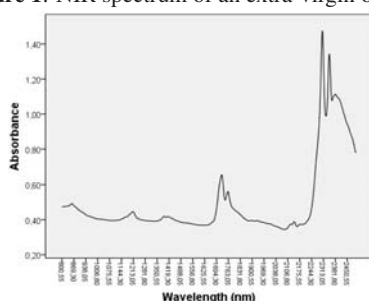
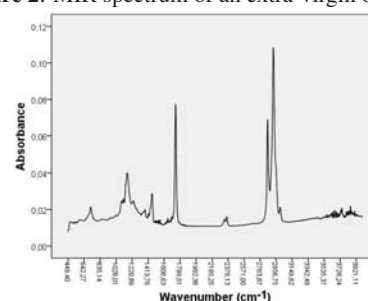


Figure 2: MIR spectrum of an extra-virgin olive oil



3. Multivariate data analysis

3.1. Selection criteria of regression models

The purpose of this work is to use statistical regression models to determine the profile in fatty acids SAFA, MUFA and PUFA of extra-virgin olive oils obtained by gas chromatography (classical technique used as reference) from the information provided by the IR spectroscopy technique. The regression models are evaluated in terms of goodness of fit and predictive capability, using the following measures.

Let y_1, y_2, \dots, y_n be the observations of a dependent variable, Y , and the corresponding predictions, $\hat{y}_1, \hat{y}_2, \dots, \hat{y}_n$, of a regression model. The *mean squared error of calibration*, $\text{MSEC} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 / n$, takes values nearer to 0 for a good fit (calibration). But MSEC is non-dimensionless, that is, it depends on the units of measure of the variable. Then MSEC is not upperly bounded and so it is useful in comparisons of models with variables measured in the same units and not as an absolute goodness of fit measure.

Given the predictions for the future t observations, $\hat{y}_{n+1}, \hat{y}_{n+2}, \dots, \hat{y}_{n+t}$, of a certain regression model, the *mean squared error of the prediction*, $\text{MSEP} = \sum_{j=1}^t (y_{n+j} - \hat{y}_{n+j})^2 / t$, evaluates the predictive capability (validation) of a regression model. The predictive capability of a model is obviously better as MSEP approaches 0, taking into account that, as MSEC, it is not upperly bounded as it depends on the measurement units.

As indicated by Berrueta et al. (2007), the ideal situation in the evaluation of the predictive capability of a model is when there are enough data available to create separate test sets completely independent from the model building process (this validation procedure is known as *external validation*). When an independent test set is not available (e.g. because cost or time constraints make difficult to increase the sample size), MSEP has to be estimated from the data used to train the regression. For this reason, as validation set, part of the original data set, reserved in the obtaining of the regression model, is used

(then, the bias associated to the fact that the same data are used to the fit of the regression model and the evaluation of the predictions is avoided). The *cross-validation* procedures are designed to modify the selections repeatedly, using an algorithm that, for each iteration, changes the partition of the original data set into calibration and validation sets.

Besides, in line with the approach introduced by Fisher around 1920 relative to the *Analysis of Variance*, Sánchez-Rodríguez et al. (2013) described new insights into evaluation of regression models through a decomposition of MSEP to analyze more in depth the causes of the prediction errors. Let \bar{y} and $\widehat{\bar{y}}$ be the means of the t future observations and their predictions, s_Y and $s_{\widehat{Y}}$ are the corresponding standard deviations and $s_{Y\widehat{Y}}$ represents the covariance. Therefore, MSEP can be expressed as

$$\text{MSEP} = \frac{1}{t} \sum_{j=1}^t (y_{n+j} - \widehat{y}_{n+j})^2 = (\bar{y} - \widehat{\bar{y}})^2 + (s_Y - s_{\widehat{Y}})^2 + 2(s_Y s_{\widehat{Y}} - s_{Y\widehat{Y}}) = E_B + E_V + E_R,$$

or, equivalently, with the identity

$$1 = \frac{E_B}{\text{MSEP}} + \frac{E_V}{\text{MSEP}} + \frac{E_R}{\text{MSEP}} = U_B + U_V + U_R,$$

where U_B is the part of MSEP corresponding to the bias due to the systematic prediction errors; U_V indicates the difference between the variability of the real values and the variability of the predicted values; finally, U_R shows the random variability in the prediction errors.

A model is obviously better as MSEP approaches 0 (taking into account that MSEP is not upperly bounded and depends on the unit of measurement). But, using the proposed decomposition, if MSEP shows a great percentage attributable to systematic errors, this aspect indicates that there is some detectable cause originating these deviations in the predictions. This cause must be detected in order to eliminate systematic errors. Thus, a great percentage of MSEP attributable to systematic prediction errors indicates that the fit model can be improved in some sense. Nevertheless, this improvement is difficult if the predictions generated by a model have a random nature because random errors, with a white noise appearance, are usually inherent to a process.

Definitively, the ideal situation for evaluating the predictive capability of a model is presented when MSEP has a value as close as possible to 0 and besides $U_B = 0$, that is, systematic errors do not exist in the prediction; $U_V = 0$, which indicates that the variability of the real values is the same as that of the predictions; and $U_R = 1$, which corresponds to prediction errors with random nature.

3.2. New methodological approaches in the chemometric analysis of IR spectra

Now, the procedures used in the literature to extract information of olive oil from IR spectra (NIR, MIR and concatenated NIR-MIR) are revised. The different contributions to each technique are conveniently motivated and justified.

- 1. Extraction of the information from the complete IR spectra versus the analysis of some particular IR bands.** There are in the literature many references in which the analysis of IR spectra is made based on the detection of highly informative bands. One such example is the work by Guillén and Cabo (1997), who relate IR spectral bands of edible oils with some chemical functional groups. This approach is based on the *Lambert-Beer Law*, which states that the intensities of the spectral bands are proportional to the concentration of their respective functional groups. The

frequencies of some bands, fundamentally the ones associated to the so-called *fingerprint region*¹, are highly correlated to the composition of olive oil. Guillén and Cabo (1997) successfully obtained regression equations to predict the content in SAFA, MUFA and PUFA fatty acids of olive oil from the frequencies of some bands in the fingerprint region (see Table 1). A follow-up study (Guillén and Cabo (1998)) generalized the previous results by regression models that provide relationships between the composition in SAFA, MUFA and PUFA of edible oils and the ratio of absorbance of specific bands of the IR spectra, not necessarily associated to the fingerprint region. Besides, Guillén and Cabo (1999) used the previous regression equations to determine the composition of mixtures of olive oil and other low quality oils (such as sunflower or peanut), using gas chromatography values as references.

Table 1: Coefficients for IR equations, $Frequency = a + b\%M$ (%P o %S), and linear correlation coefficients^a (Guillén and Cabo (1997))

Percentage	<i>a</i>	<i>b</i> (10 ⁻²)	<i>r</i>
<i>M</i>	3010.40	-7.24	0.9853
<i>P</i>	3004.85	+6.10	0.9492
<i>M</i>	1394.90	+9.90	0.9910
<i>P</i>	1402.61	-8.43	0.9223
<i>M</i>	1100.46	-4.87	0.9908
<i>P</i>	1096.68	+4.43	0.9176
<i>S</i>	2926.04	-6.28	0.8504
<i>S</i>	2855.07	-6.59	0.9565
<i>S</i>	1122.65	-22.65	0.9510
<i>S</i>	724.30	-9.93	0.9924
<i>S</i>	1238.11	+2.33	0.8408
<i>S</i>	1160.20	24.44	0.9989

^a %M, %P and %S represents the percentage of MUFA, PUFA and SAFA, respectively.

There are other works which analyze IR spectra by determining relevant frequency bands. Vlachos et al. (2006) establish the relation between the frequency 3009 cm⁻¹ of the IR spectra and the percentage of adulteration of olive oil with low quality oils. Rohman and Man (2010) use PCA and PLS components extracted from the fingerprint region 1500-1000 cm⁻¹ (MIR spectra) to quantitatively and qualitatively analyze extra-virgin olive oils, to detect possible adulteration with palm oil. Nicoletta et al. (2010) select some regions from NIR and MIR spectra to classify, by discriminant analysis, diverse extra-virgin olive oils in base on their fruity attribute intensity. Zhang et al. (2012) divide the IR spectra in regions, attending to the absorbance peaks, to establish linear regression equations to detect possible adulteration of vegetables oils with used frying oils.

All the previously cited works determine, by using correlation, highly informative IR spectral regions to predict the composition of olive oil. In general, the determined zones are localized in the mid infrared spectral region (MIR), where the spectral fingerprint is localized.

Our previous study Sánchez-Rodríguez et al. (2013), from NIR spectral data, compares the estimation results obtained by extracting information from the whole spectra with those provided by some specific NIR bands (either determined by cluster analysis or associated to certain spectral peaks). The best calibration and validation results are obtained from the whole spectra. This is the reason

¹The region 1500-700 cm⁻¹ of the MIR spectra is named *fingerprint region* because this region is highly characteristic of a specific compound. Little changes in the molecular structure frequently cause significant changes in the absorption peaks of this region.

why the present work uses the whole NIR, MIR and concatenated NIR-MIR spectra to predict the content of olive oil in SAFA, MUFA and PUFA fatty acids. As subsequently shown, although in the analysis of spectral bands the most informative zones are localized in the MIR spectral region, the NIR spectra provides better estimations in certain situations when the whole spectral information is used.

- 2. PLS regression versus general linear regression or PCA regression.** The analysis of IR spectra from the detection of relevant wavelength bands to obtain quantitative information (such as the prediction of the content of olive oil in some specific compounds) is based on the matching of some wavelengths with high correlation with the response variable. Then linear regression equations are fit to predict the percentage of the compound as a function of the wavelengths (see, for example, Guillén and Cabo (1997), (1998), (1999), Vlachos et al. (2006), Rohman and Che Man (2010), Zhang et al. (2012)). The selection of a single wavelength could originate a waste of useful statistical information. But the selection of many wavelengths highly correlated with the dependent variable could cause the presence of multicollinearity among the explanatory variables, incompatible situation with the hypothesis of uncorrelation in the general linear model. This is why the use of principal component regression (PCA regression) or partial least squares regression (PLS regression) is more interesting. Both methodologies summarize the information of the whole IR spectrum in some latent factors or components, orthogonal among themselves, thus avoiding the possible multicollinearity in the model. These factors are obtained as linear combinations of the independent variables in both methodologies. However, the factors are obtained by maximizing the covariances (or correlations) among the explanatory variables, in PCA regression, and the covariances (or correlations) between the explanatory variables and the dependent one, in PLS regression.

In this work, PLS regression has been selected because a previous one (Sánchez-Rodríguez et al. (2013)) highlights the goodness of PLS regression versus PCA regression in the determination of quantitative information from NIR data. There are also other works indicating that PLS regression is better than PCA regression in the multivariate analysis of NIR or MIR spectral data (see, for example, Frank and Friedman (1993) or Maggio et al. (2011)).

- 3. Progressive introduction of PLS factors in the regression model.** The estimation algorithms that compare the MSEC and MSEP values obtained for PCA and PLS regression or for PCA or PLS discriminant analysis (PCA-DA or PLS-DA) have established, in the chemometric software, a stopping internal criterion to determine the number of factors to retain. This is the case, for example, of the article by Dupuy et al. (2010a) and (2010b), which uses UNSCRAMBLER software version 9.8 from CAMO (Computer Aided Modelling, Thondheim, Norway) and Matlab software from MathWorks in the analysis of NIR, MIR and concatenated NIR-MIR spectra.

The criteria determining the number of factors to retain in PLS regression are diverse. For example, in PCA, the *Kaiser criterion* is the default in most statistical software. It suggests that those principal components with eigenvalues equal or higher than 1 should be retained, as each eigenvalue represents the variance of the corresponding factor. In PLS analysis, the *criterion of the first increase of the mean squared error of prediction* is considered: the number of latent factors taken into account is

$$h^* = \min\{h > 1 : \text{MSEP}(h + 1) - \text{MSEP}(h) > 0\},$$

being $\text{MSEP}(h)$ the mean squared error of prediction of the regression model with h factors. Gowen et al. (2010) present some measures for preventing the over-fitting in PLS calibration models of near-infrared (NIR) spectroscopy data and investigate the simultaneous use of both model bias and variance in the selection of the number of latent factors to include in the model.

The cited criteria have an empirical character and are not unanimously applied. Therefore, the present work does not fix the number of factors. This number is progressively incremented in the PLS regression model and the associated MSEC and MSEP values are compared. As subsequently confirmed, the NIR matrix of data provides better estimations of the content in fatty acids of olive oil than MIR matrix for a lower number of factors whereas the opposite holds true for a higher number of latent factors.

- 4. Procedures of cross-validation.** The procedures of cross-validation are aimed at avoiding the bias associated to the case of using the same data to fit the regression model and to evaluate the corresponding predictions. They are repetitive algorithms that, at each iteration, subdivide the set of original data in the calibration and the validation subsets. The calibration (or fit) set, formed by the 80% of the data approximately, is used in the fit of the model and provides the MSEC value as a measure of goodness of fit. But the validation (or prediction) set, formed by the remaining 20% of the data, is reserved in the training of the model and so can be used to evaluate its predictive capability with the MSEP value.

The computer programs frequently used in Chemometrics have some cross-validation procedures implemented. They iteratively repeat the selection of calibration and validation sets and provide an average of the MSEC and MSEP values obtained for each iteration. This is the case, for example, of the paper by Rohman and Man (2010), that uses the software TQ Analyst™ Version 6 (Thermo Electron Corporation, Madison, WI); Sinelli et al. (2010), which uses the V-PARVUS package (Forina et al. (2008)); Dupuy et al. (2010b), that uses the UNSCRAMBLER software version 9.8 from CAMO.

But the present work calculates and represents the MSEC and MSEP values obtained for different random selections of the calibration and validation sets, from the NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices of data. The algorithm has been programmed by using the Matlab software from MathWorks. The graphical representations permit to compare not only the mean MSEC and MSEP values but also their variability in the successive selections. The three-dimensional graphics permit to compare the results for the three type of acids and matrices of data simultaneously.

- 5. Decomposition of the mean squared error of prediction.** With the aim of analyzing the nature of the prediction errors, this work uses a decomposition of the MSEP value in the terms E_B , E_V and E_R , attributable to systematic errors, the difference in variability among the real and the predicted values and random errors, respectively (Section 3.1, Sánchez-Rodríguez et al. (2013)). This decomposition is presented for the predictions for each type of fatty acid (SAFA, MUFA and PUFA) and spectral zone (NIR, MIR and concatenated NIR-MIR), as a function of the number of PLS factors in the regression model. Besides, in the context of cross-validation, this decomposition is also presented for the successive selections of calibration and validation sets. Definitively, the ideal situation for evaluating the predictive capability of a model is presented when MSEP has a value nearer to 0 and the great percentage of this value is associated to the randomness and the lowest percentage is attributable to systematic errors. This work afterwards highlights that these percentages depend on the type of fatty acid to estimate, the IR spectral zone used for the estimation (NIR, MIR or NIR-MIR) and the number of PLS factors in the regression model.
- 6. Treatment of the spectra in the context of functional data analysis.** A line of future research (see Sánchez-Rodríguez and Caridad (2014)) could consider IR spectra as the so-called *data objects* in the *object-oriented data analysis* (OODA). This is the particular case of functional data analysis (FDA), in which the data objects of OODA are curves (see the overview by Marron and Alonso (2014)). In this context, usual multivariate techniques, such as PCA or PLS regression, have been extended to

the functional case. For example, Aguilera et al. (2010) apply functional PLS and PCA regressions to simulated and spectrometric data, comparing the results with the corresponding discrete ones and concluding that functional PLS regression provides better estimations of the parameter function than functional PCA regression and similar predictions. Preda and Saporta (2005) apply functional regression models to predict the behavior of shares and conclude that the functional PLS regression model provides the best forecasts evaluating the global model quality by the sum of squared errors. Finally, also the classification techniques, such as logit regression or discriminant analysis, have been successfully extended to the functional case (see, respectively, Escabias et al. (2007) or Preda et al. (2007)).

4. Results and discussion ²

Initially, Section 4.1 deals with the estimation of SAFA, MUFA and PUFA fatty acids of olive oils by PLS regression from the NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices of data. The results of calibration and validation depend on the number of PLS factors in the regression model. These results are compared for the three matrices of data and types of fatty acids. The randomness of the prediction errors is analyzed by a decomposition of MSE. Subsequently, in Section 4.2, the previous results are generalized by using cross-validation procedures, that is, changing iteratively the training and the test data sets. Besides, three-dimensional scatterplots permit to obtain conclusion simultaneously for the three matrices of data or types of fatty acids.

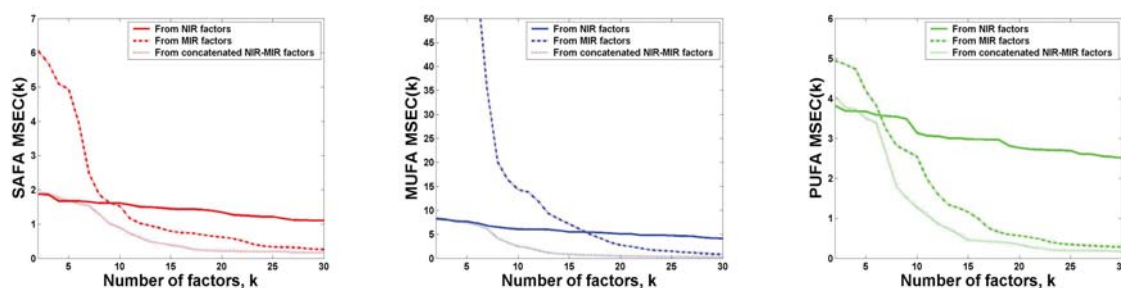
4.1. Chemometrics from IR data: progressive introduction of PLS factors in the regression model

NIR and MIR spectroscopies provide $n \times p$ data matrices whose rows refer to an analyzed olive oil ($n=128$, in total) and each column is associated to a wavelength of the spectrum ($p_{NIR}=1237$ and $p_{MIR}=1843$). The information given by NIR and MIR data is summarized by using PLS regression. Sánchez-Rodríguez et al. (2013) pointed out that this technique, applied directly to the matrix of NIR data, provides a potential methodology to predict the content in fatty acids of olive oil. This paper shows that the results obtained from the whole matrix of data, being considered as a *black box*, are better than the ones obtained with the selection of some spectral peaks or spectral regions by cluster analysis. Besides, PLS regression considerably improves, in this context, the results obtained for PCA regression. As stated above, both PCA and PLS methodologies provide components or factors orthogonal among themselves, thus avoiding the possible presence of multicollinearity in the regression model.

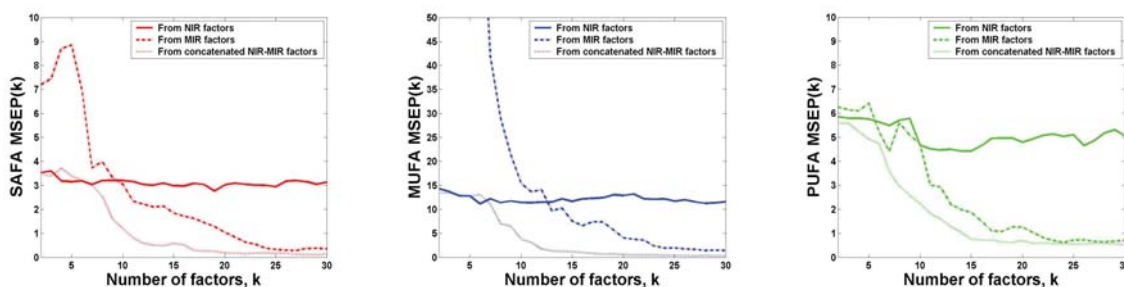
With regard to the rows of the NIR and MIR data matrices, the 80% of them, randomly selected, will be used for calibration and the remaining 20%, for prediction or validation. Initially, the NIR matrix of data is considered and PLS components are extracted. Those components will be progressively introduced in the PLS regression models that consider the content in SAFA, MUFA and PUFA fatty acids as explained variables, respectively. For each number of introduced components, the mean squared error of calibration and prediction, MSEC and MSE, are calculated. The same described process is repeated considering, secondly, the MIR data matrix and, finally, the concatenated NIR-MIR data matrix. In addition, with the purpose of determining the character, systematic or random, of the prediction errors, a decomposition of MSE obtained by the PLS regression models on NIR, MIR and NIR-MIR matrices (in the U_B , U_V and U_R components) is obtained for each fatty acid.

²The chemometric applications have been developed using different software: Microsoft Excel, PASW Statistics -formerly SPSS, currently belonging to IBM-, UNSCRAMBLER from CAMO, MatLab -from MathWorks- and the open source R-Project software.

Figures 3, 4 and 5: MSEC in the estimation of SAFA, MUFA and PUFA from PLS components of NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices



Figures 6, 7 and 8: MSEP in the estimation of SAFA, MUFA and PUFA from PLS components of NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices

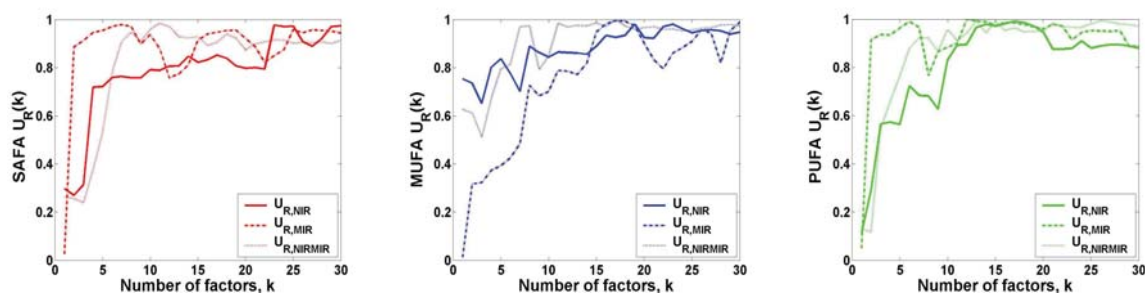


Figures 3, 4 and 5 represent the MSEC in the estimation of SAFA, MUFA and PUFA acids obtained by successively introducing components in the regression model. These components are obtained on the NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices of data. These figures show that, for the three types of fatty acids, the NIR (and concatenated NIR-MIR) matrix of data provides better calibration results in regression models with a lower number of PLS factors. But MIR (and concatenated NIR-MIR) matrix supplies better estimations for models with a higher number of factors.

Then, Figures 6, 7 and 8 represent, in the same context, the respective MSEP values. MSEP evaluates the predictive capability of a model, taking into account that the estimations are calculated by using observations that are not included in the fit or calibration of the model. The conclusions in prediction are similar to the ones obtained in calibration: the MSEP values obtained from MIR data are lower than the ones obtained from NIR data when the number of PLS factors in the model is sufficiently high, but not for low values.

Figures 9, 10 and 11 show the U_R term in the decomposition of MSEP for SAFA, MUFA and PUFA acids, respectively. This term corresponds to random prediction errors and, as in the previous graphics, is expressed as a function of the number of PLS components in the model. The figures evidence that the U_R term represents the great percentage for each case, as this ratio is near to 1. With respect to the comparison of the techniques, there are differences depending on the used NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices of data and the estimated fatty acid. For a higher number of PLS factors in the model, the three NIR, MIR and NIR-MIR U_R terms are very close to one. But for a lower number of factors, the MIR U_R term is closer to one in the estimation of SAFA and PUFA acids but it is farther from one in the estimation of MUFA acids. In this last case, the NIR matrix of data provides better results.

Figures 9, 10 and 11: U_R term of MSEP in the estimation of SAFA, MUFA and PUFA from PLS components of NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices



These results suggest that, under our experimental conditions, a more accurate estimation in calibration and validation of SAFA, MUFA and PUFA content in extra-virgin olive oil (taking GC as the reference technique) is obtained from the NIR matrix for a lower number of PLS factors. For a greater number of PLS factors, the MIR matrix provides the best results. The previous considerations are important as usual chemometric computer programs have internally implemented a stopping criterion to retain a concrete number of PLS factors in the regression model. It is interesting to identify the range of variation of this number to determine the region of the IR spectra, NIR or MIR, that provides better estimations of the different fatty acids. Then, analyzing the nature of the prediction errors, the percentage of them attributable to random causes also depends on the region of the IR spectra and the type of acid. The MIR matrix provides, in general, better results in the estimation of SAFA and PUFA acids, irrespective of the number of PLS factors in the model. On the contrary, in the estimation of MUFA acids, NIR matrix supplies better results, also independently of the number of factors.

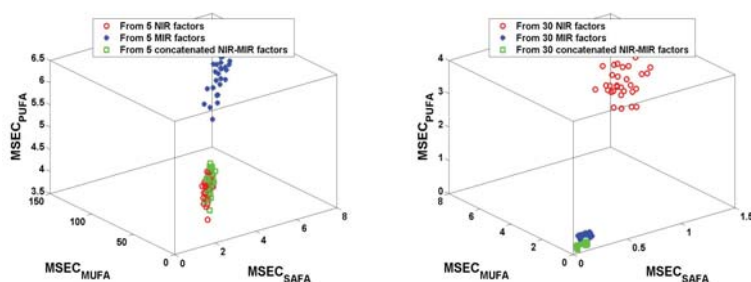
4.2. Cross-validation: generalization of the previous results

In the last subsection, the original data have been subdivided in a single calibration set (containing the 80% of the original data, specifically, 102 out of 128 data) and a single validation set (with the 20%, that is, 26 data). The calibration set is used to train the regression model. The validation set is used to test the model, using data reserved in the fit of the model. With the goal of generalizing the previously obtained results, procedures of cross-validation are used in this section. They are implemented by a repetitive algorithm that, for each iteration, modifies the partition in calibration and validation subsets of the original data set. For each iteration, MSEC and MSEP are calculated for evaluating, respectively, the goodness of fit and the predictive capability of the corresponding model.

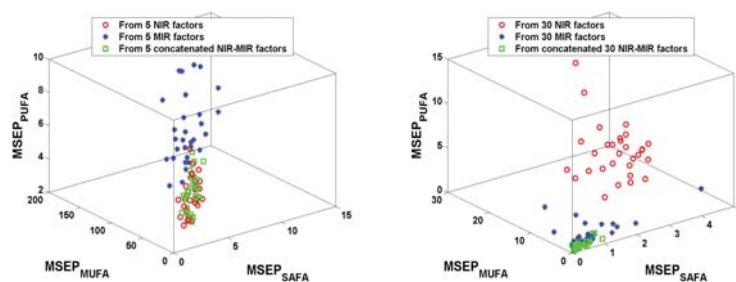
More specifically, the cross-validation algorithm has been implemented for 30 iterations, randomly selecting, for each one, the sets considered for calibration and validation. Besides, since the previous section highlights differences depending on the number of PLS factors in the regression model, this section compares the results for a low number of factors, 5, and also for a high number of factors, 30.

Figures 12 and 13 draw three-dimensional scatterplots for goodness of fit or calibration in cross-validation. The point clouds are associated to models with 5 and 30 PLS factors, respectively, representing $MSEC_{SAFA}$, $MSEC_{MUFA}$ and $MSEC_{PUFA}$ in x , y , z axes. Unlike the previously represented figures, these graphics permit to compare, in a global manner, the results obtained for the three types of fatty acids simultaneously. For 5 PLS factors (Figure 12), the MIR point cloud is farther from (0,0,0) origin than the corresponding to the NIR (and NIR-MIR) data. For 30 PLS factors (Figure 13), the conclusions are the opposite: in this case, the estimations from NIR data have associated the great MSEC values.

Figures 12 and 13: MSEC obtained by the cross-validation algorithm from NIR, MIR and concatenated NIR-MIR data (for SAFA, MUFA and PUFA) for 5 and 30 factors, respectively



Figures 14 and 15: MSEP obtained by the cross-validation algorithm from NIR, MIR and concatenated NIR-MIR data (for SAFA, MUFA and PUFA) for 5 and 30 factors, respectively

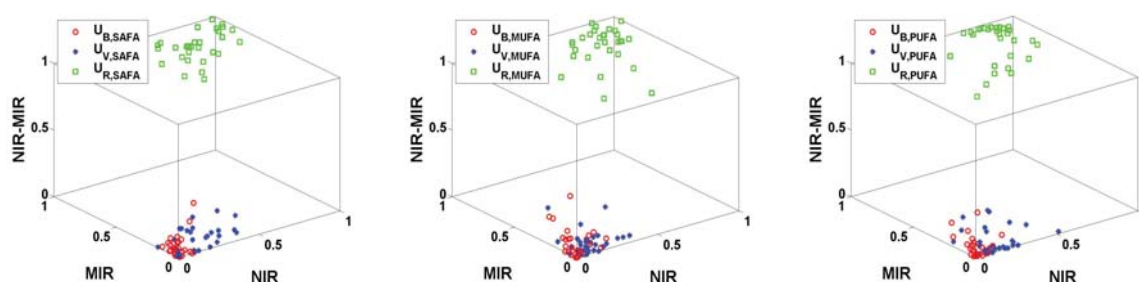


The same conclusions are obtained, for the three fatty acid types, if the models are compared in validation or prediction terms (using MSEP, see Figures 14-15). Besides, the variability existing among the MSEP values is higher for the MIR than for the NIR estimations in the models with 5 PLS factors and lower for the models with 30 PLS factors.

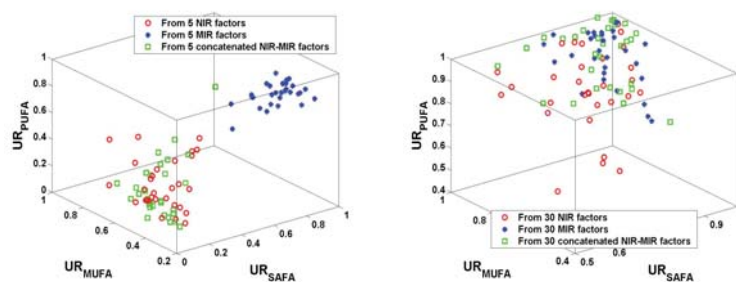
Then, Figures 16-18 represent, for each acid type, the decomposition of MSEP in the terms U_B , U_V and U_R obtained, by the cross-validation algorithm, for each iteration. The aim is to determine the nature, random or systematic, of the prediction errors. The point clouds represent the values corresponding to NIR, MIR and NIR-MIR matrices in x , y , z axes, respectively. It is evident that, for each case, the random component is the most important one, suitable situation in the evaluation of the predictive character of a model.

Finally, with the aim to confirm the differences detected previously depending on the number of the PLS factors in the model, Figures 19 and 20 depict the U_R term associated to the models with 5 and 30 factors. The scatterplots represent the values corresponding to $U_{R,SAFA}$, $U_{R,MUFA}$ and $U_{R,PUFA}$ in x , y , z axes, respectively. The results show that the U_R term obtained from the NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices of data is close to 1 in models with a relatively high number of factors (30). But, in model with a low number of factors, the NIR and NIR-MIR U_R terms are lower, clearly discriminated from the one obtained from the MIR data.

Figures 16, 17 and 18: Decomposition of MSEP obtained by the cross-validation algorithm in the estimation of SAFA, MUFA and PUFA from PLS components of NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices, respectively



Figures 19 and 20: U_R term of MSEP obtained by the cross-validation algorithm from NIR, MIR and concatenated NIR-MIR data (for SAFA, MUFA and PUFA) for 5 and 30 factors, respectively



5. Conclusions

In the last years, procedures which permit to determine in a fast and efficient manner the profile of olive oils in different components have been generalized, specially aiming at evaluating quality indexes. In this sense, spectroscopic techniques have been extended. In parallel, Multivariate Statistics has emerged as a powerful tool to identify and extract the information contained in spectra.

In this work, Chemometrics is applied to data obtained from IR spectra, in the near (NIR) and mid (MIR) zones, and using GC data as a reference. PLS regression models to predict the content in SAFA, MUFA and PUFA fatty acids of olive oil are proposed, using the three NIR, MIR and concatenated NIR-MIR matrices of data. The final conclusion is that the best estimation of calibration or fit and validation or prediction are obtained from the NIR data for lower numbers of PLS factors and from the MIR data for higher numbers of factors. This is important to be taken into account since, usually, chemometric computer programs have a stopping criterion implemented to determine the number of PLS factors to be retained.

These conclusions are generalized via cross-validation procedures. They compare estimations in terms of goodness of fit and prediction for different calibration and validation subsets and evidence the desirable main random nature of the estimation errors. Three-dimensional scatterplots confirm the differences among the three fatty acid types and matrices simultaneously.

Then, this study analyzes the prediction errors to determine their nature, systematic or random. Also in this case the conclusions depend on the number of PLS latent factors, the type of fatty acid and the matrix

of data. These differences are detected by the U_R term, that represents the percentage of randomness in the prediction errors. In general, irrespective of the number of factors in the regression model, the MIR zone provides a higher value in the estimation of SAFA and PUFA acids. But, in the estimation of MUFA acids, the NIR matrix gives better estimations. In the three-dimensional representation of the U_R term for the three acids and IR zones, this term is always close to 1 for a high number of PLS factors. But, for a low number of factors, the NIR and NIR-MIR U_R terms are clearly lower than the associated to the MIR data.

6. Acknowledgements

The authors thank the financial support by 'Junta de Andalucía' (Project P08-FQM-3931) and FEDER funds.

7. Bibliography

- [1] Aguilera, A.M., Escabias, M., Preda, C. and Saporita, G. (2010) Using basis expansions for estimating functional PLS regression. Applications with chemometric data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **104**, 289-305.
- [2] Baeten V, Aparicio R, Marigheto N, Wilson R. (2003) *Manual del aceite de oliva*. AMV ediciones, Mundi-Prensa.
- [3] Baeten, V.; Fernández Pierna, J.A.; Dardenne, P.; Meurens, M.; García-González, D.L. and Aparicio-Ruiz, R. (2005). Detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by FT-Raman and FT-MIR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(16), 6201-6206.
- [4] Berrueta, L.A.; Alonso-Salces R. M. and Héberger K. (2007) Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158, 196-214.
- [5] Bertran, E.; Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S. and Montoliu, I. (2000) Near infrared spectrometry and pattern recognition as screening methods for the authentication of virgin olive oils of very close geographical origins. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 8, 45.
- [6] Casale, M.; Oliveri, P.; Casolino, C.; Sinelli, N.; Zunin, P.; Armanino, C.; Forina, M. and Lanteri, S. (2012) Characterization of PDO olive oil Chianti Classico by non-selective (UV-visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical techniques. *Analytical Chimica Acta*, 712, 56-63.
- [7] Commission regulation (EU) No 61/2011 of 24 January 2011.
- [8] D'Imperio, M.; Mannina, L.; Capitani, D.; Bidet, O.; Rossi, E.; Bucarelli, F.M.; Quaglia, G.B. and Segre, A. (2007). NMR and statistical study of olive oils from Lazio: a geographical, ecological and agronomic characterization. *Food chemistry*, 105(3), 1256-1267.
- [9] Dupuy, N.; Galtier, O.; Ollivier, D.; Vanloot, P. and Artaud, J. (2010a). Comparison between NIR, MIR, concatenated NIR and MIR analysis and hierarchical PLS model. Application to virgin olive oil analysis. *Analytica chimica acta*, 666(1), 23-31.
- [10] Dupuy, N.; Galtier, O.; Le Dréau, Y.; Pinatel, C.; Kister, J. and Artaud, J. (2010b). Chemometric analysis of combined NIR and MIR spectra to characterize French olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(4), 463-475.

- [11] Escabias, M., Aguilera, A.M. and Valderrama, M.J. (2007) Functional PLS logit regression model. *Computational Statistics and Data Analysis* **51**, 4891-4902.
- [12] Frank, I.E. and Friedman, J.H. (1993) A statistical view of some chemometrics regression tools. *Technometrics*, **35**(2), 109-135.
- [13] Forina, M.; Lanteri, S.; Armanino, C.; Casolino, C.; Casale, M. and Oliveri, P. (2008) P-PARVUS. Dip. Chimica e Tecnologie Farmaceutiche e Alimentari, University of Genova, <http://www.parvus.unige.it>.
- [14] Galtier, O.; Abbas, O.; Le Dréau, Y.; Rebufa, C.; Kister, J.; Artaud, J. and Dupuy, N. (2011). Comparison of PLS1-DA, PLS2-DA and SIMCA for classification by origin of crude petroleum oils by MIR and virgin olive oils by NIR for different spectral regions. *Vibrational Spectroscopy*, **55**(1), 132-140.
- [15] Galtier, O.; Dupuy, N.; Le Dréau, Y.; Ollivier, D.; Pinatel, C.; Kister, J. and Artaud, J. (2007). Geographic origins and compositions of virgin olive oils determined by chemometric analysis of NIR spectra. *Analytica chimica acta*, **595**(1), 136-144.
- [16] Gowen A A, Downey G, Esquerre C, O'Donnell C P. Preventing over-fitting in PLS calibration models of near-infrared (NIR) spectroscopy data using regression coefficients. *J. Chemometrics* 2010; **25**: 375-381.
- [17] Guillén, M.D. and Cabo, N. (1997) Characterization of edible oils and lard by Fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **74**(10), 1281-1286.
- [18] Guillén, M.D. and Cabo, N. (1998) Relationships between the composition of edible oils and lard and the ratio of the absorbance of specific bands of their Fourier transform infrared spectra. Role of some bands of the fingerprint region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1788-1793.
- [19] Guillén, M.D. and Cabo, N. (1999) Usefulness of the frequencies of some Fourier transform infrared spectroscopic bands for evaluating the composition of edible oil mixtures. *European Journal of Lipid Sciences and Technology*, **1**, 71-76.
- [20] Guillén, M.D. and Ruiz, A. (2003). Edible oils: discrimination by ^1H nuclear magnetic resonance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**(4), 338-346. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **74**(10), 1281-1286.
- [21] Gurdeniz, G. and Ozen, B. (2009). Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. *Food chemistry*, **116**(2), 519-525.
- [22] International Olive Oil Council, 200 (COI / T.20 / Doc. no. 24 / 2001a). Preparation of the fatty acid methyl esters from olive oil and olive-pomace oil.
- [23] International Olive Oil Council, 200 (COI / T.20 / Doc. no. 17 / 2001b). Determination of trans unsaturated fatty acids by capillary column gas chromatography.
- [24] Maggio, R.M.; Valli, E.; Bendini, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Toschi, T.G. and Cerretani, L. (2011) A spectroscopic and chemometric study of virgin olive oils subjected to thermal stress. *Food Chemistry*, **127**, 216-221.

- [25] Marron, J.S. and Alonso, A.M. (2014) Overview of object oriented data analysis. *Biometrical Journal*, 56, doi: 10.1002/bimj.201300072.
- [26] Öztürk B, Yalçın A, Özdemir D. (2010) Determination of olive oil adulteration with vegetable oils by near infrared spectroscopy coupled with multivariate calibration. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 18, 191-201.
- [27] Preda, C. and Saporta, G. (2005) PLS regression on a stochastic process. *Computational Statistics and Data Analysis* 48, 149-158.
- [28] Preda, C., Saporta, G. and Lévêder, C. (2007) PLS classification of functional data. *Computational Statistics* 22, 223-235.
- [29] Rezzi, S.; Axelson, D.E.; Héberger, K.; Reniero, F.; Mariani, C. and Guillou, C. (2005). Classification of olive oils using high throughput flow¹H NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks. *Analytica Chimica Acta*, 552(1), 13-24.
- [30] Rohman, A. and Che Man, Y.B. (2010) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulteration with palm oil. *Food research international*, 43, 886-892.
- [31] Sánchez-Rodríguez, M.I.; Sánchez-López, E.; Caridad, J.M.; Marinas, A.; Marinas, J.M. and Urbano, F.J. (2013) New insights into evaluation of regression models through a decomposition of the prediction errors: application to near-infrared spectral data. *Statistics and Operations Research Transactions (SORT)*, 37(1), 57-78.
- [32] Sánchez-Rodríguez, M.I. and Caridad, J.M. (2014) Modelling and partial least squares approaches in OODA. *Biometrical Journal*, 56, doi: 10.1002/bimj.201300178.
- [33] Sinelli, N.; Casiraghi, E.; Tura, D. and Downey, G. (2008) Characterisation and classification of Italian virgin olive oils by near-and mid-infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 16, 335-342.
- [34] Sinelli, N.; Cerretani, L.; Di Egidio, V.; Bendini, A. and Casiraghi, E. (2010) Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity. *Food research international*, 43, 369-375.
- [35] Vlachos, N.; Skopelitis, Y.; Psaroudaki, M.; Konstantinidou, V.; Chatzilazarou, A. and Tegou, E. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*, 573-574, 459-465.
- [36] Zhang, Q.; Liu, C.; Sun, Z.; Hu, X.; Shen, Q. and Wu, J. (2012) Authentication of edible vegetable oils adulteration with used frying oil by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 132, 1607-1613.