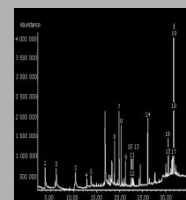
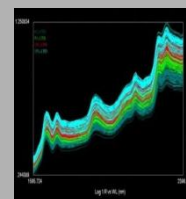


UNIVERSIDAD DE CORDOBA

Tesis doctoral



Desarrollo y aplicación de métodos analíticos para la caracterización y mejora de semillas y aceites vegetales

Álvaro Fernández de la Cuesta

TITULO: *Desarrollo y aplicación de métodos analíticos para la caracterización y mejora de semillas y aceites vegetales*

AUTOR: *Álvaro Fernández de la Cuesta*

© 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



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

TESIS DOCTORAL

**Desarrollo y aplicación de métodos
analíticos para la caracterización y
mejora de semillas y aceites vegetales**

Autor
Álvaro Fernández de la Cuesta

Dirigida por
Dr. Leonardo Velasco Varo
Dra. M^a Victoria Ruíz Méndez

Córdoba, Febrero 2014



Dr. Leonardo Velasco Varo, Investigador Científico.

INFORMA

Que el trabajo titulado “Desarrollo y aplicación de métodos analíticos para la caracterización y mejora de semillas y aceites vegetales” realizado por D. Álvaro Fernández de la Cuesta, bajo su dirección, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba.

Considerando que se encuentra concluida, doy el VºBº para su presentación y lectura.

Fdo: Leonardo Velasco Varo

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Velasco Varo", with a large flourish above it.

Córdoba, Febrero 2014



Instituto de la Grasa. CSIC

Dra. M^a Victoria Ruíz Méndez, Científico Titular.

INFORMA

Que el trabajo titulado “Desarrollo y aplicación de métodos analíticos para la caracterización y mejora de semillas y aceites vegetales” realizado por D. Álvaro Fernández de la Cuesta, bajo su dirección, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba.

Considerando que se encuentra concluida, doy el V^oB^o para su presentación y lectura.

Fdo: M^a Victoria Ruíz Méndez

Córdoba, Febrero 2014



TÍTULO DE LA TESIS: Desarrollo y aplicación de métodos analíticos para la caracterización y mejora de semillas y aceites vegetales

DOCTORANDO/A: Álvaro Fernández de la Cuesta

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).

La Tesis Doctoral que se presenta tiene como objetivo global del desarrollo y aplicación de nuevos métodos analíticos, eficientes y fiables, adaptados a las necesidades de los programas de mejora genética. La Tesis incluye cuatro capítulos que comprenden i) Desarrollo y validación de un nuevo método cromatográfico para el análisis de fitoesteroles en semillas; ii) Desarrollo de un método basado en análisis por espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) y análisis discriminante para la identificación de semillas de ricino con alto contenido en ácido oleico; iii) Desarrollo y validación de ecuaciones de calibración NIRS para el análisis del contenido en aceite y perfil de ácidos grasos en harina de almendra; y iv) Caracterización de las propiedades físico-químicas y estabilidad oxidativa de un nuevo aceite de cártamo con alto contenido en gamma-tocoferol. El desarrollo experimental de la Tesis Doctoral ha requerido la formación en una amplia gama de técnicas analíticas y la puesta a punto de nuevos métodos de gran utilidad para programas de mejora genética. Este trabajo experimental se ha desarrollado de forma ejemplar por parte del Doctorando, lo que ha conducido a unos resultados a nuestro juicio excepcionales que contribuirán al avance de la mejora de la calidad de la semilla en cultivos oleaginosos. Tres capítulos han dado lugar a artículos ya publicados en prestigiosas revistas internacionales en el ámbito de la química de aceites (European Journal of Lipid Science and Technology, Journal of the American Oils Chemists' Society), mientras que el cuarto capítulo está actualmente siendo evaluado en el European Journal of Lipid Science and Technology. Los Directores consideramos que se han cumplido con creces los objetivos propuestos y que el desarrollo de Tesis ha sido plenamente satisfactorio.

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

Córdoba, 7 de Febrero de 2014

Firma del/de los director/es

Fdo.:Dr. Leonardo Velasco Varo

Fdo.: Dra. María Victoria Ruiz Méndez



TÍTULO DE LA TESIS: Desarrollo y aplicación de métodos analíticos para la caracterización y mejora de semillas y aceites vegetales.

DOCTORANDO/A: Álvaro Fernández de la Cuesta

ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

José M^a Marinas Rubio, Catedrático Emérito de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba y Director del Grupo de Investigación del Grupo FQM-162 del PAIDI, de la Junta de Andalucía, se ratifica en el Informe favorable, en todos sus extremos, de los Directores de Tesis, Dr. Leonardo Velasco Varo y Dra. María Victoria Ruiz Méndez.

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

Córdoba, 27 de febrero de 2014

Firma del responsable de la línea de investigación

Fdo: José María Marinas Rubio

A mis padres y hermanos.

Sin lucha no hay
progreso.

Frederick Douglass

(1818-1895)

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a los doctores **Leonardo Velasco Varo** y **María Victoria Ruiz Méndez**, directores de esta Tesis, por su gran ayuda en la elaboración de este trabajo en todas y cada una de sus facetas, por su entera dedicación y por los consejos y apoyo moral brindados a lo largo de estos años.

A los doctores **José M^a Fernández Martínez** y **Doña Begoña Pérez Vich**, por su disponibilidad, ayuda y apoyo que siempre me han dado.

Al Dr. **Rafael Socías i Company** del **Centro de Investigación y Tecnología Agraria de Aragón** por suministrar muestras utilizadas en uno de los capítulos de la tesis.

Al Dr. **Rafael Luque Álvarez de Sotomayor**, por su disposición en todo el período de realización del mismo.

Al **Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)** y **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** en Córdoba, institución donde se ha realizado esta tesis, y al **Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla)** por la ayuda y facilidades aportadas.

A todos los compañeros y amigos de este centro **Angustias Márquez, Lidia del Moral, Rocío Pineda Martos, Pablo Corzo, Yamen Hamdan, María José García, Ahmed Yassein, Elena García, Raxa Anoui, Marta Aguirre González, Gloria Fernández, Angustias Jiménez, Placida Nieto, Lucía Medina y David Ragel Celdran**. Por los grandes momentos compartidos en estos años, por su ayuda, por sus facilidades aportadas, por su apoyo y entusiasmo.

A todo el equipo de campo del IAS que ha colaborado en los trabajos de campo, especialmente a **Alberto Merino, Cristóbal Prieto, José Molina y Benito Gallardo**.

A la **Junta de Andalucía** que financió los proyectos de investigación P07-AGR-03011 y P08-AGR03962 dentro de los cuales se realizaron la mayor parte de los trabajos de esta tesis.

A mi **familia**, especialmente a **mis padres y hermanos** por su amor, apoyo, el gran sacrificio realizado día a día que han hecho posible que mi esfuerzo haya dado sus

Agradecimientos

frutos. Gracias por confiar en mí, animarme en los momentos difíciles, por vuestra paciencia e inestimables desvelos.

A las personas que han contribuido en la mejora de mi rendimiento intelectual, gracias a su apoyo incondicional en darme ánimos para realizar mi actividad deportiva, y así despejar la mente, especialmente a **Eladia Caballero García**, compañera y gran amiga de grandes rutas entres valles y montañas y, cómo no, a todos mis amigos, amigas y compañeros de la sierra cordobesa y extremeña.

Finalmente, quisiera extender mi agradecimiento a todos y cada uno de mis **amigos** tanto de la Universidad, colegio, compañeros de vivencias, etc, que han estado apoyandome en todo momento, por compartir momentos de penas y alegrías, por su valiosa amistad impregnada de un sincero cariño.

Índice general

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	
1.- Objetivo general y contenido de la tesis	1
2.- La calidad de los aceites vegetales	1
2.1.- Introducción	1
2.2.-Ácidos grasos	2
2.2.1-Definición y estructura	2
2.2.2.-Aceites destinados al consumo humano	6
2.2.3.-Aceites destinados a la industria	7
2.3.-Tocoferoles	8
2.3.1.-Definición y estructura	8
2.3.2.-Actividad antioxidante de los tocoferoles	10
2.4.-Fitoesteroles	11
2.4.1.-Definición, clasificación y estructura	11
2.4.2-Actividad de los fitoesteroles	16
3.-Cultivos oleaginosos	17
3.1.-Girasol	18
3.1.1-Descripción de la planta e importancia económica	18
3.1.2.-Mejora genética de componentes de calidad del aceite de girasol	19
3.2.-Cártamo	21
3.2.1.-Descripción de la planta e importancia económica	21
3.2.2.-Mejora genética de la calidad	22
3.3.-Ricino	22
3.3.1.-Descripción de la planta e importancia económica	22
3.3.2.-Mejora genética de la calidad y usos del aceite	23

Índice general

3.4.-Almendra	24
3.4.1.-Descripción de la planta e importancia económica	24
3.4.2.-Mejora genética de caracteres de calidad del fruto y del aceite	25
4.-Desarrollo de variabilidad para componentes de calidad: Importancia de métodos rápidos de cribado para la evaluación de estos componentes	25
5. Técnicas instrumentales utilizadas en el análisis de calidad del aceite	26
5.1.-Cromatografía	26
5.1.1.-Introducción	26
5.1.2.-Cromatografía en capa fina (TLC)	26
5.1.3.-Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	27
5.1.4.-Cromatografía gaseosa (CG)	29
5.1.5.-Derivatización en cromatografía gaseosa	31
5.2.-Termoestabilidad de los aceites	32
5.2.1.-Introducción	32
5.2.2.- Estimación de la estabilidad oxidativa	33
5.3.-Espectroscopia de infrarrojo cercana (NIRS)	34
5.3.1.-Introducción	34
5.3.2.-Bases teóricas	35
5.3.3.-Bases instrumentales	38
5.3.4.-Bases quimiométricas	40
5.3.4.1.-Pretratamientos espectrales	40
a) Corrección del ruido	41
b) Derivación	41

Índice general

c) Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión (MSC, Multiplicative Scatter Correction) y variable normal estándar (SNV, Standard Normal Variable)	42
5.3.4.2.-Reducción de variables-PCA (Principal Component Analysis)	42
5.3.4.3.-Muestras anómalas	44
5.3.4.4.-Técnicas quimiométricas en análisis cuantitativo NIRS	44
5.3.4.4.1.-Estrategias y selección de muestras de calibración	45
5.3.4.4.2.-Validación externa	47
5.3.4.4.3.-Métodos con variables originales	47
5.3.4.4.4.-Métodos con reducción de variables	48
a) Regresión por Componentes Principales (PCR, <i>Principal Component Regression</i>)	49
b) Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS, <i>Partial Least Square Regression</i>)	49
c) Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS, <i>Modified Partial Least Square Regression</i>)	49

Índice general

5.3.4.5.-Técnicas quimiométricas en análisis cualitativo NIRS	53
5.3.4.5.1.-Análisis discriminante	54
5.3.4.5.2.-Análisis SIMCA (SIMCA, Soft Independent Modelling of Class Analogy)	55
5.3.4.5.3.-Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (DPLS, Discriminat Partial Least Square)	56
6.-Referencias	57
OBJETIVOS DE LA TESIS	81
CAPITULO 1	
Validation of a method for the analysis of phytosterol in sunflower seeds	82
1.-Introduction	82
2.-Materials and methods	83
2.1.-Plant materials	83
2.2.-Analysis of phytosterol content in sunflower seeds	83
2.3.-Determination of the standard error of the method	84
2.4.-Seed oil extraction	84
2.5.-Analysis of phytosterol content in sunflower oils	84
2.6.-Analysis of fatty acids and tocopherols	84
2.7.-Statistical analyses	84
3.-Results	85
4.-Discussion	86
References	87
CAPITULO 2	
Identification of High Oleic Castor Seeds by Near Infrared Reflectance Spectroscopy	89
Abstract	89

Índice general

Introduction	89
Materials and Methods	90
Castor Seeds	90
NIRS Scanning	90
Gas-Liquid Chromatography	90
Spectral and Discriminant Analysis	90
Results and Discussion	90
Conclusion	93
References	93
 CAPITULO 3	
Near-infrared spectroscopy for analysis of oil content and fatty acid profile in almond flour	94
1.-Introduction	94
2.-Materials and methods	95
2.1.-Samples	95
2.2.-NIRS Scanning	95
2.3.-NIRS calibration	95
2.4.-Analysis of oil content and fatty acid profile	95
3.-Results and discussion	96
4.-Conclusions	99
References	99
 CAPITULO 4	
Characterization of novel safflower oil with high γ-tocopherol content	100
Abbreviations	100
Practical applications	101
1. Introduction	102
2. Materials and methods	102
2.1. Seed samples	103
2.2. Oil extraction	103
2.3. Analytical methods	103

Índice general

3. Results and discussion	105
Acknowledgments	107
References	107
CONCLUSIONES FINALES	113
INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO	115
ACEPTACIÓN DE LOS COAUTORES	123

Resumen

Resumen

Uno de los principales objetivos de la mejora genética de las plantas oleaginosas es el aumento del contenido y de la calidad del aceite de sus semillas. La calidad de los aceites vegetales se puede evaluar con referencia tanto a sus propiedades nutricionales como a sus propiedades funcionales, y no existe una calidad óptima de un aceite ya que esta depende de su uso específico. Los principales parámetros que determinan dichas propiedades son la composición de ácidos grasos y la presencia de componentes minoritarios como tocoferoles y fitoesteroles.

De acuerdo con lo mencionado, la mejora genética de las plantas oleaginosas se basa en la modificación de la composición del aceite en dichos componentes y requiere la evaluación de la variación existente en colecciones de germoplasma de las distintas especies y de la obtenida por mutagénesis, así como de la evaluación de poblaciones segregantes en los programas de mejora. Esto supone el análisis de un número elevado de muestras de las que se dispone una cantidad muy pequeña. Un requisito indispensable para esta evaluación, es el desarrollo de métodos rápidos, fiables y no destructivos.

El objetivo principal de esta tesis ha sido el desarrollo y puesta a punto de nuevos métodos de análisis aplicables a componentes de calidad del aceite en distintas semillas oleaginosas. En particular:

- 1.- En esta tesis se ha desarrollado y validado un método para el análisis de fitoesteroles en muestras pequeñas de semillas de girasol, lo cual es óptimo para estudios genéticos y mejora genética en los que la extracción de aceite no es factible. Los resultados han revelado gran variación de contenido en fitoesteroles en semillas de girasol, con un rango de variación desde 1426,0 hasta 4710,0 mg / kg de semilla y 2.855,2 a 9.752,0 mg/kg aceite.
- 2.- Se ha puesto a punto un método basado en la técnica de NIRS y análisis discriminante lineal para la discriminación entre semillas con alto contenido en oleico de semillas con alto contenido en ricinoleico. Dicha discriminación se basa principalmente en las regiones espectrales alrededor de 1400 y 1914 nm, principalmente asociadas con la absorbancia del grupo OH presente en el ácido ricinoleico.
- 3.- Asimismo, se ha demostrado que la técnica NIRS puede ser utilizada con precisión para el análisis de contenido de aceite y la concentración de los ácidos oleico y linoleico en muestras de harina de almendras. El análisis de estos componentes, se basa principalmente en la región espectral de 2240 a 2380 nm.
- 4.- Finalmente, la investigación llevada a cabo en esta tesis ha revelado un nuevo aceite de cártamo con alto contenido en ácido oleico y γ -tocoferol con mayor estabilidad oxidativa que el aceite alto oleico convencional, con alto contenido en α -tocoferol, y, en consecuencia, es adecuado para aplicaciones tales como la fritura, biolubricación o biocombustibles.



Introducción

Introducción

1.- Objetivo general y contenido de la tesis

El objetivo general de esta tesis es el desarrollo y puesta a punto de nuevos métodos de análisis aplicables a componentes de calidad del aceite en semillas oleaginosas como contenido y perfil de fitoesteroles, la utilización de espectroscopía infrarroja cercana NIRS (Near Infrared Spectroscopy) para composición en ácidos grasos y la caracterización de un nuevo aceite de cártamo con perfil de tocoferoles modificados. Los métodos se han aplicado para cuatro especies: girasol, cártamo, ricino y almendro. Además, se describen los componentes de calidad del aceite, la importancia económica de las especies utilizadas y las técnicas de análisis utilizadas para su evaluación.

2.- La calidad de los aceites vegetales

2.1.- Introducción

Uno de los principales objetivos de la mejora genética de las plantas oleaginosas se basa en el contenido y calidad del aceite (Velasco y Fernández-Martínez, 2002). El contenido de aceite de las semillas oleaginosas depende parcialmente de la proporción relativa entre los tejidos del embrión y la cáscara de la semilla (Knowles, 1989; Miller y Fick, 1997; Fernández-Martínez et al., 2009). La calidad de los aceites vegetales se refiere a las propiedades nutricionales y funcionales del aceite (Fernández-Martínez et al., 2004). No existe una calidad óptima de un aceite ya que esta depende de su uso específico (Velasco y Fernández-Martínez, 2002). Los principales parámetros que determinan la calidad de su aceite son la composición de ácidos grasos y la presencia de componentes minoritarios como tocoferoles y fitoesteroles (Velasco y Fernández-Martínez, 2002; Fernández-Martínez et al., 2006). De acuerdo con lo mencionado, dependiendo de las aplicaciones del aceite de una especie, la mejora de calidad de su aceite se basa en la modificación de la composición de dichos componentes que intervienen en la calidad y cuyas características explicamos a continuación.

2.2.-Ácidos grasos

2.2.1-Definición y estructura

Los ácidos grasos son largas cadenas hidrocarbonatadas con un número par de átomos de carbono y con un grupo carboxilo terminal. La mayoría se encuentran formando parte de los triacilgliceroles (Voet et al., 2007). Los triacilgliceroles son moléculas de glicerol cuyos tres grupos hidroxilo se hallan esterificados con ácidos grasos y se identifican según la ubicación de los mismos (Figura 1).



Figura 1. Representación de las moléculas de glicerol y triacilglicerol. Los grupos R_1 , R_2 y R_3 son ácidos grasos.

Los ácidos grasos presentan un comportamiento anfipático. Poseen una zona lipófila correspondiente a la cadena hidrocarbonatada y una zona hidrófila que es el grupo terminal carboxilo (Müller-Esterl, 2008). Entre varios ácidos grasos saturados, se establecen fuerzas de Van der Waals y enlaces de puente de hidrógeno (Petrucci et al., 2011). Dependiendo del número de enlaces, los ácidos grasos se clasifican en saturados, si no presentan dobles enlaces, monoinsaturados, si poseen uno sólo y poliinsaturados si poseen varios. El punto de fusión aumenta a medida que se incrementa el número de carbonos ya que hace falta más calor para vencer las fuerzas de Van der Waals. A medida que aumenta el número de dobles enlaces la molécula se vuelve más retorcida dando lugar, principalmente, a configuración *cis*, lo que disminuye las fuerzas de Vander Waals y el punto de fusión (Timberlake, 2011). Un ácido graso insaturado *cis* es el que posee los grupos semejantes (generalmente -H) en el mismo lado de un doble enlace, mientras que los *trans* poseen los grupos semejantes en los lados distintos del doble enlace. Los ácidos grasos con dobles enlaces *cis* no son cadenas lineales sino que poseen un codo en el punto donde está el doble enlace. Por el contrario, los ácidos grasos insaturados en configuración *trans* sí son cadenas lineales, lo que da lugar a empaquetamientos más compactos de sus moléculas y a mayores puntos de fusión. Así por ejemplo, el punto de fusión del ácido oleico (Figura 2) (*cis*-9-octadecenoico) es 5

Introducción

°C, mientras que el del ácido eláídico (trans-9-octadecenoico) es 44 °C (Damodaran et al. 2008).

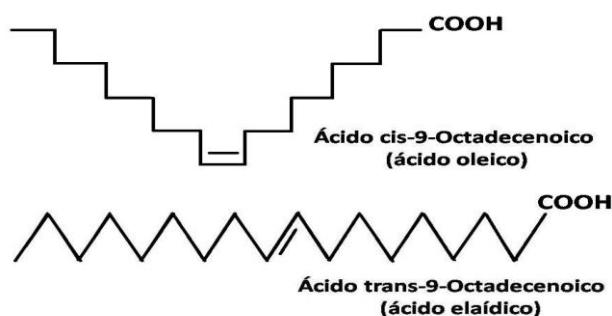


Figura 2. Configuraciones cis y trans para el ácido 9-Octadecenoico

Los ácidos grasos se pueden designar de tres formas: 1) se utiliza un sistema de nomenclatura abreviada con tres números, el primero designa la longitud de la cadena, el segundo el grado de insaturación indicado por el número de dobles enlaces, y el tercero las posiciones de las insaturaciones desde el grupo carboxilo. Así por ejemplo, 18:1 (9), indica un ácido graso con 18 átomos de carbono y un doble enlace en la posición 9 contando desde el grupo carboxilo (ácido oleico); 2) también se pueden designar con los dos primeros números de la misma forma, sin embargo el tercero lo designamos como (n-x), siendo x la posición de la primera insaturación contando desde el carbono más alejado del grupo carboxilo. Con el mismo ejemplo designamos al ácido oleico (18:1)(n-9); 3) para designar a las familias de ácidos grasos insaturados utilizamos el sistema omega (ω) tomando como referencia el carbono más alejado del grupo carboxilo (carbono ω). Se nombra el primer doble enlace desde dicho carbono. Cabe destacar el ácido α -linolénico (9, 12, 15-octadecatrienoico), (18:3)(n-3) (ácido ω -3); ácido linoleico (octadeca-9, 12-dienoico), (18:2)(n-6) (ácido ω -6); y ácido oleico (9 octadecenoico), (18:1) (n-9) (ácido ω -9) (Belitz et al., 2009). En la Figura 3 aparecen las estructuras y nomenclatura de algunos ácidos grasos insaturados y en la Tablas 1 y 2 se citan ejemplos de ácidos grasos saturados e insaturados.

Introducción

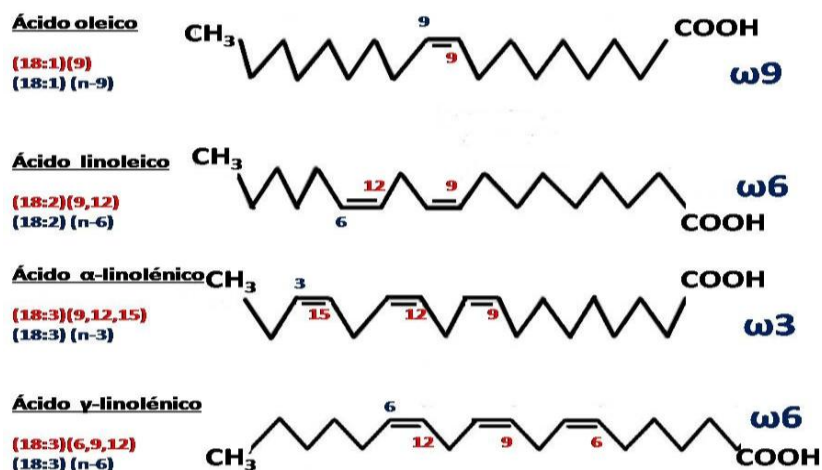


Figura 3. Estructura y nomenclatura de ácidos grasos de la familia ω

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura
Ácido cáprico	Decanoico	10:0
Ácido laúrico	Dodecanoico	12:0
Ácido mirístico	Tetradecanoico	14:0
Ácido palmítico	Hexadecanoico	16:0
Ácido esteárico	Octadecanoico	18:0
Fuente: Berlitz et al. (2009).		

Tabla 1. Principales ácidos grasos saturados

Familia	Nombre común	Nombre sistemático	Abreviaturas	
$\omega 3$	Ácido α -linolénico	9,12,15-octadecatrienoico	(18:3)(9,12,15)	(18:3)(n-3)
$\omega 6$	Ácido linoleico	9,12-octadecadienoico	(18:2)(9,12)	(18:2)(n-6)
	Ácido γ -linolénico	6,9,12-octadecatrienoico	(18:3)(6,9,12)	(18:3)(n-6)
$\omega 9$	Ácido oleico	9-cis-octadecenoico	(18:1)(9)	(18:1)(n-9)
	Ácido ricinoleico	12-hidroxi-9-Octadecenoico	(12)OH(18:1)(9)	(12)OH(18:1)(n-9)
	Ácido erúxico	13-docosanoico	(22:1)(13)	(22-1)(n-9)
Fuente: Berlitz et al. (2009).				

Tabla 2. Principales ácidos grasos insaturados.

A continuación se citan los contenidos de aceite y ácidos grasos de las cuatro especies que se han estudiado en esta tesis: *el girasol* posee un contenido de aceite en su semilla que oscila entre 45 y 50% en las variedades cultivadas, encontrándose el ácido linoleico en mayor proporción. La proporción relativa de los ácidos grasos oleico y linoleico es muy variable y depende principalmente de la temperatura durante el

Introducción

desarrollo de la semilla (Fernández-Martínez et al., 1993b). El ácido linoleico, con dos dobles enlaces en su molécula, es más susceptible a la oxidación (Fernández-Martínez et al., 2006); la semilla del *cártamo* contiene entre un 35 y 39 % de aceite (Fernández-Martínez, 1997), siendo el ácido linoleico el de mayor porcentaje; *el ricino* posee alto contenido en aceite en la semilla (42-58%), que es la principal fuente natural del ácido ricinoleico (85-90%) (Hayes et al., 1995; Labalette et al., 1996; Fernández-Martínez y Velasco, 2012); finalmente, la semilla del *almendro* posee un contenido en aceite que varía entre 48 y 67%, dependiendo del cultivar y lugar de origen (Saura-Calisto et al., 1988; Abdallah et al., 1998; Kodad y Socias i Company, 2008; Sathe et al., 2008). Los ácidos oleico y linoleico constituyen el 90 % del total de contenido de ácidos grasos del aceite siendo el ácido oleico el que se encuentra en mayor proporción (Socias i Company et al., 2008). En la siguiente Tabla se muestran las composiciones estándares del aceite de las semillas de las principales especies oleaginosas.

Especie	10:0	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:1(OH)	18:2	18:3	22:1
Girasol				7,0		3,0	30,0		60,0		
Cártamo			0,1	6,5	0,1	2,9	13,8		75,3		
Ricino				1,0		1,0	3,0	90,0	4,0	tr	
Almendra				6,3	0,5	2,0	69,9		19,4		
Soja				11,0	0,5	4,0	22,0		53,0	7,5	
Maíz		0,1	0,2	13,0		2,5	30,5		52,0	1,0	
Algodón			0,8	24,0	0,8	2,6	19,0		52,5	tr	
Palma		0,3	1,1	45,1	0,1	4,7	38,8		9,4	0,3	
Linaza				6,1	0,1	3,2	16,6		14,2	59,8	
Sésamo				9,2	0,1	5,8	38,2		45,0	0,6	
Cacahuete				12,5		2,5	37,0		41,0	0,3	1
Oliva				13,7	1,2	2,5	71,1		10,0	0,6	
Coco	6,7	47,6	18,1	8,8		2,6	6,2		1,6		
Nuez de palma	4,0	49,0	16,0	9,0		2,0	14,0		2,0		
Colza				3,0		1,0	16,0		14,0	10,0	49,0

Fuentes: White (1992); Padley, Gustone y Harwood (1994); Fernández- Martínez et al. (2009), Kodad et al. (2010)

Tabla 3. Composición estándar media en ácidos grasos (%) del aceite de las principales especies oleaginosas

2.2.2.-Aceites destinados al consumo humano

Representan el 70-80% de la producción mundial de aceite. Su consumo puede darse de forma directa (aceites vegetales crudos para frituras o ensaladas), o de forma indirecta (incluidos en otros alimentos, bollería industrial, etc.). En estos aceites, los ácidos grasos más comunes son los constituidos por 18 átomos de carbono (Vles y Gottenbos, 1989). En cuanto a sus características podemos clasificarlos desde el punto de vista nutricional y tecnológico.

Punto de vista nutricional: a) *ácidos grasos esenciales*: son el ácido linoleico ω -6 y el ácido α -linolénico ω -3 que no se pueden sintetizar en el organismo y tienen que ser ingeridos en la dieta. La carencia de estos provoca enfermedades por problemas en la mayor parte de los tejidos humanos (Simopoulos et al., 1999); b) *ácidos grasos insaturados*: presentan un efecto positivo en la regulación del contenido de lipoproteínas de baja densidad en el plasma sanguíneo (LDL) (efecto hipocolesterolémico) y por lo tanto reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Damodaran et al., 2010); c) *ácidos grasos saturados*: al contrario que los ácidos grasos insaturados, aumentan la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el plasma sanguíneo (efecto hipercolesterolémico), así como el nivel de colesterol sérico, lo que supone un riesgo en cuanto a enfermedades cardiovasculares. El ácido esteárico se considera neutro (Pearson, 1994). Entre ellos los ácidos láurico, mirístico y palmítico son los más hipercolesterolémicos (Damodaran et al., 2010); d) *compuestos tóxicos*, un ácido graso que resulta tóxico es el ácido erúxico cuya mayor fuente son la colza y otras especies del género *Brassica*. Algunos estudios con animales relacionaron su ingesta con enfermedades del corazón (Gopalan et al., 1974; Schiefer et al., 1978). Por lo tanto, el aceite de colza que se comercializa, se obtiene de cultivares en los cuales se ha eliminado por selección dicho ácido graso. El ácido ricinoleico se encuentra en el aceite de ricino. Su consumo presenta también efectos perjudiciales para la salud haciendo que este aceite no sea apto para el consumo (Fernández-Martínez y Velasco, 2012).

Punto de vista tecnológico: a) *ácidos grasos insaturados*: son propensos a la oxidación, sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados. La oxidación tiene lugar principalmente en procesos de fritura a temperaturas mayores de 120°C, provocando la aparición de peróxidos y otros compuestos que le confieren al aceite olores y sabores

Introducción

desagradables (Damodaran et al., 2010). Por ello, para los aceites destinados a las frituras, se busca aumentar los niveles de ácido oleico, que es más resistente a esos procesos de degradación; *b) Fabricación de grasas sólidas*: los aceites vegetales son líquidos a temperatura ambiente, por lo que, para fabricar grasas sólidas como margarinas, se llevan a cabo procesos de hidrogenación y transesterificación que dan lugar a grasas con ácidos grasos en posición *trans*. Estos compuestos aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Damodaran et al., 2010). Un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados disminuye dicho riesgo al adquirir el aceite consistencia semisólida. La interesterificación ha tomado un papel muy importante a raíz de las implicaciones negativas en la salud por el consumo de los ácidos *trans* generados en la hidrogenación. Con las reacciones de interesterificación se movilizan los radicales acilo de los acilgliceroles con un subsiguiente reacomodo (reacomodo de ácidos grasos en triacilgliceroles). A diferencia de la hidrogenación, estas reacciones no afectan a la saturación y no producen isomerizaciones. Con este procedimiento se fabrican bases grasas sin ácidos grasos *trans* para margarinas, mantecas vegetales, etc. (Dergal, 2006).

2.2.3.-Aceites destinados a la industria

Representan un tercio de la producción de aceites vegetales. Se utilizan en la fabricación de lubricantes, pinturas, detergentes, biodiesel, etc. Ácidos grasos importantes en este campo son el ácido láurico, erúrico y ricinoleico (Hill y Murphy, 1991; Ohlrogge, 1994; Murphy, 1995; Delseny et al., 1999).

Podemos clasificarlos en: *a) ácidos grasos de cadena corta y media*: que se requieren para la fabricación de jabones y detergentes. El ácido láurico es el más importante; *b) ácidos grasos de cadena larga*: que se utilizan para la fabricación de lubricantes resistentes a altas temperaturas y en la industria del plástico y nailon. El más importante es el ácido erúrico (Töpfer et al., 1995); *c) ácidos grasos hidroxilados*: cuya su principal fuente es el ricino con una proporción del 90% de ácido ricinoleico, muy utilizado en la industria química como materia prima en recubrimientos, pinturas, tintas, y una amplia variedad de productos. El aceite de ricino es una alternativa prometedora en la fabricación de biodiesel, aunque su alto contenido en ácido ricinoleico le confiere una mayor viscosidad que el biodiesel estándar (Conceição, et al.,

Introducción

2007; Auld et al., 2009). El ácido ricinoleico se ha empleado también en tiras sanitarias por su efecto bactericida (Viera et al., 2000).

2.3.-Tocoferoles

2.3.1.-Definición y estructura

Los tocoferoles son compuestos liposolubles que junto a los tocotrienoles y el plastocromanol-8 forman parte de un grupo amplio de moléculas químicas denominadas tococromanoles (Kamal-Eldin, 2005) que se describen, en su forma pura, como sustancias viscosas amarillentas que se descomponen con facilidad en presencia de luz, oxígeno, pH alcalino y ciertas trazas de minerales como hierro y cobre (Blanco, 2001). Son moléculas de naturaleza anfipática cuya estructura está formada por dos partes, una polar que es el anillo cromano formado por un ciclo fenólico y un heterociclo con un átomo de O, y otra apolar que es una larga cadena isoprenoide denominada fitil (Caretto et al., 2010). Los tocoferoles poseen una cadena fitil saturada mientras que los tocotrienoles la presentan insaturada con 3 dobles enlaces (Brigelius-Flohé et al., 2002). Según la posición y número de los grupos metilo (-CH₃) que ocupan el anillo de cromano, existen diferentes tipos de tocoferoles y tocotrienoles (Figura 4) (Brigelius-Flohé et al., 2002, Damodaran et al., 2010). Presentan quiralidad al poseer tres carbonos asimétricos (Jensen and Lauridsen, 2007). Los tocoferoles de origen natural se encuentran en configuración RRR, mientras que los sintéticos tienen esteroisómeros con configuraciones R y S. La configuración es importante ya que únicamente los RRR y 2R esteroisómeros (RSR, RRS, SRR) tienen actividad significativa antioxidante. En la Tabla 4 se designan los cuatro tipos de tocoferoles de origen natural.

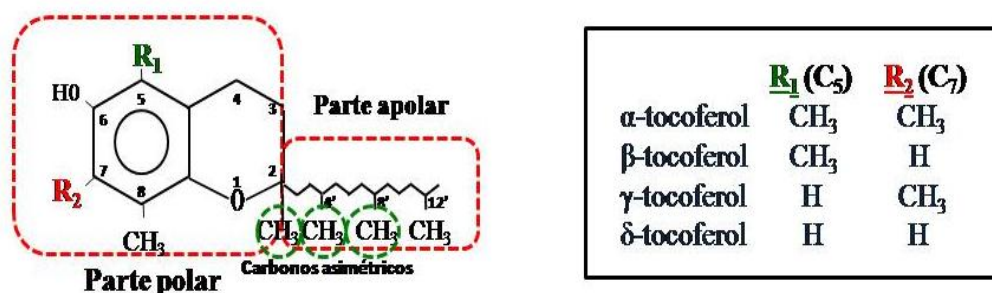


Figura 4. Estructura química de los tocoferoles.

Introducción

Tocoferol	Nomenclatura
α-tocoferol	(2R) 2,5,7,8 tetrametil-2 [(4R),(8R), 4,8,12 trimetiltridecil]-6-cromanol
β-tocoferol	(2R) 2,5,8 trimetil-2 [(4R),(8R), 4,8,12 trimetiltridecil]-6-cromanol
γ-tocoferol	(2R) 2,7,8 trimetil-2 [(4R),(8R), 4,8,12 trimetiltridecil]-6-cromanol
δ-tocoferol	(2R) 2,8 dimetil-2 [(4R),(8R), 4,8,12 trimetiltridecil]-6-cromanol

Tabla 4. Tipos de tocoferoles y su nomenclatura.

En la Tabla 5 se muestran los contenidos medios de tococromanoles para distintos aceites vegetales. El mayor contenido en tococromanoles se da en el aceite de soja con 1141 mg/kg y el menor en el aceite de nuez de palma con 34 mg/kg. Los aceites de girasol, oliva, almendra y cártamo presentan mayores porcentajes en α -tocoferol de 93, 8 %, 91,5 %, 91,0 y 90,6 % respectivamente. El sésamo posee alto porcentaje en γ -tocoferol (95 %). Los tocotrienoles se encuentran presentes en maíz, palma y coco. El plastocromanol-8 se encuentra en la colza y sobre todo en linaza.

Aceites	Tocoferoles				Tocotrienoles				PC8	T.
	α	β	γ	δ	α	β	γ	δ		
Soja	8,9	0,8	63,6	26,7	-	-	-	-	-	1141
Maíz	22,4	0,6	65,6	2,8	3,7	-	4,3	-	-	925
Algodón	49,7	1,0	49,0	0,3	-	-	-	-	-	777
Palma	32,7	-	0,5	-	19,8	-	38,9	8,1	-	767
Girasol	93,8	3,3	2,8	0,1	-	-	-	-	-	675
Colza	29,9	-	67,3	1,7	-	-	-	-	1,1	643
Linaza	0,7	-	73,6	-	-	-	-	-	25,7	553
Cártamo	90,6	1,4	6,6	1,4	-	-	-	-	-	498
Sésamo	1,3	0,3	95,1	3,0	-	-	-	-	-	469
Cacahuete	44,0	2,2	49,6	4,2	-	-	-	-	-	357
Almendra	91,0	-	5,2	3,8	-	-	-	-	-	303
Oliva virgen	91,5	2,0	6,5	-	-	-	-	-	-	153
Coco	11,4	-	8,6	8,6	14,3	2,9	48,6	5,7	-	35
Nuez de palma	38,2	-	-	-	61,8	-	-	-	-	34
T. = contenido total PC8. = plastocromanol 8										
Fuentes: Kamal-Eldin (2005); Velasco et al. (2004c); Chun et al., (2006); Kodad et al. (2006); Gunstone y Harwood (2007); Zou et al. (2012)										

Tabla 5. Contenido medio total de tococromanoles (mg/kg) y concentración de los diferentes tococromanoles (%) en los aceites vegetales más importantes

Introducción

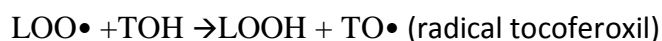
2.3.2.-Actividad antioxidante de los tocoferoles

Se denomina peroxidación lipídica a un conjunto de reacciones de oxidación que afecta a los dobles enlaces de los ácidos grasos tanto de los sistemas biológicos como los de los aceites y grasas que se encuentran en los alimentos. *In vivo*, la oxidación de los ácidos grasos insaturados de las membranas provocan cambios patológicos y daños en las células (Muggli, 1994). *In vitro*, además del desarrollo de olores y sabores desagradables, se generan compuestos nocivos para la salud (Damodaran et al., 2010). El proceso de oxidación lipídica se resume en la Tabla 6.

Etapa	Reacciones	Descripción
Iniciación	$I + LH \rightarrow L\bullet + IH$ (reacción catalizada por calor, luz, trazas de metales, enzimas)	Generación de radicales libre alquilo muy reactivos
Propagación	$L\bullet + O_2 \rightarrow LOO\bullet$ $LOO\bullet + LH \rightarrow LOOH + L\bullet$	Combinación de radicales alquilo con oxígeno produciendo radicales peróxido que propagan la cadena
Terminación	$LOO\bullet + radical \rightarrow \text{dímero}$ $LO\bullet + radical \rightarrow \text{dímero}$	Dimerización de los radicales al consumirse todos los lípidos
LH = lípido I = iniciador		L• = radical alquilo LO• = radical alcoxilo
Fuentes: Damodaran et al. (2010)		

Tabla 6. Proceso de oxidación lipídica.

Para evitar dicho proceso, la molécula de tocoferol (TOH) transfiere su hidrógeno fenólico al radical peróxido lipídico formando radicales muy estables, debido a la deslocalización de su electrón libre (Schneider, 2005):



Tradicionalmente, se estudió la influencia de los tipos de tocoferoles en la estabilidad del aceite, añadiendo tocoferoles en diferentes concentraciones a aceites purificados, es decir, aceites despojados de sus tocoferoles naturales. Los resultados revelan que la eficacia relativa del poder antioxidante de los tocoferoles depende tanto de la concentración como de la temperatura a la que se le somete al aceite. A

Introducción

temperaturas moderadas, α -tocoferol actúa normalmente como mejor antioxidante que γ -tocoferol cuando las concentraciones de los tocoferoles son bajas. Sin embargo, ocurre lo contrario cuando las concentraciones de tocoferoles son elevadas (Fuster et al., 1998; Lampi et al., 1998, 1999; Seppanen et al. 2010). A altas temperaturas γ y δ tocoferol presentan mayor poder antioxidante que α -tocoferol (Lampi et al., 1998; Barrera-Areyano et al., 1999; Warner y Moser, 2009; Seppanen et al., 2010).

Warner et al. (2008) compararon aceites de girasol de tipo medio oleico y alto oleico aumentando, en diferentes niveles, las concentraciones de γ -tocoferol o ambas de γ y δ -tocoferol, concluyendo que la estabilidad del aceite mejoraba sustancialmente después del remplazo parcial o casi total de α -tocoferol por γ - y δ -tocoferol. Marmesat et al. (2008) compararon aceites de girasol de tipo alto palmítico y alto oleico con altos niveles de α ó γ -tocoferol. Los autores encontraron una mayor efectividad del γ -tocoferol, en comparación con α -tocoferol, contra la oxidación lipídica en condiciones de elevadas temperaturas (temperaturas elevadas con objeto de acelerar el deterioro de los aceites). Una conclusión interesante de este estudio fue que no es necesario reemplazar completamente al α -tocoferol para mejorar la estabilidad oxidativa del aceite ya que los autores encontraron que el aceite de girasol con proporciones del 50 % en α -tocoferol y 50 % en γ - y δ -tocoferol presentó una estabilidad oxidativa similar a la del aceite de girasol con proporción del 95 % en γ - y δ -tocoferol. Esto es importante para preservar la buena fuente de vitamina E (Warnet et al., 2008; Marmesat et al., 2008).

2.4.-Fitoesteroles

2.4.1.-Definición, clasificación y estructura

Los fitoesteroles son triterpenos de origen vegetal presentes en las semillas y frutos oleaginosos. Se caracterizan por poseer una estructura química semejante al colesterol. En su síntesis interviene el escualeno que actúa como intermediario. Regulan la fluidez y la permeabilidad de las membranas celulares de las plantas de forma similar a la del colesterol en las membranas de las células de los mamíferos (Hartmann, 1998).

Introducción

A diferencia del colesterol, los esteroides vegetales pueden incluir en su estructura grupos metilo en el carbono 4 dividiéndose en tres subclases: los 4,4 dimetil-esteroides con dos grupos metilo, los 4-monometil-esteroides con uno, y los 4-desmetil-esteroides que no poseen grupos metilo adicionales (Herchi et, al 2009). Las dos primeras subclases son minoritarias y corresponden, principalmente, a intermediarios en la síntesis de los esteroides (Figura 5).

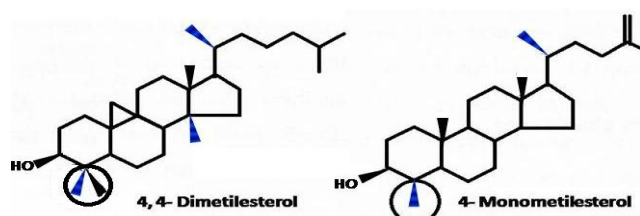


Figura 5. Estructuras de los esteroides vegetales minoritarios

Los 4-desmetil-esteroides poseen un esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno (Figura 6). Presentan un grupo OH en el carbono 3, grupos metilo en los carbonos 10 y 13, y una cadena alifática en el carbono 17 cuya longitud varía de entre 8 y 10 carbonos (Hartmann, 1998).

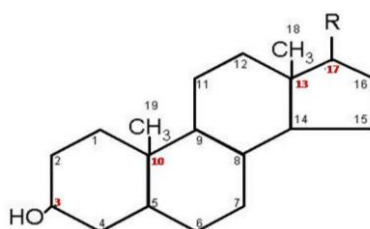


Figura 6. Estructura de los 4-desmetil-esteroides

Podemos distinguir cuatro grupos: *esteroides libres*, *ésteres de esteroides*, *glucósidos de esteroles* y *glucósidos de esteroles acilados*. En función de las insaturaciones existen: a) Δ^5 : poseen doble enlace entre el carbono 5 y 6 del anillo; b) Δ^7 : poseen doble enlace entre el carbono 7 y 8 del anillo; c) $\Delta^{5,22}$: poseen doble enlace entre el carbono 5 y 6 del anillo y también entre el carbono 22 y 23 de la cadena alifática; d) *Fitoestanoles*: son saturados. En la Figuras 7 y 8 se muestran las estructuras de los cuatro grupos de esteroides.

Introducción

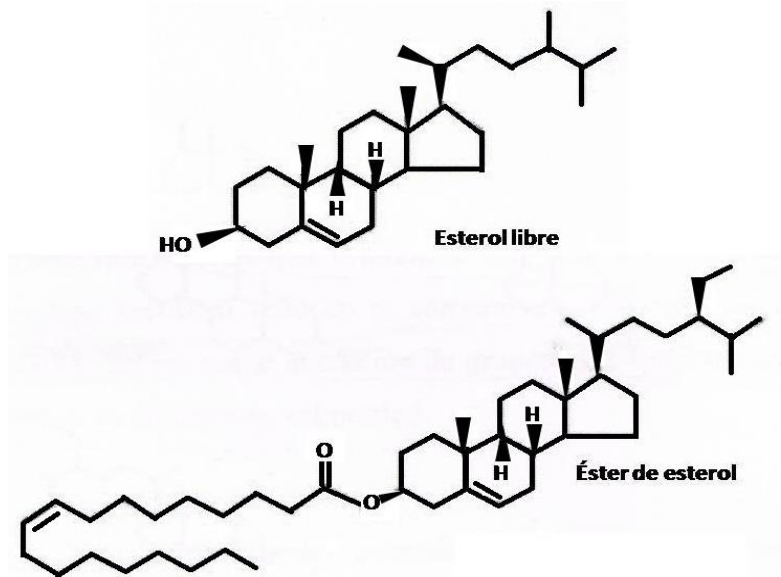


Figura 7. Estructuras de un esteroles libre y un éster de esteroles

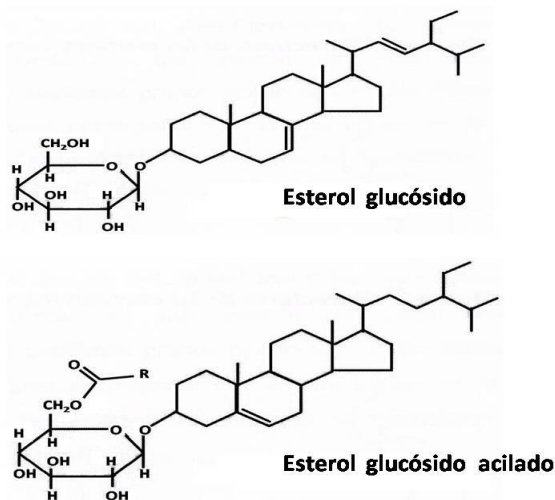


Figura 8. Estructuras de un esteroles glucósido y de un esteroles glucósido acilado

Se han descrito más de 200 tipos de esteroides en distintas especies de plantas siendo los más abundantes el β -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Piironen et al., 2000). La principal diferencia con el colesterol es la existencia de un grupo metilo o etilo en el carbono 24 como se muestra en la Figura 9.

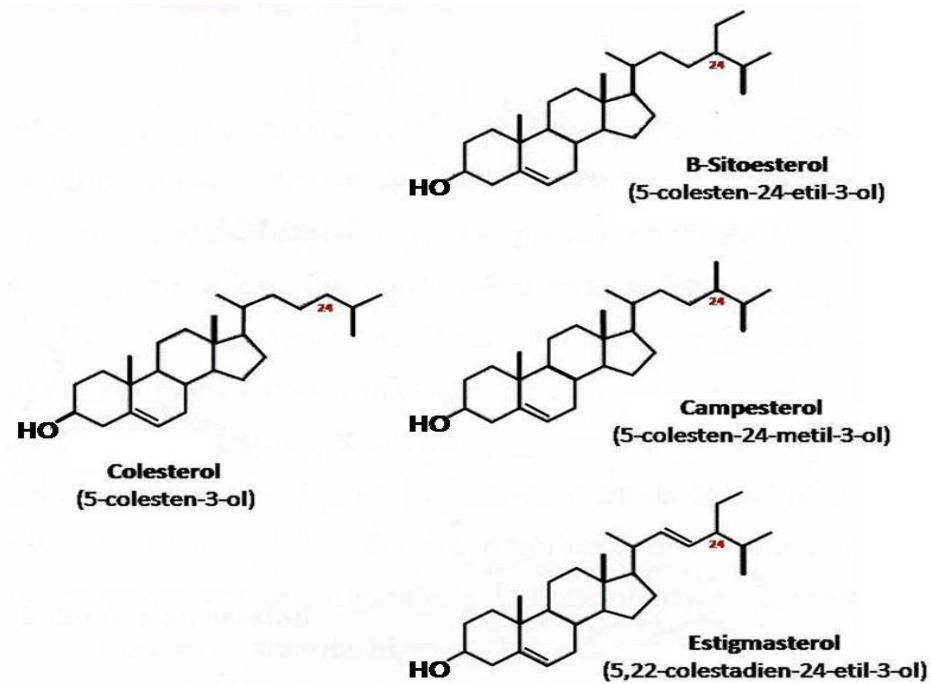


Figura 9. Comparación entre la estructura del colesterol y las estructuras de los esteroides más abundantes en las plantas.

Se ha comprobado que existe una gran variación de esteroides en semillas y frutos ya que su perfil depende de los factores genéticos y ambientales, que se dan en los cultivos (Verleyen et al., 2002b; Vlahakis y Hazebroek, 2000; Zlatanov et al., 2009). La temperatura ejerce una gran influencia sobre los contenidos y composición de fitoesteroides durante el desarrollo de la semilla. Esto se explica como una reacción de las plantas para compensar el efecto de las altas temperaturas sobre las membranas celulares, debido al papel de los fitoesteroides en la regulación de la fluidez y permeabilidad de la membranas (Roche et al., 2006; 2010). En la Tabla 7 se incluyen los perfiles de fitoesteroides de algunos aceites vegetales y el contenido total medio de los mismos. El mayor contenido lo tenemos en el aceite de maíz y el menor en el aceite de palma.

Introducción

Tipo aceite	Bras	Camp	Estig	Sito	Δ^5 -Aven	Δ^7 -Estig	Otros	Total
Maíz	-	20,8	6,6	67,3	2,9	0,5	1,9	11120
Colza	11,0	26,5	0,3	57,0	2,3	2,6	0,3	7099
Sésamo	-	16,6	8,2	61,8	8,7	1,0	3,7	5977
Algodón	-	7,2	1,1	87,4	4,2	-	0,1	4723
linaza	-	25,5	8,1	48,0	15,0	-	3,4	4710
Girasol	-	8,2	7,9	59,7	2,9	14,4	6,9	4436
Cártamo	-	12,2	6,6	52,0	2,2	17,7	9,3	4125
Soja	-	20,2	19,4	54,3	3,4	1,5	1,2	3400
Cacahuete	-	15,4	8,3	66,0	7,9	-	2,4	2443
Oliva virgen	-	2,8	0,9	78,0	17,4	-	1,0	1686
Nuez de palma	-	9,2	10,7	70,2	6,1	0,8	3,0	1310
Coco	-	11,7	13,4	52,9	16,7	-	5,3	975
Palma	-	22,7	8,3	66,8	2,2	-	-	832
Bras = Brasicasterol; Camp = Campesterol; Estig = Estigmasterol; Sito = β - Sitosterol; Δ^5 - Aven = Δ^5 -Avenasterol; Δ^7 - Estig = Δ^7 - Estigmastenol								
Fuentes: Piironen et al. (2000); Vlahakis y Hazebroek (2000); Verleyen et al. (2002a); Kamal-Eldin (2005); Moreau (2005); Phillips et al. (2005); Gül y Seker (2006); Gunstone y Harwood (2007); Normén et al. (2007); Zou et al. (2012).								

Tabla 7. Contenido medio total de fitosteroles (mg/kg) y concentración de los principales fitoesteroles (%) en los aceites vegetales más importantes.

Los esterol-glucósidos son un componente minoritario en los alimentos vegetales, salvo en algunas excepciones, ya que constituyen el 82% del total de los esteroleos en patatas (Jonker et al., 1985), en la soja en torno al 35-40 % de los esteroleos totales (Phillips et al., 2005), alrededor del 20% en cereales (Piironen et al., 2000) y el 3,9% del total en las semillas de girasol (Nyström et al., 2012). Por otra parte, los esterol-glucósidos acilados, representan más del 50% en lecitinas de soja (Bramley et al., 2002), alrededor del 30% en zanahoria y tomate (Moreau et al., 2002) y un 2,6 % en semillas de girasol (Nyström et al., 2012).

2.4.2-Actividad de los fitoesteroles

Entre las acciones atribuidas a los fitoesteroles cabe destacar sus efectos anticancerígenos (Awad y Fink, 2000), antiinflamatorios (Bouic et al., 1999; Bouic, 2001), antiulcerosos (Jayaraj et al., 2003), antioxidantes (Wang et al., 2002), bactericidas y antifúngicos (Smania et al., 2003). Sin embargo la acción más importante se debe a su efecto hipocolesterolémico.

El colesterol puede ser de dos clases: *exógeno*, si procede de los alimentos. Suele encontrarse esterificado con ácidos grasos en el OH del carbono 3; *endógeno*, si procede de la bilis y de la descamación del epitelio intestinal (Ros, 2006). El colesterol exógeno y endógeno está conformado en forma de micelas mixtas que permiten su difusión a través del enterocito (célula del intestino que absorbe las moléculas alimentarias para transportarlas al interior del organismo). Los esteroles y estanoles vegetales desplazan el colesterol de las micelas como paso previo a su absorción por un transportador activo (Plat y Mensink, 2005). Existen tres mecanismos (Figura 10): 1) desplazan por competencia al colesterol de la micela mixta por lo que no es absorbido y se elimina. A diferencia del colesterol, los esteroles presentan escasa absorción en el intestino, por lo que se liberan de la micela en el momento de la transferencia por transporte activo de los ácidos grasos y monoglicéridos siendo finalmente excretados (Ros, 2006); 2) el colesterol llega esterificado al interior del enterocito y se incorpora a los quilomicrones (lipoproteínas intestinales). Los esteroles inhiben la acción de la enzima acil-CoA colesterol aciltransferasa (ACAT) que interviene en la esterificación del colesterol; 3) el colesterol no esterificado en la célula intestinal se excreta al lumen intestinal a través de un transportador tipo ABC (de ATP Binding Casette) que utiliza la energía aportada por hidrólisis de ATP.

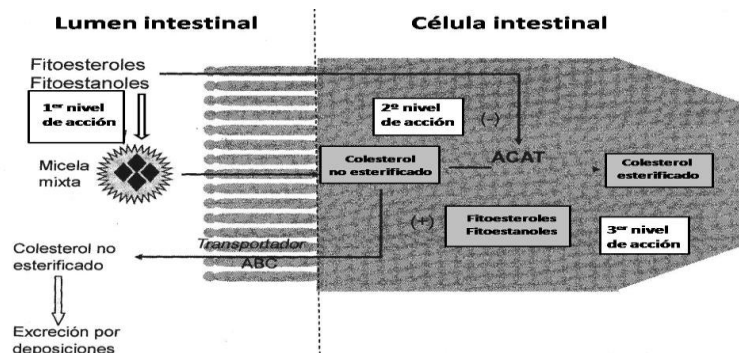


Figura 10. Mecanismos de los fitoesteroles de prevención de la absorción del colesterol en el enterocito (Ros, 2006).

Introducción

Según el programa nacional de educación de colesterol en Estados Unidos (National Cholesterol Education Program), la dosis recomendada como suplemento de esteroides vegetales para reducir el colesterol LDL, y por tanto reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, es de 2 g/día (National Cholesterol Education Program, 2002). Dosis superiores podrían tener cierto efecto sobre los carotenos o vitaminas liposolubles disminuyéndolos en el organismo (Valenzuela, 2004).

Desde hace unos años, los vehículos para la administración de estos compuestos son, además de los alimentos naturales, los alimentos enriquecidos, de modo que una porción diaria proporcione la dosis necesaria de alrededor de 2 g (Palou, 2005). Para facilitar su mezcla con la matriz del alimento, los esteroides vegetales se incorporaron inicialmente a alimentos grasos como las margarinas. Sin embargo, el efecto de reducir el colesterol se mantiene cuando estos se añaden a alimentos pocos grasos como lácteos desnatados y zumos (Katan et al., 2003). Existen actualmente alimentos como leche, yogurt, cereales a los que se han agregado esteroides vegetales en su composición (Pintó, 2006). Las margarinas manufacturadas, con aceites vegetales, sin colesterol, sin ácidos grasos trans y con alto contenido en ácidos grasos ω -3 y ω -6, son consideradas nutricionalmente muy saludables al estar además enriquecidas con fitoesteroides (Valenzuela et al., 2010).

3.-Cultivos oleaginosos

Esta tesis aborda el estudio y puesta a punto de métodos de análisis aplicados a cuatro cultivos oleaginosos: girasol, cártamo ricino, almendro,. A continuación se describen dichas especies, su importancia económica y la mejora genética de sus aceites. En la Tabla 8, se muestra la producción mundial media de los aceites de las principales especies oleaginosas desde 2007 a 2012.

Introducción

Aceite	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Promedio
Palma	39762	42345	43886	43465	47703	50169	44555
Soja	37507	36043	36404	40265	41556	41205	38830
Colza	17984	19285	21403	22710	22848	22254	21081
Girasol	11279	11131	13169	12916	13423	15215	12855
Cacahuete	5671	5270	5134	5921	5799	5242	5500
Nuez de Palma	4934	5475	5698	5661	5971	6005	5634
Algodón	4998	4813	4641	4843	5182	5271	4875
Coco	3440	3412	3391	3935	3266	3310	3459
Oliva virgen	2755	2643	2647	2991	3036	2903	2829
Maíz	2290	2332	2287	2309	2380	3278	2329
Sésamo	1053	984	1023	1003	1215	1201	1096
Linaza	612	546	504	544	535	540	547
Cártamo	144	161	137	127	134	154	143
Fuente: FAOSTAT (2013)							

Tabla 8. Producción mundial de aceite ($\times 10^3$ toneladas) de las principales especies de oleaginosas desde 2007 a 2012.

3.1.-Girasol

3.1.1-Descripción de la planta e importancia económica

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una planta anual con gran capacidad de adaptación a los recursos hídricos gracias a su potente sistema radicular que absorbe agua y minerales del suelo (Connor y Hall, 1997). La inflorescencia, denominada capítulo, está formada por numerosas flores situadas en un receptáculo discoidal. Existen dos tipos de flores: las flores liguladas son asexuadas; las flores tubulosas, situadas en el centro del capítulo, son hermafroditas. Los capítulos jóvenes presentan heliotropismo, que cesa en el momento que se desarrollan las flores, orientándose únicamente hacia la dirección de salida de sol. La polinización en su mayor parte es entomófila y la realizan en general las abejas que son atraídas por el néctar segregado por las flores (Fick, 1989). El fruto presenta un pericarpio duro y fibroso y es de tipo aquenio que normalmente se denomina semilla. Rusia destaca entre los principales

Introducción

países donde se produce el girasol. Le siguen Ucrania, Argentina, China, y Francia (Tabla 9).

País	Producción total (x 10 ³ T)	Area cultivada (x 10 ³ Has)	Rto.(Kg/ha)
Rusia	6876	5992	1185
Ucrania	6305	4362	1541
Argentina	3310	1967	1681
China	1985	919	2139
Francia	1620	664	2440
EE.UU.	1276	777	1640
Bulgaria	1257	710	1746
Hungría	1241	548	2250
Rumanía	1210	860	1390
India	870	1291	678
Turquía	1155	602	1904
España	845	750	1131
Myanmar	598	719	824
África del Sur	659	504	1261
Total mundial	34169	24237	1403

Fuentes: FAOSTAT (2013)

Tabla 9. Promedio de producción de semillas, superficie cultivada y rendimiento de girasol desde 2007 a 2012.

3.1.2.-Mejora genética de componentes de calidad del aceite de girasol

El objetivo prioritario de mejora de la calidad de los aquenios de girasol ha sido la reducción de su contenido en cáscara que produjo un menor contenido en fibra e incrementó los contenidos en grasa y proteína. El aceite representa el 80% del valor económico del cultivo (Fernández-Martínez et al., 2009).

El girasol estándar, presenta una media de 30% de oleico y 60% de linoleico considerando valores medios de ambientes cálidos y fríos (Fernández-Martínez et al., 2009) (Tabla 3). En Rusia, Soldatov (1976) obtuvo por mutagénesis la variedad “Pervenets” con alto contenido en ácido oleico (70-80%). A partir de cruzamientos y selección utilizando esta variedad se obtuvieron líneas puras con niveles de oleico de 80-90% (Fernández-Martínez et al., 1987), 6-9% de linoleico y 3-4 % de palmítico y

Introducción

esteárico. El aceite de girasol alto oleico es menos susceptible a los cambios oxidativos que tienen lugar durante la refinación, el almacenaje o fritura. También, se han desarrollado líneas de girasol con alto contenido en ácidos grasos saturados. Por mutagénesis, se obtuvieron mutantes con altos niveles de ácido palmítico (>25%) (275HP, Ivanov et al., 1988; CAS-5, Osorio et al., 1995). Además, utilizando mutagénesis sobre una línea alto oleico, (Fernández-Martínez et al., 1997) se aisló un doble mutante (CAS-12) con alto contenido de ácido palmítico (30%) y niveles incrementados de ácido oleico (56%). También se obtuvieron los mutantes CAS-8, CAS-4 y CAS-3 con niveles de >10%, >13% y >25% de ácido esteárico (Osorio et al., 1995) y la línea mutante CAS-14 con muy alto contenido en ácido esteárico (>37%) (Fernández-Moya et al., 2002). Estas líneas son importantes para los procesos elaboración de margarinas (especialmente la líneas de alto esteárico que tiene un efecto neutro en relación al nivel de colesterol en sangre) ya que son semisólidos a temperatura ambiente y pueden ser utilizados directamente para estos usos sin necesidad de procesos previos de hidrogenación (Fernández-Moya et al., 2002). Se han desarrollado además líneas con bajos niveles de ácidos grasos saturados (7% palmítico + esteárico frente a 10% del girasol estándar y 2,33 % del total de ácidos grasos saturados) (Vick et al., 2002; Gerdes et al., 2012).

En cuanto a los tocoferoles, el principal tocoferol presente en el girasol, con un porcentaje del 94 %, es α -tocoferol (Tabla 4). Mediante la evaluación de colecciones de germoplasma de girasol cultivado y especies silvestres se aislaron líneas con perfil modificado de tocoferoles: con niveles elevados de β -tocoferol (50% del total de tocoferoles en la semilla), con alto contenido de γ -tocoferol (>85%) y mediante cruces entre estas líneas, 84% de γ y 8% de δ -tocoferol (Demurin, 1993; Demurin et al., 1996). También mediante evaluación de germoplasma, y aplicación de mutagénesis (Velasco y Fernández-Martínez, 2003; Velasco et al., 2004b) se desarrollaron líneas con niveles elevados de β -tocoferol (>30%) y niveles elevados de γ -tocoferol (>95%). Cruzamientos entre plantas de estas líneas dieron lugar a niveles más elevados de β -tocoferol (>75%) y δ -tocoferol (>65%) (Velasco et al., 2004b).

Introducción

3.2.-Cártamo

3.2.1.-Descripción de la planta e importancia económica

El cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) es una planta oleaginosa anual. Posee un sistema de raíces que le permite extraer el agua y los nutrientes de capas profundas del suelo (Knowles, 1989; Weiss, 2000), por lo que es adecuado como cultivo de secano. La planta es muy ramificada y cada rama puede alojar de uno a cinco capítulos (Singh y Nimbkar, 2007) que pueden contener de 20 a 250 flores. Las hojas son generalmente muy espinosas y varían mucho entre variedades y en la misma planta. La floración dura alrededor de un mes y el color de las flores puede ser amarillo, anaranjado o blanco. El polen de cártamo es transportado por insectos. El fruto es de tipo aquenio y puede presentar vilano (Knowles, 1989). El cártamo es un cultivo oleaginoso cuya importancia en la producción y comercio mundial de aceites vegetales es limitada. En la Tabla 10, se muestra el área cultivada y producción de los principales países productores. La India es el principal país productor seguido por EEUU, México y Kazajistán.

País	Producción total(x 10 ³ T)	Área cultivada(x 10 ³ Has)	Rto. (Kg/ha)
India	189	290	650
EE.UU.	101	69	1504
México	110	90	1434
Kazajistán	75	108	749
Argentina	64	87	746
China	33	22	1518
Kirguistán	12	14	889
Turquía	15	12	1358
Tanzania	11	24	484
Etiopía	7	8	966
Australia	5	9	549
Canadá	5	3	1311
Uzbekistán	3	6	539
Total mundial	654	745	881

Fuentes: FAOSTAT (2013)

Tabla 10. Promedio de producción de semillas, superficie cultivada y rendimiento de cártamo desde 2007 a 2012.

3.2.2.-Mejora genética de la calidad

Los aspectos más importantes dentro de la mejora genética de calidad de cártamo han sido la composición de ácidos grasos, el incremento de tocoferoles totales y la modificación del perfil de tocoferoles (Velasco et al., 2005). El cártamo estándar tiene alto contenido en ácido linoleico superior al 70% (Tabla 3). Se han desarrollado líneas con alto oleico (64-83%), con muy alto oleico (87-91%) y líneas con muy alto linoleico (85-90%) (Knowles, 1989; Fernández-Martínez et al., 1993). Estos tipos contienen bajo porcentaje de ácidos grasos saturados. Se han identificado también líneas con alto palmítico (>10%) (Fernández-Martínez et al., 1993), así como de niveles elevados de ácido esteárico (Knowles, 1989) y niveles elevados de ambos ácidos grasos saturados (21,3%) (Hamdan et al., 2009). En cuanto a tocoferoles, Velasco y Fernández-Martínez (2004) desarrollaron las líneas CR-34 y CR-81 de cártamo con niveles elevados de tocoferoles en semilla, principalmente α -tocoferol. Asimismo, se ha conseguido aislar la línea mutante natural IASC-1 que contiene un porcentaje mayor de 90 % de γ -tocoferol en sus semillas (Velasco et al., 2005).

3.3.-Ricino

3.3.1.-Descripción de la planta e importancia económica

El ricino (*Ricinus communis* L.) crece en zonas tropicales, subtropicales y mediterráneas. El fruto es una cápsula trilobular con tres semillas. La altura de la planta varía de entre uno a varios metros. Es una planta perenne y de día neutro. (Weiss, 2000; Curtis et al., 2008; Fernández-Martínez y Velasco, 2012). El tallo principal de la planta termina en un racimo primario (inflorescencia), que normalmente es de mayor tamaño y florece el primero. También se forman racimos secundarios y terciarios que del mismo modo van produciendo semillas. A lo largo de las inflorescencias existen flores masculinas (estaminadas) y flores femeninas (pistiladas) (Weiss, 2000; Curtis et al., 2008). A pesar de que el ricino como cultivo oleaginoso contribuye sólo al 0,5 % de la producción mundial de grasas y aceites vegetales (Ogunniyi, 2006), su aceite es muy utilizado en la industria. La Tabla 11 recoge los datos de la producción mundial de semillas de ricino. La producción está concentrada en India, China, Brasil y

Introducción

Mozambique, que juntos representan más del 90% del superficie cultivada y producción.

País	Producción total (x 10 ³ T)	Área cultivada (x 10 ³ Has)	Rto. (Kg/ha)
India	1425	944	1481
China	175	205	852
Brasil	92	154	575
Mozambique	58	174	332
Paraguay	10	8	1173
Tailandia	12	13	887
Etiopía	7	7	1000
África del sur	6	8	695
Vietnam	6	7	780
Angola	4	16	232
Tanzania	3	6	544
Kenia	3	13	230
Ecuador	3	2	1500
Madagascar	2	7	350
Total mundial	1818	1587	1128

Fuentes: FAOSTAT (2013)

Tabla 11. Promedio de producción de semillas, superficie cultivada y rendimiento de ricino desde 2007 a 2012

3.3.2.-Mejora genética de la calidad y usos del aceite

En los últimos años, la demanda del ricino ha crecido mucho en cuanto a lo que supone la fabricación de biocarburantes como el biodiesel. Sin embargo, el ácido ricinoleico le confiere gran viscosidad, siendo necesarios añadir aditivos para disminuirla (Conceição, et al., 2007). El descubrimiento de un mutante, en el que el ácido oleico reemplaza al ricinoleico alcanzando el 78 % del total de ácidos grasos (Rojas-Barros et al., 2004), ha abierto nuevas perspectivas para el uso del aceite de ricino para biodiesel (Fernández-Martínez y Velasco, 2012).

Introducción

3.4.-Almendro

3.4.1.-Descripción de la planta e importancia económica

El almendro, *Prunus amygdalus* Batsch, es un árbol caducifolio de zonas cálidas perteneciente a la familia de las rosáceas. La mayor parte del cultivo del almendro se realiza en condiciones de secano, sobre suelos arenosos. La especie presenta una morfología muy heterogénea (Felipe, 2000). La flor aparece solitaria o en grupos de dos o cuatro. Es una flor típica rosácea, completa y pentámera. La polinización es entomófila y la realizan las abejas. El fruto está constituido por el exocarpio, que se desprende en la madurez, y el endocarpio, en cuyo interior se encuentra la semilla que posee dos tegumentos envolventes, la testa y el tegmen (Felipe, 2000). En la Tabla 12 aparecen los diez países con una mayor cantidad de producción de almendra en el periodo 2007-2012. Estados Unidos y España ocupan los primeros puestos en producción total y área cultivada.

País	Producción total (x 10 ³ T)	Área cultivada (x 10 ³ Has)	Rto. (Kg/ha)
EE.UU.	1129	276	4105
España	232	574	404
Irán	138	89	1656
Italia	111	80	1378
Marruecos	100	127	843
Siria	94	43	2168
Túnez	56	174	324
Turquía	47	18	3082
Argelia	44	40	1150
Grecia	39	15	2500
Afganistán	42	12	3533
China	34	12	2737
Líbano	31	6	5389
Libia	29	5	591
Total mundial	2266	1622	1398

Fuentes: FAOSTAT (2013)

Tabla 12. Promedio de producción de semillas, superficie cultivada y rendimiento de almendros desde 2006 a 2011).

3.4.2.-Mejora genética de caracteres de calidad del fruto y del aceite

En el pasado, la calidad de la semilla de almendra dependía únicamente de parámetros físicos como forma, tamaño, etc. (Socias i Compani et al., 2008). La composición química de la almendra no se ha tenido en cuenta hasta hace poco desde el punto de vista de la mejora genética. Sin embargo se va avanzando en dicho conocimiento y será posible la selección de nuevas variedades con mejores características (Kodad et al., 2005, 2006; Socias i Compani et al., 2008). La relación entre el ácido oleico y linoleico, se considera un factor importante en la evaluación de la calidad de la semilla (Kester et al., 1993). El alto contenido en α -tocoferol se considera también un parámetro de interés en la valoración de la calidad de la semilla (Kodad et al., 2006).

4.-Desarrollo de variabilidad para componentes de calidad: Importancia de métodos rápidos de cribado para la evaluación de estos componentes

La mejora genética de las plantas oleaginosas para contenido de aceite y componentes de calidad requiere la evaluación de la variación existente en colecciones de germoplasma de las distintas especies y de la obtenida por mutagénesis, así como de la evaluación de poblaciones segregantes en los programas de mejora. Esto precisa del análisis de un número elevado de muestras con objeto de identificar genotipos con la composición alterada (Velasco y Fernández-Martínez, 2002). Un requisito indispensable para esta evaluación, es el desarrollo de métodos rápidos, fiables y no destructivos. Por ejemplo, la *espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS)* presenta la ventaja de que permite analizar varios caracteres de forma simultánea, entre ellos el aceite y el perfil de ácidos grasos del mismo (Pérez-Vich et al., 1998; Fassio y Cozzolino, 2004), además de ser una técnica no destructiva. En cuanto a los componentes de calidad, como perfil de ácidos grasos y tocoferoles, un factor a considerar es que estos suelen estar controlados por el genotipo del embrión (Velasco y Fernández-Martínez, 2002) y para llevar a cabo la selección es importante el análisis de semillas individuales siempre que se puedan analizar de forma no destructiva. Esto es posible utilizando la *técnica de la media semilla* que consiste en el análisis de una porción de la semilla distal al embrión y sembrar la otra mitad. Esta técnica se ha empleado para el análisis de ácidos grasos en las semillas oleaginosas como el girasol (Conte et al., 1989) y el ricino (Rojas-Barros et

Introducción

al., 2004) y ha sido adaptada para análisis no destructivo de tocoferoles (Velasco et al., 2005). Un método importante en la determinación de ácidos grasos es la transmetilación y la extracción de los esteres metílicos en un solo paso (Garcés y Mancha, 1993) para su posterior análisis por cromatografía gaseosa.

5. Técnicas instrumentales utilizadas en el análisis de calidad del aceite

5.1.-Cromatografía

5.1.1.-Introducción

La cromatografía es una técnica de análisis químico basada en el principio de adsorción selectiva, que es la retención física o química de las sustancias de una mezcla en los sitios activos de la superficie de un sólido o de un líquido dispuesto sobre otro sólido que actúa como soporte (Cela et al., 2002). El sólido ó líquido, en donde se retienen las sustancias, constituye la *fase estacionaria*. La mezcla de las sustancias viaja a través de un fluido que constituye la *fase móvil*.

5.1.2.-Cromatografía en capa fina (TLC)

En esta técnica, la *fase estacionaria* es una capa fina de gel de sílice con propiedades adsorbentes, dispuestas sobre un soporte poroso que denominamos *placa*. La *fase móvil* será la mezcla de disolventes adecuada. La sustancia de interés se adherirá a la fase estacionaria y se moverá con la fase móvil estableciéndose un reparto entre la la fase estacionaria y la fase móvil que denominamos equilibrio de distribución (K_D). Normalmente, se coloca la placa con la mezcla a separar en la cámara de elución que contiene a la fase móvil. La cámara se cierra para mantener en contacto ambas fases en ambiente constante de fase vapor. La fase móvil subirá por capilaridad e irá arrastrando a las moléculas de la mezcla que se moverán según la afinidad que muestren por la fase estacionaria y según la polaridad. La fase estacionaria retiene con más fuerza a las moléculas con mayor polaridad. Estas avanzan a menor velocidad. Las moléculas de menor polaridad avanzan con mayor velocidad, arrastradas por la fase móvil (Figura 11). Se define el factor de retención (R_f) como el cociente entre la distancia recorrida por el soluto y la distancia recorrida por la fase móvil (Cela et al., 2002).

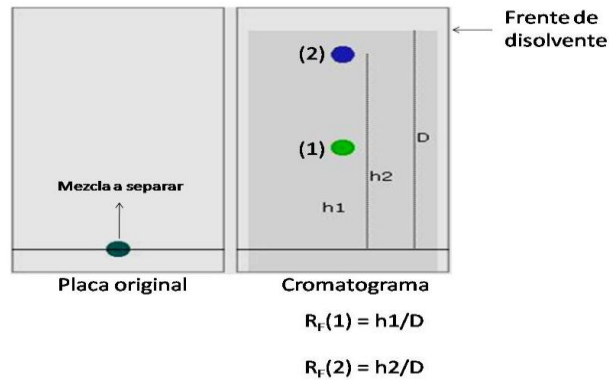


Figura 11. Separación de los componentes mediante TLC

5.1.3.-Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida es una técnica para separar compuestos con baja volatilidad. Un instrumento HPLC posee los siguientes elementos (Figura 12) (Rubinson, 2001):

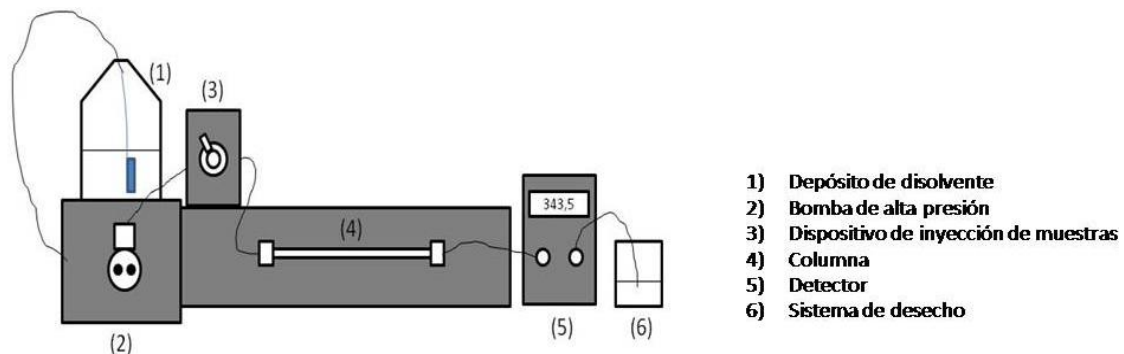


Figura 12. Diagrama esquemático de un instrumento HPLC.

La muestra se introduce a través del inyector en el circuito de la fase móvil. La bomba de alta presión permite que la fase móvil se mueva a velocidad adecuada con flujos entre 0,5 y 4 ml/min hacia la columna. La columna contiene el material de relleno necesario para separar los compuestos esperados (fase estacionaria). La fase móvil sigue su curso hasta el detector y finalmente se elimina en un bidón de residuos. El detector se conecta a un ordenador y este recoge las señales eléctricas que se generan para crear el cromatograma, que es una medida de la absorbancia frente al tiempo. Entre sus elementos podemos distinguir el tiempo cero, línea base (ruido), picos. Una vez obtenidos los picos en el cromatograma se obtiene el área de pico mediante la integración de los mismos. El área es directamente proporcional a la concentración del

Introducción

compuesto. Empleamos el tiempo de retención como parámetro cualitativo. Sin embargo, en ocasiones, es poco fiable ya que depende de la temperatura de la columna, velocidad de flujo y composición de la fase estacionaria. Un parámetro más fiable es el tiempo de retención relativo que mide la relación entre los tiempos de retención de dos picos.

El régimen de trabajo en HPLC se lleva a cabo a través de dos formas (Willard et al., 1988). En el *régimen de fase normal*, la fase móvil es apolar (pentano, hexano, heptano, diclorometano, etc) y la fase estacionaria es polar (ej: gel de sílice). En dicho régimen los compuestos más apolares se retienen menos en la fase estacionaria y salen antes arrastrados por la fase móvil. Lo contrario ocurre en el *régimen de fase reversa*, donde la fase móvil es polar y la fase estacionaria es apolar. En HPLC, es muy común emplear mezclas de más de una fase móvil. Así por ejemplo, en el régimen de fase reversa, el agua es un eluyente con mínimo poder de elución y debe mezclarse con disolventes menos polares para eluir los solutos fuertemente retenidos en la fase estacionaria apolar. La mezcla de disolventes en la fase móvil permite seleccionar la fuerza y selectividad, necesarias para una determinada separación cromatográfica, con mayor flexibilidad. La fuerza de desplazamiento total de una mezcla de disolventes viene dada por la siguiente expresión (Valcárcel y Gómez, 1988): $S_T = S_1\Theta_1 + S_2\Theta_2 + \dots = \sum_{i=1}^n S_i\Theta_i$. Siendo: S_i , la contribución del disolvente a la fuerza de desplazamiento total (Tabla 13); Θ_i , la proporción, en tanto por uno, del disolvente en la mezcla. Por ejemplo, en una fase móvil (en régimen reverso) de composición 60:40 metanol/agua, la fuerza de desplazamiento total será: $S_T = S_{\text{metanol}}\Theta_{\text{metanol}} + S_{\text{agua}}\Theta_{\text{agua}} = 2,6*0,6 + 0,0*0,4 = 1,56$. Se denominan *disolventes isoeluotrópicos* a aquellos que presentan idéntica fuerza de desplazamiento pero diferente selectividad. Así pues, si se desea mejorar la selectividad obtenida con la mezcla 60:40 metanol/agua con una fuerza de 1,56, hay que sustituir el metanol por otro disolvente, como por ejemplo el acetonitrilo teniendo, de este modo: $S_T = 1,56 = 3,2*\Theta_{\text{acetonitrilo}} + 0,0*\Theta_{\text{agua}}$; obteniendo: $\Theta_{\text{acetonitrilo}} = 0,49$. Por lo tanto, una mezcla isoeluotrópica con la de 60:40 metanol/agua, de diferente selectividad, es 49:51 acetonitrilo/agua. En cuanto a los modos de flujo de la fase móvil, se utilizan dos: *isocrático*, en el que la fase móvil se mantiene constante a lo largo del análisis; *gradiente*, se varía la composición de la fase móvil a lo largo del análisis (Rodríguez, 2006). A pesar de los cambios de selectividad en mezclas binarias de fase móvil, ocurre con frecuencia que los mismos no son suficientes para lograr una correcta

Introducción

discriminación cromatográfica cuando se analizan mezclas complejas. Por ello, se trabaja en modo de flujo de gradiente. Otro sistema consiste en el empleo de mezclas ternarias y cuaternarias de fase móvil isoeluotrópicas.

Disolvente	Factor estadístico de fuerza de disolvente (S_i)	
	Fase normal	Fase reversa
Agua	10,2	0,0
Metanol	5,1	2,6
Acetonitrilo	5,8	3,2

Fuente: Valcárcel y Gómez (1988)

Tabla 13. Contribución de varios disolventes a la fuerza de desplazamiento de la fase móvil

Para llevar a cabo la identificación cualitativa, se compara el tiempo de retención de cada uno de los picos, con los tiempos de retención de los estándares de referencia. De forma cuantitativa utilizamos el área que es proporcional a la concentración de productos ($\text{Área} = K.C$; donde K es la constante y C son las concentraciones). Ejemplos de métodos cuantitativos a través del área son: las curvas de calibrado, donde obtenemos la concentración de la muestra de interés a través de interpolación de curvas señal frente a concentración de estándares; en función de la suma total de áreas en porcentaje; a través de los estándares internos, que poseen una concentración conocida y mediante su área se calcula el valor de la constante K. De otra manera, la identificación y cuantificación se realiza con detectores selectivos que se encuentran acoplados al equipo. Entre ellos la espectrometría de masas (ES). El espectrómetro de masas permite identificar especies a la salida de la columna. Dicha técnica posee una mayor sensibilidad y selectividad a concentraciones traza (ppm y ppb), además es sencilla y rápida (Kotretsou y Koutsodimou, 2006; Walorczyk, 2007; Fernández-Moreno et al., 2008).

5.1.4.-Cromatografía gaseosa (CG)

Al igual que HPLC, la cromatografía de gases es también un método de alta resolución (McNair et al., 2009). La diferencia más importante es que CG solo puede hacer frente a sustancias volátiles, con temperaturas de ebullición inferiores a 350°C, o muestras que puedan ser derivatizadas en un producto con punto de vaporización a estas

Introducción

temperaturas. Además, los analitos deben ser estables a dichas temperaturas. En cromatografía de gases, la fase móvil, que está en estado gaseoso y que se le denomina gas portador, transporta al analito a lo largo de la columna (Harris, 2007). Los gases portadores deben ser inertes con la fase estacionaria y con los analitos. Los más utilizados son el helio, nitrógeno e hidrógeno (Figura 13).

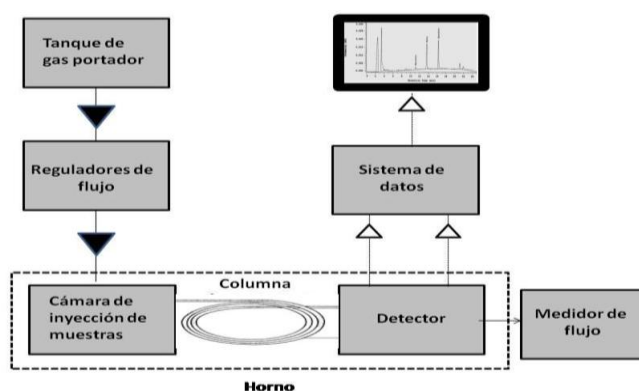


Figura 13. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases (Adaptado de Skoog et al., 2009).

La muestra se introduce a través de un séptum en un inyector que se encuentra a alta temperatura. En este inyector la muestra se evapora y el gas portador lo transporta a la columna que contiene la fase estacionaria. Los distintos analitos van llegando separados al detector como consecuencia de su interacción con la fase estacionaria (Harris, 2007). Dicho detector ha de estar a mayor temperatura que la columna para que los analitos que salen de esta no se condensen al pasar por el detector. La metodología utilizada para cualificar y cuantificar es similar a HPLC. Uno de los problemas más extendidos de la cromatografía de gases es la degradación de la fase estacionaria, provocando su ruptura y haciendo que la línea base del cromatograma presente una tendencia ascendente a medida que avanza el cromatograma.

En cuanto a columnas, podemos distinguir: *columnas empaquetadas* (1-6 m de longitud y diámetro de entre 2-6 mm), están llenas de partículas finas (0,25-0,15 mm de diámetro) que hacen la función de soporte sólido ya que están cubiertas por una fina capa de líquido (0,05- 1 μm) no volátil; y *columnas capilares* (longitudes entre 10 y 100 m y diámetro entre 0,1-0,6 mm), las más utilizadas son las de WCOT (pared interna recubierta de fase estacionaria) y SCOT (pared interna cubierta por un soporte a donde

Introducción

se le une a fase estacionaria). Las columnas capilares se utilizan para muestras complejas y presentan una serie de ventajas: tienen mayor resolución al ser más largas; los tiempos de análisis son más cortos ya que al poseer menor cantidad de fase estacionaria los analitos se retienen menos; poseen mayor sensibilidad ya que la cantidad de muestra utilizada es del orden de nanogramos, mientras que en las empaquetadas es del orden de microgramos; los límites de detección son mayores y se obtienen picos estrechos y bien definidos (Skoog et al. 2009).

Para programar la temperatura del horno, existen dos opciones: *cromatografía isoterma*., la temperatura se mantiene constante a lo largo de todo el cromatograma. En este caso, los compuestos de temperatura de ebullición parecidos serán difícilmente separados y se obtendrán picos pequeños y anchos dando lugar a una resolución muy baja; *cromatografía con temperatura programada*: se va aumentando la temperatura a medida que transcurre el cromatograma. Cuando se utiliza esta opción se pueden obtener mejores resoluciones y separaciones de los compuestos. La programación de la temperatura es fundamental sobre todo cuando la mezcla a separar es muy compleja. (Rodríguez, 2006).

El detector debe poseer un tiempo de respuesta corto, selectividad y sensibilidad adecuadas, y alta reproducibilidad sobre un amplio rango de concentraciones. Entre los detectores más utilizados está el de ionización de llama (Flame Ionization Detector, FID). El gas portador procedente de la columna, se mezcla con hidrógeno que sale por una tobera. En el extremo de esta, se aporta aire y forma un llama que quema e ioniza a los compuestos. Se establece una diferencia de potencial entre dos electrodos ya que el analito ionizado origina un paso de corriente (Holm, 1999).

5.1.5.-Derivatización en cromatografía gaseosa

La derivatización es el proceso de modificación química de los grupos funcionales del analito para permitir su análisis mediante CG ya que se obtienen especies más volátiles evitando el uso de temperaturas demasiado altas que puedan descomponer los analitos en el equipo, o la precipitación indeseada en la columna alterando los resultados obtenidos. Otra razón, es la inserción de un grupo funcional que aumenta la resolución en la detección (Cela et al., 2002). Los compuestos que

Introducción

principalmente se derivatizan son aquellos que poseen grupos funcionales polares (hidrógenos activos). En la siguiente Tabla se muestran las reacciones de derivatización más importantes.

Tipo	Reacción	Objetivo	Ej. de aplicación
Silanización	Reemplazo del hidrógeno de un alcohol por un grupo alquilsililo. $\text{R-OH} + \text{CH}_3\text{-C=N-[Si(CH}_3\text{)}_3\text{]}_2\text{O}^* \rightarrow \text{R-O-Si(CH}_3\text{)}_3$	Disminuir polaridad y aumentar la volatilidad	Determinación de fitoesteroles
Alquilación	Esterificación de un ácido con un alcohol en presencia de catalizador. $\text{R-COOH} + \text{R}'\text{-OH} \xrightarrow[\text{BF}_3]{\text{H}^+} \text{R-COOR}'$	Disminuir polaridad y aumentar la volatilidad	Determinación de ácidos grasos
Acilación	Inserción de un grupo acilo en un alcohol o amina. $\begin{array}{l} \text{R-OH} + (\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O} \xrightarrow{\text{Piridina}} \\ \text{R-O-CO-CH}_3 + \text{CH}_3\text{COOH} \\ \text{R-NH}_2 + (\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O} \xrightarrow{\text{Piridina}} \\ \text{R-NH-CO-CH}_3 + \text{CH}_3\text{COOH} \end{array}$	Disminuir polaridad e introducir grupos aceptores de electrones mejorando la detección en el análisis	Derivatización de muestras destinadas a confirmar abusos en drogas
* N,O-bis (trimetilsililacetamida) (BSA) en presencia de piridina			
Fuentes: Valcárcel y Gómez (1988); Garcés y Mancha (1993); Toivo et al. (2000); Amar et al (2008).			

Tabla 14. Principales tipos de reacciones de derivatización

5.2.-Termoestabilidad de los aceites

5.2.1.-Introducción

Las reacciones de oxidación que tiene lugar en aceites, grasas, o alimentos es compleja y origina un gran número de compuestos causando la pérdida de la calidad organoléptica y disminuyendo su valor nutritivo (Lee et al., 2004a; Naz et al, 2005). Debido a esto, se buscan formas eficaces para preservar los aceites y las grasas, así como métodos que permitan conocer el grado de oxidación del aceite.

5.2.2.- Estimación de la estabilidad oxidativa

La estabilidad oxidativa se define como la resistencia a la oxidación bajo condiciones establecidas (Guillén y Nerea, 2002; Velasco et al., 2004a). Se suele estimar mediante el uso de pruebas aceleradas, donde el suministro de oxígeno y las elevadas temperaturas empleadas, permiten una alteración más rápida (Guillén y Nerea 2002; Lee et al., 2004b).

El método Rancimat permite estimar la estabilidad oxidativa mediante la determinación del *período de inducción* (PI), que es el tiempo a partir del cual se empiezan a detectar cambios en la calidad del aceite debido al inicio de las reacciones de oxidación (Velasco et al., 2004a; Gonzaga y Celio, 2006). Se produce la oxidación acelerada de la muestra y el registro constante de los cambios en la conductividad eléctrica del agua, que recoge los compuestos volátiles formados durante la reacción. La mayoría de los productos volátiles formados en la descomposición de hidroperóxidos corresponden al ácido fórmico (Moreno y Larrauri, 1998; Tian y Purnendo, 1999; Daniels et al., 2006). El método Rancimat permite obtener respuestas más precisas que los métodos tradicionales. Presenta como ventaja su automatismo, que hace que no se requiera mucha atención durante el transcurso de la prueba. El aparato consta de dos unidades interconectadas (Figura 14): la primera contiene el bloque calefactor, que permite establecer temperaturas de oxidación comprendidas entre 50 y 220°C; la segunda es la celda de conductividad que controla los parámetros, procesa las señales e imprime el registro.

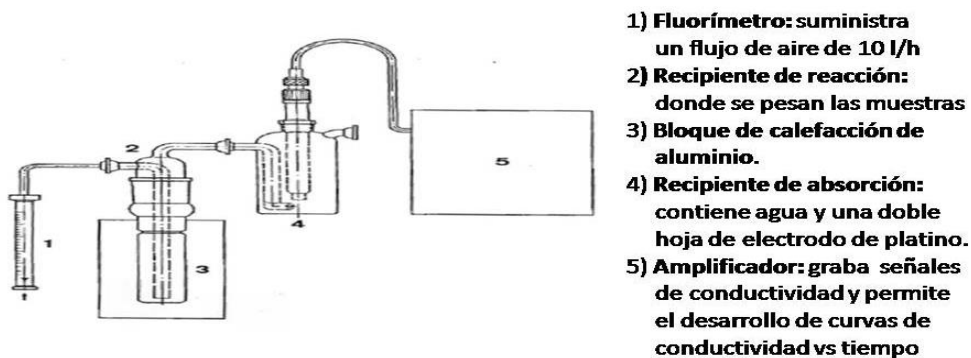


Figura 14. Diagrama de un aparato 617 Rancimat.

En cuanto al procedimiento, se pesa la muestra con exactitud en el recipiente de reacción. Posteriormente, se suministra calor y se pasa una corriente de aire seco que

Introducción

arrastra los compuestos volátiles, generados en la oxidación, hasta la celda de conductividad. Podemos distinguir dos fases en la termooxidación: *fase de inducción*, inicialmente la velocidad de reacción es baja y prácticamente no se forman compuestos de oxidación. Sin embargo, los cambios comienzan a ser detectados; *fase de oxidación*, en esta fase se incrementa la velocidad de reacción apareciendo mayor número de peróxidos y demás compuestos volátiles. El recipiente de absorción, donde se introduce el electrodo, contiene agua desionizada donde se recogen los compuestos volátiles que se desprenden del tubo de reacción. Cuando la temperatura del calefactor se estabiliza comienza la evaluación de la conductividad que se registra de forma continua frente al tiempo. El punto de inflexión de la curva de conductividad registrada (Figura 15) define el final del período de inducción del proceso de oxidación de la muestra y se expresa en horas (Moreno y Larrauri, 1998).

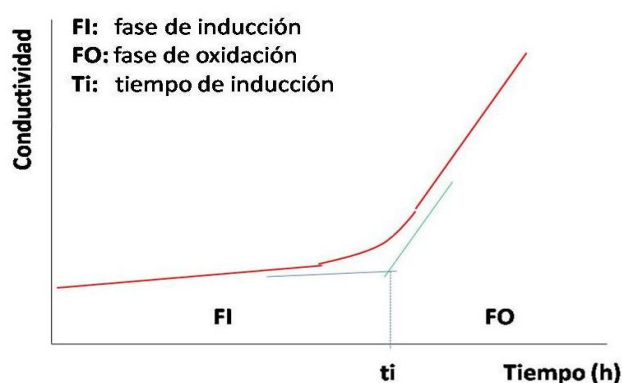


Figura 15. Representación de la variación de la conductividad en función del tiempo

5.3.-Espectroscopia de infrarrojo cercana (NIRS)

5.3.1.-Introducción

La Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano (NIRS) fue desarrollada en 1939, pero no fue hasta 1954 cuando Kaye demostró su potencial con fines analíticos. Actualmente es una técnica precisa y reproducible para el análisis cualitativo y cuantitativo en la industria agroalimentaria, farmacéutica, química, en medicina, medio ambiente, etc. (Osborne et al., 1993; Williams, 2001; McLure, 2003; Batten 2004).

Introducción

La técnica NIRS presenta las siguientes ventajas: 1) es una técnica no destructiva, de forma que la muestra objeto de análisis puede ser utilizada en ensayos posteriores; 2) es respetuosa con el medioambiente, ya que no es necesario emplear ningún tipo de reactivo; 3) requiere poca (secado y molienda) o ninguna preparación de las muestras; 4) posibilita analizar simultáneamente varios constituyentes para cada muestra; 5) es flexible, pues puede ser utilizada en productos muy diversos; 6) el coste operacional se reduce respecto a los métodos convencionales y, si bien el precio del instrumento es elevado, puede considerarse una inversión recuperable a corto o medio plazo; 7) es simple en cuanto a su uso (Obiols, 1997; Williams y Norris, 2001; Robert et al., 2004; Siesler et al., 2006).

Sin embargo, la técnica de NIRS presenta algunas dificultades. Uno de los problemas es el manejo de gran cantidad de datos espectrales obtenidos en una aplicación NIRS que a menudo son redundantes, debido a solapamientos de las bandas de absorción, lo que hace muy difícil la interpretación de los resultados. Para solucionar este problema, se ha recurrido al empleo de algoritmos matemáticos para el tratamiento de la información espectral (Kaffka y Gyamarti, 1995; Jouan-Rimbaud y Massart, 1996). Otra dificultad es la de ser un método secundario que necesita un método de referencia oficial para relacionar la información espectral con los parámetros cuantitativos y cualitativos de interés (Shenk et al., 1992; Shenk y Westerhaus 1995b; Weyer, 1995). No obstante son numerosas las aplicaciones de esta tecnología en el campo de la agricultura y la alimentación.

5.3.2.-Bases teóricas

La espectroscopía NIRS se basa en la absorción de radiación con longitud de onda entre 780 y 2500 nm. Estas absorciones se deben principalmente a movimientos de vibración o rotación, plegado, alargamiento o deformación de enlaces (Shenk y Westerhaus, 1995a; Miller, 2001) y dependen de las características físicas y/o químicas de la muestra a analizar (Burns y Ciurezak, 2008). Las absorciones dan lugar a sobretonos y bandas de combinación de vibraciones fundamentales. Dichas bandas suelen solapar, son anchas y de poca intensidad (Workman y Burns, 2001). Los sobretonos se producen gracias a que las moléculas se comportan de acuerdo con el modelo del oscilador anarmónico (los niveles de energía no están homogéneamente

Introducción

espaciados). La anarmonicidad produce transiciones entre estados de energía vibracionales discontinuos dando lugar a las bandas de primer y segundo sobretono. Las bandas de combinación se producen en moléculas poliatómicas donde dos o más modos de vibraciones interaccionan de forma simultánea (Figura 16).

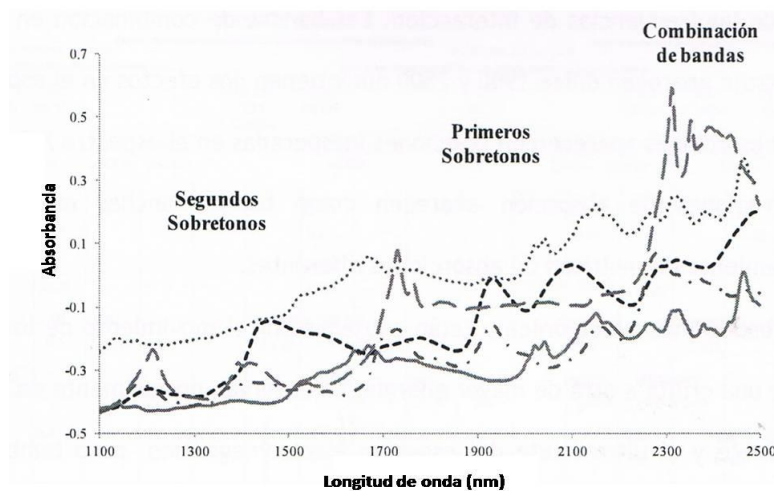


Figura 16. Bandas de NIR

Una banda de absorción tiene lugar cuando la frecuencia de vibración de NIRS coincide con la frecuencia de vibración de los enlaces de la molécula. Se produce una transferencia de energía en la cual la molécula experimenta un cambio en el momento dipolar y como consecuencia se absorbe radiación (Skoog, et al., 2009). La intensidad de las bandas de NIR depende del cambio en el momento dipolar y de la anarmonicidad del enlace. El átomo de hidrógeno es más ligero y por ello presenta las vibraciones más grandes y la mayor desviación del comportamiento armónico. Como consecuencia de esto, las principales bandas de NIR se deben a enlaces C-H, N-H, O-H y S-H. Por el contrario, las bandas para los enlaces como C=O, C-C y C-Cl son muchos más débiles e incluso ausentes (Figura 17). La formación de enlaces débiles que se da entre el H y átomos electronegativos, principalmente O y N, también afecta a la intensidad de las bandas. Dichos enlaces, denominados puentes de hidrógeno, afectan a las vibraciones asociadas al H y dichos átomos provocando desplazamientos de las bandas a mayores longitudes de onda que se observan como ensanchamientos de picos. Cuando se trata de moléculas homonucleares (H_2 , O_2 , N_2 , etc), el momento dipolar no se altera durante la vibración o rotación y, en consecuencia, este tipo de moléculas no absorbe radiación el infrarrojo.

Introducción

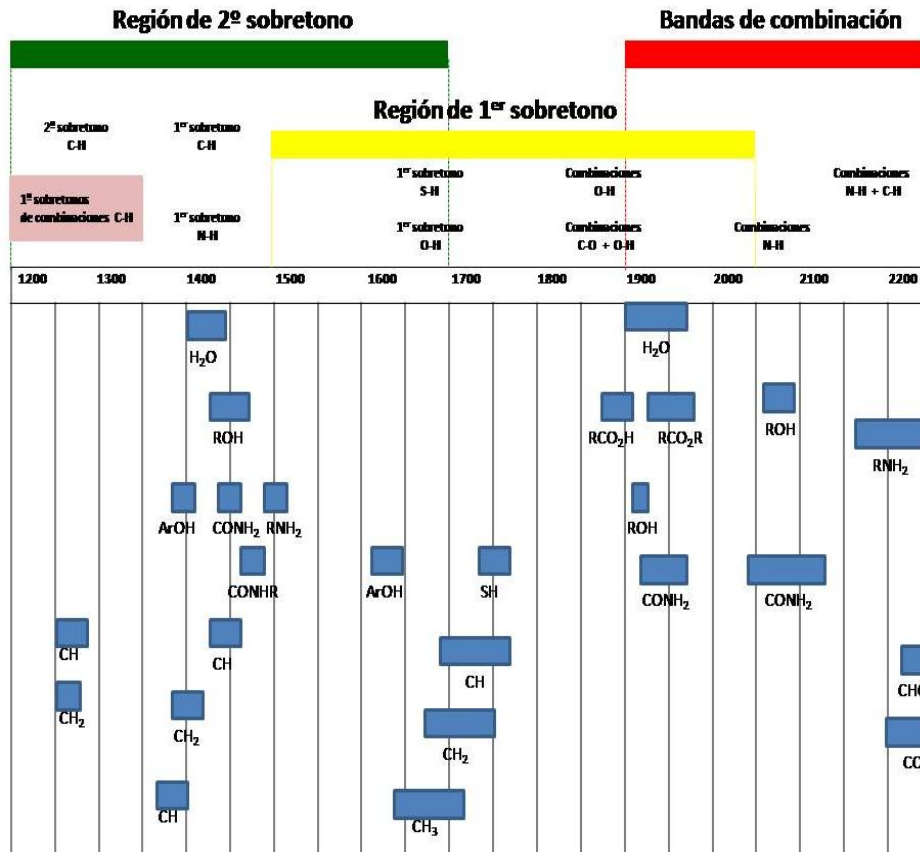


Figura 17. Asignación de bandas de NIR a grupos moleculares

En productos tan complejos como un alimento, la asignación de bandas en la región NIR es muy compleja. La posición de la banda de absorción depende del ambiente químico y/o físico que rodea al enlace vibracional, es decir, factores como la temperatura, humedad, carácter cristalino o tamaño de las partículas que forman la muestra, influyen en el espectro obtenido. Las longitudes de onda utilizadas entre los 780-2500 nm provocan que la absorción de luz sea menor que con otras regiones del infrarrojo. Por ello, el coeficiente de absorción de la muestra es menor, siendo necesario utilizar pasos ópticos más amplios en la región de NIRS (Bertrand, 2001; Ciurezak, 2001, Koehler et al., 2002).

Introducción

5.3.3.-Bases instrumentales

Un equipo de NIR está formado por los siguientes elementos (Figura 18):

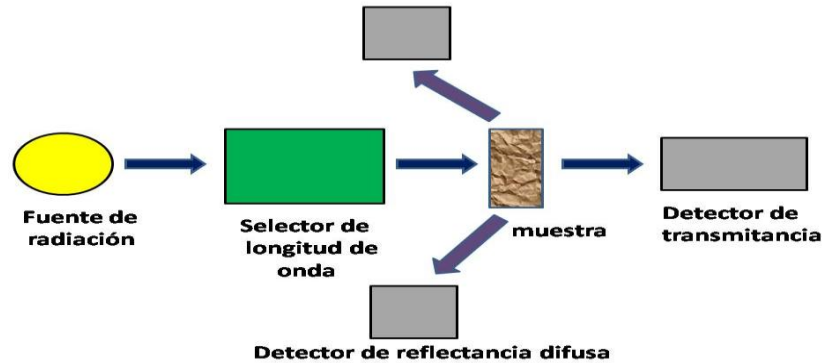


Figura 18. Esquema de la instrumentación de un espectrofotómetro de NIR

a) Fuente de radiación: debe ser continua en un gran intervalo, con gran intensidad que no debe variar con la longitud de onda (Skoog et al., 2009). Suele utilizarse una lámpara halógena de filamento de tungsteno con ventana de cuarzo que proporciona un espectro continuo entre 320-2500 nm.

b) Selector de longitudes de onda: puede ser un selector de monocromador o selector de filtro. Podemos distinguir los *sistemas dispersivos*, que permiten la descomposición del haz incidente, siendo las redes de difracción los elementos dispersantes más utilizados; y *sistemas no dispersivos* que permiten el paso de ciertas longitudes de onda. Dentro de estos, las transformadas de Fourier presentan la ventaja de ofrecer un mayor rendimiento ya que no poseen ninguna rendija que atenúe la radiación. Como resultado, la potencia de la radiación que llega al detector es mayor que en el caso de un instrumento dispersor (Skoog et al., 2009).

c) Compartimento de muestra: cuando interacciona la radiación de NIR sobre la muestra, parte de la luz incidente es absorbida estableciéndose una medida de absorbancia: $A = \log (I_0/I)$. Siendo I_0 , la intensidad de la luz antes de entrar en la muestra; I , la intensidad de la luz tras pasar por la muestra. La absorbancia se expresa en medidas de reflectancia (R) y transmitancia (T): $A = \log (1/R)$ o $A = \log (1/T)$. En la Figura 19 y en la Tabla 15 se presentan los fenómenos que se producen como

Introducción

consecuencia de la interacción de la luz sobre la muestra y que permiten dichas medidas:

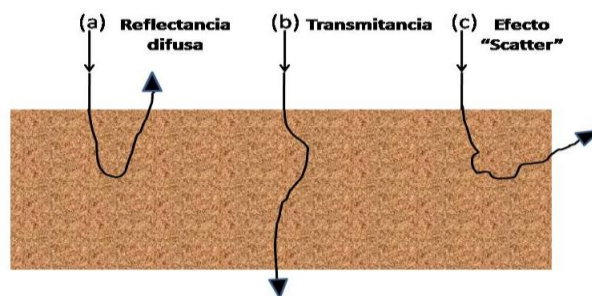


Figura 19. Fenómenos producidos entre la radiación de NIR y la muestra que dan lugar a medidas de reflectancia y transmitancia.

Fenómenos	Descripción
(a) Reflectancia difusa	La radiación penetra en la muestra y se refleja llegando al detector de reflectancia difusa
(b) Transmitancia	La radiación se trasmite a través de los espacios vacíos entre las partículas de la muestra o interaccionando con ellas llegando al detector de transmitancia situado en el lado opuesto de la fuente
(c) Efecto "scatter"	La radiación se dispersa al interactuar con las partículas de la muestra. Una porción de ella vuelve a la superficie describiéndose como <u>reflectancia difusa</u> . Depende de las diferencias entre el índice de refracción de las partículas y el medio que lo rodea.
Fuentes: Shenk et al. (1992); Dahm y Dahm (2001); Siesler et al. (2006)	

Tabla 15. Fenómenos producidos entre la radiación de NIR y la muestra que dan lugar a medidas de reflectancia y transmitancia.

d) Detector: la intensidad de la radiación, tras penetrar en la muestra, se mide en los detectores. El detector más utilizado es el de sulfuro de plomo (PbS), que posee una sensibilidad adecuada entre 900 y 2600 nm. Para medidas por transmisión en sólidos se utilizan detectores de arseniuro de indio y galio (InGaAs) con sensibilidad entre 600-1900 nm (Workman and Burns, 2001). Existen 4 modalidades de medidas: la modalidad de *reflectancia* se utiliza principalmente para muestras sólidas y semisólidas; la de *transmitancia* para muestras gaseosas, líquidas, semilíquidas y sólidas; la modalidad de *transflectancia*, es una combinación de las dos anteriores, el haz de luz atraviesa la muestra y se refleja por una superficie reflectante en contacto con la muestra, posteriormente se recoge en el detector. Se utiliza para muestras líquidas y semilíquidas; en la modalidad de *interactancia*, se utiliza una fibra óptica en contacto con la superficie de la muestra para iluminar la muestra y detectar la radiación reflejada por la misma (Pérez-Marín et al., 2005). Con este tipo de análisis se elimina el proceso de rellenar cápsulas, recogiendo el espectro directamente sobre las muestras y transmitiéndolo al instrumento por fibras ópticas (Figura 20).

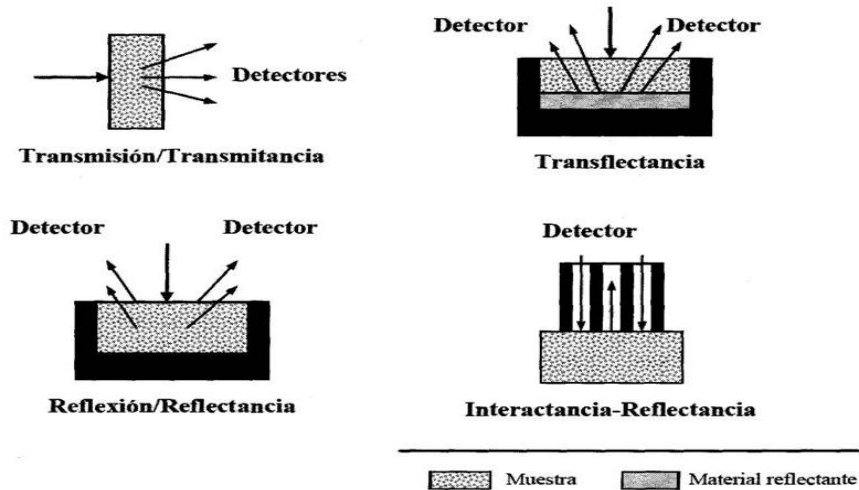


Figura 20. Modalidades en el compartimento de muestra

5.3.4.-Bases quimiométricas

Los espectros de NIRS son complejos debido a los solapamientos de las bandas. La combinación de la espectroscopía de NIR con la aplicación de las técnicas quimiométricas permite extraer la información significativa. Dichas técnicas utilizan algoritmos matemáticos para el análisis de datos (Kaffka y Gyamarti, 1995; Jouanrimbaud y Massart, 1998).

5.3.4.1.-Pretratamientos espectrales

Son tratamientos matemáticos realizados para la información espectral, que permiten aumentar la relación señal/ruido de los espectros produciendo así un aumento de la señal correspondiente al analito de interés. En ocasiones, conviene utilizar más de un método de pretratamiento espectral para mejorar la calidad de los resultados. Sin embargo, las técnicas de procesamiento de la señal espectral eliminan parte de la información almacenada en la misma, por lo que es necesario estudiar qué estrategia es la más adecuada para nuestro conjunto de muestras. A continuación, se describen brevemente los principales pretratamientos (Castro et al., 2012).

Introducción

a) Corrección del ruido

Los efectos no deseados presentes en las señales obtenidas en espectroscopía se denominan comúnmente ruidos. Pueden tener diferentes causas y afectar de forma diferente al espectro. Este ruido puede ser *instrumental*, si es debido a los componentes del instrumento, o *ambiental*, causado por variaciones de temperatura, humedad u otras condiciones ambientales durante el análisis espectral. Existen tres formas de corregirlo: 1) *Promediado de espectros*: al promediar varias señales de una misma muestra disminuye la contribución del ruido, aumentando la relación señal/ruido; 2) *Suavizado espectral*: se aplican algoritmos matemáticos en caso de que el promediado de espectros no sea suficiente ya que la relación señal/ruido es pequeña. Estos algoritmos están basados en filtros de Savitsky-Golay y en transformadas de Fourier que aplicados al espectro reducen el ruido (Castro et al., 2012); 3) *Corrección de la línea base*: es un tipo de pretratamiento que intenta corregir determinadas tendencias en la línea base que aportan ruido a la señal. Un tipo de corrección es el ajuste de línea base o *detrending* que ajusta el espectro original a una función cuadrática. Posteriormente dicha función se sustrae y se elimina la curvatura ascendente a medida que aumenta la longitud de onda. De esta forma el conjunto de espectros corregidos tiene como media el valor 0 y una varianza diferente de 0. Se aplica a cada espectro individual, por lo tanto no depende de ningún espectro de referencia (Brereton, 2003).

b) Derivación

Se usa fundamentalmente con tres propósitos: discriminación espectral, acentuando pequeñas diferencias entre espectros prácticamente iguales; aumento de la resolución espectral en caso de bandas solapadas; y facilitar el análisis multicomponente. La primera derivada elimina los desplazamientos de la línea base, mientras que la segunda corrige las desviaciones causadas por los términos que varían linealmente con la longitud de onda (Castro et al., 2012). La aplicación de derivadas permite un aumento de la resolución de las bandas, pero por el contrario aumenta el ruido. Para efectuar el cálculo de la derivación los métodos más utilizados son el de la ventana móvil propuesto por Norris y Williams y el propuesto por Savitzky y Golay (Brereton, 2003).

c) Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión (MSC, Multiplicative Scatter Correction) y variable normal estándar (SNV, Standard Normal Variable)

La MSC tiene como finalidad corregir desplazamientos espectrales debidos al diferente tamaño de partículas de muestras. Este algoritmo se propuso para reducir los efectos de la radiación dispersa incrementando la relación entre la señal y el parámetro de interés. Por lo tanto mejoran la linealidad entre los datos espectrales y los de referencia dando lugar a una mejor distribución de las muestras. Es un método muy utilizado en NIRS, ya que este efecto se presenta en medidas en reflectancia (Bertrand y Dufour, 2000). Para aplicar MSC, se realiza una regresión por mínimos cuadrados entre cada espectro individual y el espectro medio del conjunto y, posteriormente, se utilizan coeficientes de regresión para calcular el espectro corregido con MSC. Hay que tener en cuenta que este tratamiento utiliza todas las muestras, por lo que si se detecta y elimina alguna muestra anómala, hay que recalcularse MSC con el nuevo colectivo (Martens y Martens, 2001).

SNV se utiliza también para corregir los efectos de tamaño de partícula. A diferencia de MSC, SNV se aplica individualmente a cada espectro, sin depender de ningún espectro de referencia. A cada uno de los valores de absorbancia, para cada longitud de onda, se le resta el valor medio de absorbancia del espectro. El resultado se divide por la desviación estándar del espectro. Se ha demostrado que existe una relación lineal entre MSC y SNV, por lo que aplicados correctamente proporcionan resultados equivalentes (Miller y Miller, 2002).

5.3.4.2.-Reducción de variables-PCA (Principal Component Analysis)

Se fundamenta en la reducción del gran volumen de información que proporcionan los datos espectroscópicos a la vez que elimina la correlación espectral sin pérdida relevante información y así poder observar las tendencias en las muestras (Brereton, 2003). Si se considera una matriz X de datos del espectro, cada fila corresponde a una muestra (espectro) y cada columna a un valor de absorbancia para cada espectro a una longitud de onda diferente (Figura 21). La dimensión de la matriz será el número de valores totales de absorbancia.

Introducción

$$X = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & \dots & a_{1k} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & \dots & a_{2k} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & \dots & a_{3k} \\ \dots & & & & \\ a_{m1} & a_{m2} & a_{m3} & \dots & a_{mk} \end{bmatrix}$$

m = número de espectros
k = valores de absorbancia para cada espectro
m x k = valores totales de absorbancia

Figura 21. Matriz de datos espectrales.

El objetivo del PCA es reducir la dimensión de la matriz X manteniendo intacta la información relevante del sistema. Esto se consigue hallando las direcciones que expliquen la máxima variabilidad (Figura 22) de las muestras y utilizarlas como nuevos ejes de coordenadas, llamados componentes principales (Miller y Miller, 2002). Cada componente principal contiene información de diferente relevancia, las primeras describen la fuente de variación más importante de datos.

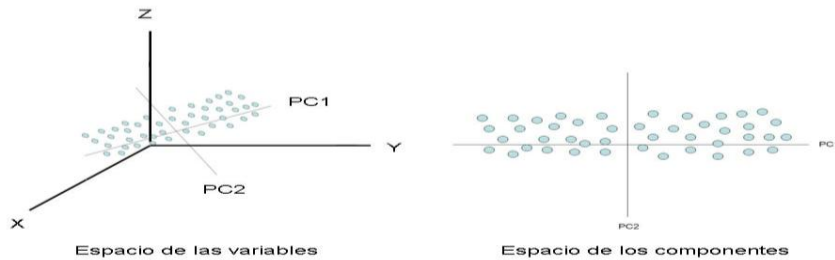


Figura 22. Representación gráfica de la reducción de la dimensionalidad llevada a cabo por un PCA desde un sistema de 3 variables a uno de dos componentes principales.

La matriz X se descompone en dos componentes: $X = TP^t + E$. Donde T , matriz de *scores* que representan las coordenadas de cada punto en el nuevo espacio definido por los PCs; P , matriz de *loadings* que representa a los cosenos de los ángulos formados entre ejes originales y los ejes PCs; E , matriz residual. La representación completa de la matriz X implica k vectores de loadings y scores, pero como al hacer la descomposición se reduce la dimensionalidad del sistema, la matriz X tiene a vectores donde $a < k$. La matriz X resultante sería: $X = T_1P_1^t + T_2P_2^t + T_3P_3^t + \dots + T_aP_a^t + E$. El subíndice es el número de componentes principales seleccionado (Castro et al., 2012).

5.3.4.3.-Muestras anómalas

Uno de los aspectos críticos en la creación de cualquier modelo predictivo es la detección de muestras anómalas ya que pueden influir mucho en los resultados predictivos del modelo (Wise et al., 2006). Una muestra anómala (outlier) no es sinónimo de una “mala muestra”, sino de una muestra diferente al resto que no sigue la distribución de la población. Para evaluar la presencia de muestras anómalas en cuanto a su composición química se emplea el estadístico T, similar a una t de Student que compara, para cada muestra, el valor del constituyente obtenido mediante el método de referencia (y_i) y el valor predicho por la ecuación de calibración (y'_i). El cálculo de dicho estadístico se lleva a cabo a través de la fórmula que aparece en la tabla 17. Se consideran muestras anómalas en cuanto a su composición química, aquellas que presentan valores del estadístico T superiores a 2,5 (Mark y Workman, 1991).

5.3.4.4.-Técnicas quimiométricas en análisis cuantitativo NIRS

Cuando se manejan datos espectroscópicos, tradicionalmente se asume que se puede aplicar la ley de Lambert-Beer (Mauri et al., 2010), la cual establece que los valores de absorbancia están relacionados linealmente con las concentraciones de los constituyentes de interés para cada muestra. Por ello, la mayoría de las técnicas matemáticas aplicadas para el desarrollo de calibraciones se basan en métodos lineales de ajuste. A través del modelo directo (modelo clásico que utilizamos aplicando la ley de Lambert, en la que la absorbancia es función de la concentración) se obtiene el modelo inverso donde la concentración es función de la absorbancia (Figura 23). En el análisis cuantitativo podemos distinguir dos grupos de métodos de análisis: 1) métodos con variables originales; 2) métodos con reducción de variables. Dicho métodos se describen en los apartados 5.3.4.4.3 y 5.3.4.4.4

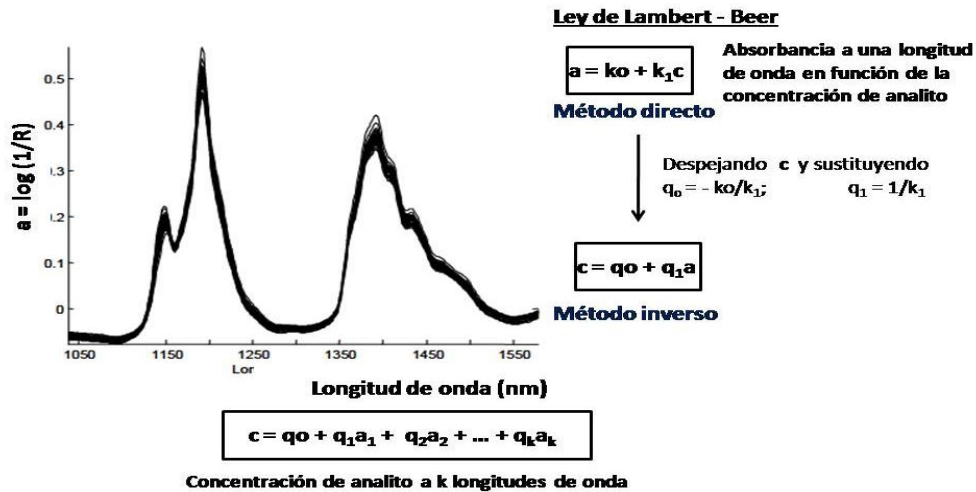


Figura 23. Espectros de infrarrojos de distintas muestras a k longitudes de onda y obtención de la concentración en función de las absorbancias a las diferentes longitudes de onda

5.3.4.4.1.-Estrategias y selección de muestras de calibración

La calibración se puede definir como el proceso de obtención de un modelo espectro-químico, que relaciona la información espectral de las muestras con los valores proporcionados por el método de referencia definiendo el tratamiento matemático de los datos, el segmento del espectro y el método de regresión a emplear. Los diferentes tratamientos matemáticos y las técnicas de regresión aplicadas permiten obtener distintas ecuaciones de predicción para cada una de las variables analizadas, siendo necesario realizar su evaluación (Shenk y Westerhaus, 1996; Mauri et al., 2010).

La estrategia para la selección de muestras en el proceso de calibración depende del tipo de población de muestras a analizar (Shenk y Westerhaus, 1991): 1) *población cerrada*, el proceso de análisis se lleva a cabo sin contemplar la posibilidad de futuros análisis. En primer lugar, se obtienen los espectros de todas las muestras y se seleccionan los espectros de las muestras con mayor variabilidad. Este grupo de muestras se analizan por métodos de referencia para los componentes que se quieren calibrar. Las calibraciones obtenidas se validan y se emplean para estimar la composición del grupo de muestras respecto a los componentes considerados; 2) *población abierta*, el proceso de análisis se lleva a cabo de forma continua. En el proceso de selección de muestras tenemos que tener en cuenta tres conceptos (Shenk y Westerhaus, 1993): librería de espectros, calibración global, calibración local. En primer

Introducción

lugar, se procede a la obtención de espectros de todas las muestras y selección de aquellos con mayor variabilidad. Se prosigue con el análisis mediante métodos de referencia y con dichas muestras se conforma una librería de espectros. A diferencia del primer caso, esta calibración no es definitiva, sino que se van incluyendo nuevas muestras en la librería cuyos espectros difieren de los espectros de las todas las muestras de la librería. Cuando en la librería haya un número suficiente de muestras, se desarrolla una calibración para cada componente. En el análisis de una nueva muestra se puede llevar a cabo mediante calibración global o local. Las calibraciones desarrolladas con todas las muestras de la librería se denominan calibraciones globales. Si se seleccionan los espectros de un grupo de muestras de la librería próximas a la muestra analizar, se desarrolla una calibración local. La primera calibración da una composición muy fiable de la nueva muestra. La segunda, en caso de que este bien definida, da mayor exactitud en la estimación.

Una vez que se analizan todas las muestras por NIRS, la selección de un grupo representativo de ellas, para desarrollar y validar las ecuaciones de calibración para los principales componente de calidad, se realiza en base a la variabilidad espectral de las muestras mediante el empleo de los siguientes algoritmos: 1) CENTER, tiene como finalidad reducir la dimensionalidad del grupo de calibración para, posteriormente, evaluar la presencia de muestras anómalas mediante el cálculo de la distancia H estandarizada, variante de la distancia de Mahalanobis, existente entre espectros en un espacio vectorial de n componentes principales (definidas de un análisis de componentes principales de las variables originales, es decir, de los datos espectrales). Se calcula la distancia de cada muestra al centro de la población en dicho espacio. Las muestras con mayores diferencias se apartan y no se emplean en el segundo algoritmo; 2) SELECT, realiza el mismo tratamiento matemático de la información espectral que el algoritmo anterior, pero en lugar de calcular la distancia de cada muestra al centro de población determina la distancia existente entre pares de muestras. A partir de estas distancias se selecciona un grupo de muestras que representa la variabilidad espectral de la población (Shenk y Westerhaus, 1991).

Tanto las muestras excluidas por el algoritmo CENTER, como las seleccionadas con el algoritmo SELECT, pueden ser analizadas en el laboratorio para distintos componentes de calidad para su posterior desarrollo de la calibración. En las Tablas 17

y 18, se muestran los estadísticos más empleados en la evaluación y elección de la ecuación de calibración óptima.

5.3.4.4.2.-Validación externa

Una vez obtenida la ecuación de calibración, se realiza una validación externa de la misma. Con esta ecuación, se estima la composición de un grupo de muestras no incluidas en el grupo de calibración que son analizadas por el método de referencia en condiciones idénticas a aquellas. La comparación estadística entre los valores obtenidos por el método de referencia y los valores estimados mediante la ecuación de calibración determina la fiabilidad y exactitud en la estimación de esta ecuación. Los estadísticos recomendados para evaluar la validación externa de una calibración NIRS son los que se muestran en la Tabla 19.

El sistema de control del proceso de validación externa asume las siguientes bases: 1) la calibración evaluada ha de tener al menos, 100 muestras; 2) el grupo de validación ha de tener como mínimo 9 muestras; 3) se establece el siguiente límite de control para el sesgo: $LC \text{ sesgo} = 0,6 * SEC$; 4) al mismo tiempo, se establece un límite para $SEP(C)$: $LC SEP(C) = 1,3 * SEC$; 5) la pendiente de regresión entre los valores predichos y los valores del método de referencia, debería estar comprendida entre 0,9 y 1,0; 6) la diferencia entre la media de los valores predichos y los valores del método de referencia no debe ser mayor del 20%; 7) el coeficiente de determinación (R^2) entre los valores predichos y los del método de referencia debe ser mayor de 0,6; 8) la distancia H de las muestras del colectivo de validación debe ser inferior al valor límite 3 (Shenk y Westerhaus, 1996).

5.3.4.4.3.-Métodos con variables originales

El más utilizado es la regresión lineal múltiple (**MLR, *Multiple Linear Regression***) que utiliza un número máximo de longitudes de onda del espectro sin llevar a cabo una simplificación de las variables (Cámara y Pérez Conde, 2010). Si los espectros de la figura 23 corresponden a m muestras con k longitudes de onda, se obtiene un sistema de m ecuaciones con k+1 incógnitas (Figura 24). Teniendo k+1 muestras de calibración podemos resolver el sistema por mínimos cuadrados. Este

Introducción

método presenta dos inconvenientes: si tenemos espectros con muchas longitudes de onda necesitamos muchas muestras de calibración; si las variables “a” están muy correlacionadas entre sí (como sucede con los datos espectroscópicos), los coeficientes tienen una incertidumbre elevada. Esto imposibilita la interpretación de los coeficientes e incrementa la incertidumbre en las predicciones.

$$\begin{aligned}c_1 &= q_0 + q_1 a_{11} + q_2 a_{12} + \dots + q_k a_{1k} \\c_2 &= q_0 + q_1 a_{21} + q_2 a_{22} + \dots + q_k a_{2k} \\c_3 &= q_0 + q_1 a_{31} + q_2 a_{32} + \dots + q_k a_{3k} \\&\dots \\c_m &= q_0 + q_1 a_{m1} + q_2 a_{m2} + \dots + q_k a_{mk}\end{aligned}$$

Figura 24. Sistema de m ecuaciones con k+1 incógnitas que se resuelve mediante mínimos cuadrados a partir de k+1 muestras de calibración

Para evitar esto se realiza una selección de un número máximo de longitudes de onda mediante un test F, el cual informa de aquellas que están más correlacionadas con los valores de referencia. Una vez que una longitud de onda concreta ha sido seleccionada e incluida en el modelo, esta es evaluada de nuevo junto al resto de longitudes de onda del espectro (Hruschka, 1987). El proceso se repite hasta que las longitudes de onda, que se añaden al modelo, muestren escasa o nula mejoría en la exactitud de la ecuación de calibración generada, tratando de evitar el fenómeno de sobreajuste (Martens y Naes, 1991). Esta escasa o nula mejora ocurrirá cuando el valor F estimado sea inferior al valor F límite considerado. Dicho fenómeno de sobreajuste se explica en el apartado c del siguiente epígrafe.

5.3.4.4.-Métodos con reducción de variables

En este tipo de métodos, se realiza una reducción de variables antes de realizar el cálculo de regresión. El modo más habitual de reducción de variables es un cálculo basado en un análisis en componentes principales (PCA), o bien en una variación de éste. A continuación se describen los métodos utilizados.

Introducción

a) Regresión por Componentes Principales (PCR, *Principal Component Regression*)

Se trata de un caso particular de Regresión Lineal Múltiple (MLR) en el cual se utilizan los scores obtenidos de un PCA como variables independientes. Los pasos se describen en la Tabla 16. El inconveniente de este método es que la PCR sólo utiliza la información espectral para calcular las nuevas variables, por lo que éstas son las que mejor representan la matriz de datos X, lo que no quiere decir que sean las más apropiadas para estimar los parámetros de la matriz Y (Massart et al., 1998).

Pasos	Ecuaciones
Descomponer matriz de espectros en componentes principales y representar por su matriz de scores	$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E}$ (1) $\mathbf{T} = \mathbf{XP}$ (2)
Establecer la relación entre la matriz de los datos a determinar en función de una matriz de regresores B	$\mathbf{Y} = \mathbf{TB} + \mathbf{E}$ (3)
Calcular la matriz de regresores B por mínimos cuadrados a partir de los valores de Y del conjunto de calibración	$\mathbf{B} = (\mathbf{T}^t \mathbf{T})^{-1} \mathbf{T}^t \mathbf{Y}$ (4)
Realizar predicción con un conjunto de nuevas muestras	$\mathbf{T}^* = \mathbf{X}^* \mathbf{P}$ (5)
Calcular la matriz de la propiedad a determinar	$\mathbf{Y} = \mathbf{T}^* \mathbf{B}$ (6)
Fuente: Coello y Maspoch (2007)	

Tabla 16. Pasos y ecuaciones en la Regresión por Componentes Principales (PCR)

b) Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS, *Partial Least Square Regression*)

Es un procedimiento similar a PCR en el cual no sólo se tiene en cuenta los valores espectrales (como ocurre con el PCR), sino también los valores de referencia (Shenk y Westerhaus, 1995a).

c) Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS, *Modified Partial Least Square Regression*)

Es un método de regresión más estable y preciso que el algoritmo PLS (Naidenova et al., 1995; Shenk y Westerhaus, 1995a) ya que es una variante en el que los residuos obtenidos para cada longitud de onda son estandarizados, es decir, los residuos NIRS, a cada longitud de onda se dividen por la desviación estándar de los

Introducción

residuos a esa longitud de onda, antes de calcular el siguiente factor. En una calibración multivariante realizada mediante MPLS se corre el riesgo de crear un modelo matemático de gran ajuste para el grupo de muestras de calibración pero ineficaz para estimar la composición de muestras externas a dicho grupo, lo que se conoce como sobreajuste (overfitting) (Martens y Naes, 1991). Para evitar esto, se realiza una validación cruzada durante el proceso de calibración (Shenk y Westerhaus, 1995a; Williams, 2001). Para ello, se reservan algunas muestras del grupo de calibración y se calibra con las restantes. Las muestras reservadas se emplean para validar la ecuación de calibración obtenida. Este proceso se repite varias veces con distintos grupos de muestras reservadas. Con esto, se determina el número óptimo de factores que deben emplearse para evitar el sobreajuste. Como estadístico se utiliza el error estándar de validación cruzada (SECV) cuya fórmula se muestra en la Tabla 17. Determinado dicho número óptimo, se realiza la calibración incluyendo todas las muestras del grupo de calibración.

Introducción

Est.	Descripción	Ecuación
SEC	Error estándar de calibración. Es el error típico de los residuales para el grupo de calibración.	$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - y'_i)^2}{N - p - 1}}$ <p> y_i = valor de referencia y'_i = valor estimado por NIRS N = número de muestras del grupo de calibración. p = términos de regresión </p>
T	Estadístico para evaluar presencia de muestras anómalas. Explicado en el apartado 5.3.4.5.2	$T = \frac{(y_i - y'_i)}{SEC} = \frac{residual}{SEC}$
SECV	Error estándar en la validación cruzada. Es el error típico de los residuales para el grupo de validación cruzada. Se emplea como una estimación del error estándar de predicción SEP.	$SECV \cong SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - y'_i)^2}{N - 1}}$ <p>N = número de muestras empleadas como grupo de validación cruzada o predicción.</p>
R² ó r²	Coefficientes de determinación. Muestran el porcentaje de variabilidad existente en las concentraciones, modeladas por la ecuación de regresión. Se emplea tanto en el proceso de calibración (R ²) como en el proceso de validación cruzada (r ²).	$R^2 \text{ ó } r^2 = \frac{SCreg}{SCtot}$ $SCreg = SCtot - SCres$ <p> $SCreg$ = suma de cuadrados de regresión. $SCtot$ = suma de cuadrados totales $SCres$ = suma de cuadrados de los residuales </p>
1-VR	Varianza del componente de la calidad en los grupos de muestras reservados durante la validación cruzada. Se calcula durante la validación cruzada y se explica con las ecuaciones de calibración desarrolladas en este proceso. En la práctica se emplea como una estimación de r ² .	$1-VR = 1 - \frac{SECV^2}{SD^2}$
Fuentes: Moya et al. (1995); Shenk y Westerhaus (1996); Williams (2001).		

Tabla 17. Estadísticos empleados en la evaluación y elección de la ecuación de calibración.

Introducción

Est.	Descripción	Ecuación
ETL	Error típico del método de referencia. Representa el error típico de muestras analizadas por duplicado mediante el método de referencia.	$ETL = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (y_1 - y_2)^2}{2M}}$ <p>y_1 e y_2 = valores obtenidos del constituyente a calibrar para una determinada muestra. M = número de muestras analizadas mediante el método de referencia.</p>
RPD	Valor predictivo residual. Relaciona la desviación típica de los valores de referencia para el grupo de validación y el error típico de validación cruzada. Valores altos de RPD indican predicciones de NIRS eficientes.	$RPD = \frac{SD}{SECV}$
RER	Rango de error de relación. Muestra la relación entre el intervalo de composición de los datos para el grupo de calibración. Su valor debe ser mayor de 10 para asegurar una adecuada capacidad predictiva de la ecuación.	$RER = \frac{\text{Intervalo}}{SECV} = \frac{y_{max} - y_{min}}{SECV}$
CV	Coefficiente de variación. Es el cociente entre el SECV y el valor medio de los datos de referencia para un constituyente determinado, para el grupo de validación cruzada. Lo deseable es que su valor sea bajo.	$CV = \frac{SECV}{y_m}$
Fuentes: Moya et al. (1995); Shenk y Westerhaus (1996); Williams (2001).		

Tabla 18. Estadísticos empleados en la evaluación y elección de la ecuación de calibración.

Est.	Descripción	Ecuación
SEP	Error estándar en la predicción. Es el error típico de los residuales para el grupo de validación externa.	$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - y'_i)^2}{N - 1}}$ <p>N = número de muestras empleadas como grupo de predicción.</p>
Sesgo	Diferencia media entre los residuales. También se conoce como "bias".	$sesgo = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - y'_i)}{N}$ <p>N = número de muestras del grupo de calibración.</p>
SEP(C)	Error estándar de predicción corregido por el sesgo.	$SEP(C) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - y'_i - sesgo)^2}{N - 1}}$
Fuentes: Windham et al. (1989); Shenk y Westerhaus (1996).		

Tabla 19. Estadísticos recomendados para la evaluación de la validación externa de una calibración NIRS.

5.3.4.5.-Técnicas quimiométricas en análisis cualitativo NIRS

El objetivo del análisis cualitativo en NIRS es el desarrollo de modelos de clasificación de muestras en base a sus características espectrales, agrupando las muestras con espectros similares y separando las muestras con espectros distintos (Cozzolino et al., 2003; Le Moigne et al., 2008; Liu et al., 2008). Las técnicas quimiométricas utilizadas en análisis cualitativo se conocen como *Métodos de reconocimiento de pautas* (PRM, Pattern Recognition Methods) y son un conjunto de herramientas que permiten establecer agrupaciones de muestras en función de sus características comunes. Se denomina *colectivo de aprendizaje* a la clasificación de los distintos tipos de muestras en diferentes clases. Los métodos de reconocimiento de pautas se clasifican en métodos supervisados y no supervisados.

En los *métodos no supervisados*, no se conoce a priori a que clase pertenece la muestra y el objetivo es identificar tendencias dentro de los colectivos de aprendizaje y construir subgrupos en base a ellas (Naes et al., 2007). Según Pérez-Marín et al. (2005) dentro de este tipo de procedimientos el más común es el *análisis de conglomerados o "clúster"*, en la cual los perfiles de las muestras que son similares entre si van a un grupo (cohesión interna del grupo) y los perfiles de las muestras diferentes van a otros grupos (aislamiento externo del grupo). En los *métodos supervisados*, se conoce a priori a que clase pertenece la muestra. Los pasos a seguir en este tipo de métodos son los siguientes (Pérez-Marín et al., 2005): 1) selección del colectivo de aprendizaje; 2) selección de variables de discriminación; 3) obtención del modelo mediante aplicación del algoritmo; 4) validación de los modelos de clasificación. Existen numerosos procedimientos para el análisis de métodos supervisados. En principio se puede hacer una primera distinción entre los *orientados a la discriminación*, que dividen el espacio en tantas regiones como clases se hayan definido en el colectivo de aprendizaje clasificando todas las muestras en sus respectivas clases; y los *dirigidos al modelado de clase*, que clasifican las muestras en una clase, en varias o no la clasifican (Vandeginste et al., 1998).

5.3.4.5.1.-Análisis discriminante

Dentro de los métodos supervisados orientados a la discriminación distinguimos el análisis discriminante. Dicho análisis utiliza tres algoritmos diferentes, que son el *análisis discriminante canónico*, *discriminante lineal* y *discriminante cuadrático* (SAS, 1990).

El análisis discriminante canónico se emplea como técnica de reducción de la dimensionalidad, similar a un análisis de componentes principales ya que se generan variables canónicas que son combinación lineal de las variables originales. Con esto, se minimiza la variabilidad de las muestras de una misma categoría y se maximiza la variabilidad entre grupos. En dicho análisis no es posible asignar muestras a la clase correspondiente, sólo tiene carácter exploratorio. Mediante el empleo del análisis discriminante lineal o cuadrático, se desarrolla una función discriminante para la discriminación de las muestras en diferentes clases y la posterior clasificación de las muestras ajenas al desarrollo del modelo. Esta función discriminante se obtiene de dos formas: 1) a partir de una única matriz de covarianzas que es la media ponderada de todas las clases, dando lugar a una función lineal. En este caso, se realiza el análisis discriminante lineal; 2) a partir de matrices de covarianzas de diferentes clases dando lugar a una función cuadrática. Por ello, se realiza el análisis discriminante cuadrático. Un paso previo al análisis discriminante es la realización de un test de homogeneidad para estimar la similitud de las matrices de covarianzas entre las diferentes clases y con ello estimar el tipo de análisis que se debe emplear: lineal o cuadrático. El test de homogeneidad depende del número de clases y de variables. Si en el test se obtiene un valor no significativo, se ha de emplear la matriz de covarianzas media ponderada para el cálculo de la función discriminante lineal. Por el contrario, si el valor es significativo, se han de emplear matrices individuales de cada clase, obteniéndose una función discriminante cuadrática (Morrison, 1976). El criterio para asignar una muestra a un grupo se expresa como la distancia de Mahalanobis de una muestra a cada uno de los grupos. Por tanto, la muestra pertenecerá al grupo en el cual el valor de su distancia sea menor. La distancia de Mahalanobis se calcula a partir de la matriz media ponderada o a partir de las matrices individuales de cada clase dependiendo si el análisis discriminante es lineal o cuadrático. A partir de estas distancias, es posible definir el porcentaje de probabilidad de pertenencia de una muestra a una determinada clase. Para la evaluación

Introducción

de modelos de clasificación generados se emplea la validación cruzada completa, donde cada una de las “i” muestras es clasificada mediante un modelo generado a partir de las “n-i” muestras restantes, repitiéndose tantas etapas de validación cruzada como muestras posea el colectivo de clasificación. Como estadístico, se emplea el error de clasificación que es el porcentaje de muestras clasificadas incorrectamente frente al número total de muestras del colectivo de aprendizaje. Se considera como número óptimo de componentes principales el de menor error de clasificación estimado mediante validación cruzada.

5.3.4.5.2.-Análisis SIMCA (SIMCA, Soft Independent Modelling of Class Analogy)

Uno de los métodos supervisados dirigidos al modelado de clase es el *análisis SIMCA*, en el cual cada clase se modela por separado mediante un análisis de componentes principales. El modelo independiente, obtenido para cada clase, es definido en base a dos distancias: 1) distancia de las muestras al centro del modelo, que aporta información que queda explicada por el modelo cuando una muestra se proyecta sobre las componentes principales. Dicha distancia se denomina estadístico *Leverage*; 2) distancia de la muestra al modelo, que aporta información que no puede ser explicada por el modelo (varianza residual). Dicha distancia se denomina estadístico S. Las condiciones para que una muestra sea clasificada como perteneciente a una determinada clase son que tanto su distancia *leverage* como su distancia S, sean inferiores a los valores máximos de ambos estadísticos en cada clase (Martens y Naes, 1991; Esbensen et al., 1994). En dicho análisis, una muestra puede ser clasificada en una clase, en varias, o no pertenecer a ninguna. Los estadísticos empleados son: 1) falsos negativos, que es el número de muestras que, perteneciendo a una clase, no han sido asignadas a dicha clase por su correspondiente modelo; 2) falsos positivos, que es el número de muestras que, aunque no pertenecen a una clase, se reconocen como tales por el modelo de dicha clase. Mientras menor sea el valor de ambos estadísticos menor error presentarán los modelos a la hora de clasificar.

5.3.4.5.3.-Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (DPLS, Discriminat Partial Least Square)

Es Otro método supervisado dirigido al modelado de clase. Mediante este método se generan nuevas variables discriminatorias de pertenencia o no a un determinado grupo (Vigneau et al., 2000; Naes et al., 2007; Kramer et al., 2004). Se generan tantas variables discriminatorias como clases existan en el colectivo de aprendizaje. Dichas variables presentan valores entre 1 ó 2 según pertenezca una muestra a la clase o no. Se ha considerado un valor de 1,5 como límite de tal forma que si la muestra presenta un valor inferior a 1,5, para una variable discriminatoria, no pertenecería a dicha clase. Por el contrario, si el valor es superior a 1,5 la muestra sería clasificada dentro de la clase correspondiente. Una muestra puede estar clasificada en más de una clase, al presentar valores superiores a 1,5 en varias variables discriminatorias al mismo tiempo ya que cada clase genera una variable discriminatoria independiente (Naes et al. 2007; Heise y Winzen, 2004; Kramer et al., 2004). El resultado obtenido es una ecuación de regresión de mínimos cuadrados DPLS que permite estimar el grupo al cual pertenecen las muestras que no han sido incluidas en el desarrollo del modelo. Existen dos posibilidades de regresión: 1) PLS1, cuando el modelo va a ser empleado para diferenciar dos clases. En este caso, se realiza una regresión sobre un único constituyente (la clase) variando los valores que toma entre 1 y 2, según pertenezca o no a la clase; 2) PLS2, la regresión tiene lugar sobre varios constituyentes. Se define una matriz cuyas columnas van a estar formadas por tantas variables discriminatorias como clases haya y sus valores serán igualmente 1 y 2 (Vandeginste et al., 1998; Naes et al., 2007; Heise y Winzen, 2004). Para calcular el número óptimo de factores de regresión, se utiliza la validación cruzada en la cual se seleccionan diferentes colectivos de modelado y validación del total del colectivo de aprendizaje, realizando con cada selección una simulación del algoritmo de regresión discriminante. Cada simulación desarrolla ecuaciones con un número máximo de términos recomendados. Finalmente, se selecciona la ecuación con el mínimo error estándar de validación cruzada. Dado que dicho análisis es de modelado, una misma muestra podría estar clasificada en una, en varias o en ninguna de las clases. Por ello, se emplean los estadísticos de falsos positivos y falsos negativos ya mencionados en el análisis SIMCA.

6.-Referencias

- Abdallah, A., M.H. Ahumada, T.M. Gradziel. 1998.** Oil content and fatty acid composition of almond kernels from different genotypes and California production regions. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 1029-1033.
- Amar, S., H.C. Becker, C. Möllers. 2008.** Genetic variation and genotype x environment interactions of phytosterol in three doubled haploid populations of winter rapeseed. *Crop Sci.* 48: 1000-1006.
- Auld, D.L., M.D. Zanotto, T. McKeon, J.B. Morris. 2009.** Castor. Vollman, J., I. Rajcan (eds). *Oil Crops*. Springer, New York, USA, pp. 317-332.
- Awad, A.B., C.S. Fink. 2000.** Phytosterol as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *J. Nutr.* 130: 2127-2130.
- Barrera-Arellano, D., M.V. Ruiz-Méndez, G. Márquez-Ruiz, C. Dobarganes. 1999.** Loss of tocopherols and formation of degradation compounds in triacylglycerol model systems heated at high temperature. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1923-1928.
- Batten, G.D. 2004.** Forestry and the environment: challenges for Near Infrared Spectroscopy. Davies, A.M.C, A. Garrido (eds). *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of 11th International Conference*. NIR Publications, West Sussex, UK, pp. 749-755.
- Belitz, H.D., W. Grosch, P. Schieberle. 2009.** *Química de los alimentos*. 3^a Edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 139-152.
- Bertrand, D. 2001.** Near Infrared Spectroscopy and its Applications for Feed Quality Control. Van der Poel A.F.B, J.L Váhl, R.P. Kwakkel (eds). *Proceedings of the*

Introducción

1st World Feed Conference. Advances in Nutritional Technology. Wageningen Pers, the Netherlands, pp. 11-30.

Bertrand, D., Dufour, E. 2000. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. TEC & DOC, París, France. 566 p.

Blanco, A. 2001. Vitaminas. Química biológica. Editorial el Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 605 p.

Blanco, M., M. Alcalá. 2005. Use of Near Infrared Spectroscopy for Off-line measurements in the pharmaceutical industry. Bakeev, K (eds). Process Analytical Technology. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 362-391.

Bouic, P.J. 2001. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 4: 471-475.

Bouic, P.J., A. Clark, J. Lamprecht, M. Freestone, E.J. Pool, R.W. Liebenberg, D. Kotze, P.P. van Jaarsveld. 1999. The effects of β -sitosterol (BSS) and β -sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *Int. J. Sports Med.* 20: 258-262.

Bramley, P., I. Elmadfa, A. Kafatos, F. Kelly, Y. Manios, H. Roxborough, W. Breinhölder P., L. Mosca, W. Lindner. 2002. Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices. *J. Chromatogr. A.* 777: 67-82.

Brereton, R.G. 2003. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. Wiley, J., L. Sons (eds), Chichester, UK, 504 p.

Brigelius-Flohé, R., D. Kluth, N. Landes P. Pfluger, M. Birringer. 2002. Mechanisms of vitamin E metabolism. L. Packer, M. Traber, K. Kraemer, B.

Introducción

Frei (eds). The Antioxidant Vitamins C and E. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, pp. 171-179.

Burns D.A., E.M., Ciurezak. 2008. Handbook of Near Infrared Analysis. 3rd Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 808 p.

Cámara, C., C. Pérez Conde. 2010. Análisis químico de trazas. Editorial Síntesis, Madrid, España, pp. 419-421.

Caretto S., R. Nisil, A. Paradiso, L. De Gara. 2010. Tocopherol production in plant cell cultures. Mol. Nutr. Food Res. 54: 726–730.

Castro, A.R., M.C. Bondi, B.M.S. Suau. 2012. Técnicas espectroscópicas en química analítica. Volumen I. Aspectos básicos y espectrometría molecular. Editorial Síntesis, Madrid, España, 460 p.

Cela, R., R.A. Lorenzo, M.C. Casais. 2002. Técnicas de separación en química analítica. Editorial Síntesis, Madrid, España, 640 p.

Chun., J., J. Lee, L. Ye, J. Exler, R.R. Eitenmiller. 2006. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. J. Food Comp. Anal. 19: 196-204.

Ciurezak, E.W. 2001. Principles of Near Infrared Spectroscopy. Burns, D.A, E.W. Ciurczak (eds). Handbook of Near Infrared Analysis. 2nd Edition. Practical Spectroscopy Series, Vol. 27, Marcel Dekker, New York, USA, pp. 7-18.

Coello, J., S. MasPOCH. 2007. Temas avanzados de quimiometría. Blanco, M., V. Cerdá (eds). Universitat Autònoma de Barcelona, España, pp. 238-256.

Introducción

- Conceição, M.M., R.A. Candeia, F.C. Silva, A.F. Becerra, V.F. Fernández, A.G. Souza. 2007.** Thermoanalytical characterization of castor oil biodiesel. *Renew Sust. Energy Rev.* 11: 964-975.
- Connor, D., A. Hall. 1997.** Sunflower Physiology. Schneiter, A.A. (eds). *Sunflower Technology and Production. Agronomy Monograph 35.* ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin, USA, pp. 113-182.
- Conte L.S., O. Leoni, S. Palmieri, P. Capella, G. Lercker. 1989.** Half-seed analysis: rapid chromatographic determination of the main fatty acids of sunflower seed. *Plant Breed.* 102: 158-165.
- Cozzolino, D., H.E. Smith, M. Gishen. 2003.** Feasibility study on the use of visible and Near Infrared Spectroscopy together with chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. *J. Agr. Food Chem.* 51: 7703-7708.
- Curtis, H., N.S. Barnes, A. Schnek, A. Massarani. 2008.** *Biología* 7^a edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1160 p.
- Dahm, D.J., K.D. Dahm. 2001.** *The Physics of Near Infrared Scattering.* Williams, P., K., Norris (eds). *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries.* 2nd Edition. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 1-18.
- Delseny, M., F. Bourgis, F. Roscoe. 1999.** Le colza erucique: problèmes et perspectives scientifiques. *OCL (Oléagineux, Corp Grass, Lipides)* 6: 428-434.
- Damodaran, S., K.L. Parkin, O.R. Fennema. 2010.** *Química de los alimentos.* 3^a edición. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, 1116 p.

Introducción

Demurin, Y. 1993. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds. *Helia* 18: 59–62.

Demurin, Y., D. Škorić, D. Karlovic. 1996. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. *Plant Breed.* 115: 33–36.

Daniels, R., H. Kim, M. David. 2006. Hydrogenation and Interesterification Effects on the Oxidative Stability and Melting Point of Soybean Oil. *J. Agr. Food Chem.* 54: 6011-6015.

Dergal, S. 2006. Química de los alimentos. 4ª Edición, Editorial Pearson, México, pp. 269-276.

Esbensen, K., S. Schönkopf, T. Midtgaard. 1994. Multivariate analysis in practice. CAMO A/S, Trondheim, Norway, 312 p.

FAOSTAT. 2013. Database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <http://www.faostat3.fao.org/home/index.html> (Último acceso Julio 2013).

Fassio, A., D. Cozzolino. 2004. Non-destructive prediction of chemical composition in sunflower seeds by Near Infrared Spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* 20: 321-329.

Felipe, A.J. 2000. El almendro I: El material vegetal. Integrum, Lérida, España, 461 p.

Fernández-Martínez, J.M., L. Velasco. 2012. Castor. Gupta, S.K. (ed). *Technological Innovations in Major World Oil Crops*. Vol. 1. Springer, New York, USA, pp. 237-265.

Fernández-Martínez, J.M., B. Pérez-Vich, L. Velasco. 2006. Mejora de la calidad del girasol. Llácer, G. M.J. Díez, J.M. Carrillo, M.L. Badenes (eds). *Mejora*

Introducción

Genética de la Calidad en Plantas. Universidad Politécnica de Valencia, España, pp. 449-471.

Fernández-Martínez, J.M., B. Pérez-Vich, L. Velasco. 2009. Sunflower. Vollmann, J., I. Rajcan (eds). Oil Crops, Springer, New York, USA, pp. 155-232.

Fernández-Martínez, J.M., J. Domínguez, A. Jiménez. 1987. Obtención de dos líneas puras de girasol con altos niveles de ácido oleico. Comunicaciones Agrarias, Serie Producción Vegetal nº 4. Dirección General de Investigación y Extensiones Agrarias, Junta de Andalucía, España, 27 p.

Fernández-Martínez, J., M. Del Río, A. De Haro. 1993. Survey of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germplasm for variants in fatty acid composition and other seed characters. Euphytica 69: 115-122.

Fernández-Martínez, J.M., M. Mancha, J. Osorio, R. Garcés. 1997. Sunflower mutant containing high levels of palmitic acid in high oleic acid background. Euphytica 97: 113-116.

Fernández-Martínez, J.M., L. Velasco, B. Pérez-Vich. 2004. Progress in the genetic modification of sunflower oil quality. Proc. 16th Int. Sunflower Conf., Fargo, North Dakota, USA. Int. Sunflower Assoc., Paris, France, pp. 1-14.

Fernández-Moreno, J.L., L. Garrido-Frerich, P. Plaza-Bolanos, J.L. Martínez Vidal, 2008. Multiresidue method for the analysis of more than 140 pesticides residues in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. J. Mass Spectrosc. 43: 1235-1254.

Fernández-Moya, V. E. Martínez-Force, R. Garcés. 2002. Temperature effect on a high stearic acid sunflower mutant. Phytochem. 59: 33-37.

Introducción

- Fick, G.N. 1989.** Sunflower. R.K. Downey, G. Röbbelen, A., Ashri (eds). Oil Crops of the World. McGraw-Hill, New York, USA, pp. 301-316.
- Fuster, M.D., A.M. Lampi, A. Hopia, A. Kamal-Eldin. 1998.** Effects of α - and γ -tocopherols on the autoxidation of purified sunflower triacylglycerols. *Lipids* 33: 715–722.
- Garcés, R., M. Mancha. 1993.** One-step liquid extraction and fatty acid methyl esters preparation for fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 211: 139-143.
- Gerdes, J., W. Gao, R. Benson, A. Erickson, C. Kahl. 2012.** Identification and characterization of genes conferring reduced saturate oil in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Proc. 18th Int. Sunflower Conf., Buenos Aires, Argentina. http://www.asagir.org.ar/asagir2008/buscar_congreso.asp (Último acceso Diciembre 2013).
- Gonzaga, F.P. Celio. 2006.** A new method for determination of the oxidative stability of edible oils at frying temperatures using Near Infrared Emission Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 570: 129-135.
- Gopalan, C., D. Krishnamurthi, I.S. Shenolicar, K.A.V.R. Krishnamachari. 1974.** Myocardial changes in monkeys fed mustard oil. *Nutr. Metabol.* 16: 352-365.
- Guillén, M., C. Nerea. 2002.** Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chem.* 77: 503-510.
- Gül, M.K., M. Seker. 2006.** Comparative analysis of phytosterol components from rapeseed (*Brassica napus* L.) and olive (*Olea europaea* L.) varieties. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108: 759-765.

Introducción

- Gunstone, F.D., J.L. Harwood. 2007.** Occurrence and characterization of oils and fats. The Lipid Handbook, 3st Edition; Gunstone, F.D., J.L. Harwood, A.J. Dijkstra (eds); CRC Press: Boca Raton, Florida, USA, pp. 37-141.
- Hamdan, Y., B. Pérez-Vich, J.M. Fernández-Martínez, L. Velasco. 2009.** Novel safflower germplasm with increased saturated fatty acid content. *Crop Sci.* 49: 127-132.
- Harris, D. 2007.** Análisis Químico Cuantitativo. 3^a Edición, Editorial Reverte, Barcelona, España, 744 p.
- Hartmann, M.A. 1998.** Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* 3: 170-175.
- Hayes, D.G., R. Kleiman, B.S. Phillips. 1995.** The triglyceride composition, structure, and presence of estolides in the oils of *Lesquerella* and related species. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 72: 559-569.
- Heise, H.M., R. Winzen. 2004.** Chemometrics in Near Infrared Spectroscopy. Siesler, H.W., Y. Ozaki, S. Kawata, H.M. Heise (eds). *Near Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications.* WILEY-VCH, Weinheim, Germany, pp. 125-162.
- Herchi, W., S. Harrabi, K. Sebei, S. Rochut, S. Boukhchina, C. Pepe, H. Kallel. 2009.** Phytosterol accumulation in the seed of *Linum usitatissimum* L. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 880-885.
- Hill, M.J., D.J. Murphy. 1991.** Biotechnology of oilseeds. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 4: 1-46.
- Holm, T. 1999.** Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *J. Chromatogr. A.* 842: 221-227.

Introducción

- Hruschka, W.R. 1987.** Data Analysis: Wavelength selection methods. Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. William, P. and Norris, K. (eds). American Association of Cereal Chemist Inc., St. Paul, Minnesota, USA. pp. 35-55.
- Ivanov, P., D. Petakov, V. Nikolova, E. Petchev. 1988.** Sunflower breeding for high palmitic acid content in the oil. Proc. 12th Int. Sunflower Conf., Novi Sad, Yugoslavia, Int. Sunflower Assoc., Paris, France, pp. 463-465.
- Jayaraj A., F.I. Tovey, M. Hobsley. 2003.** Duodena ulcer prevalence: research into the nature of possible protective dietary lipids. *Phytother. Res.* 17: 391-398.
- Jensen, S.K., C. Lauridsen. 2007.** α -tocopherol Stereoisomers. *Vitamins and Hormones*. Vol. 76. Elsevier Academic Press Inc. San Diego, USA, pp. 281-308.
- Jonker, D., G.D. van der Hoeck, J.F.C Glatz, C. Homan, M.A. Posthumus, M.B. Katan. 1985.** Combined determination of free, esterified and glycosylated plant sterols in foods. *Nutr. Rep. Int.* 32: 943-951.
- Jouan-Rimbaud, D., D.L. Massart. 1996.** Wavelength selection for the multivariate calibration of Near Infrared Spectroscopy data. Williams, P. (eds). *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 7th International Conference*. Davies, A.M.C., NIR Publications, Chichester, UK, pp. 194-197.
- Kaffka, K.J., L.S. Gyarmati. 1995.** Quality determination in the food industry. Batten G.D., P.C. Flinn, L.A. Welsh, A.B. Blakeney (eds). *Leaping Ahead With Near Infrared Spectroscopy*. NIR Spectroscopy Group, Royal Australian Chemical Institute, Melbourne, Victoria, Australia, pp. 261-269.
- Kamal-Eldin, A. 2005.** Minor Components of Fats and Oils. *Baley's Industrial Oil and Fat Products*, 6st Edition, Vol. 3. *Edible Oil and Fat Products: Specialty Oils and*

Introducción

Oils Products; Shahidi, F. Ed John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, USA, pp. 319-359.

Katan, M., S. Grundy, P. Jones, M. Law, T. Miettinen, R. Paoletti. 2003. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin. Proc.* 78: 965-978.

Kester, D.E., S. Cunningham, A.A. Kader. 1993. Almonds. *Encyclopedia of food science. Food technology and nutrition.* Academic Press, London, UK, pp. 121-126.

Knowles, P.F. 1989. Safflower. Downey, R.K., G. Röbbelen, A. Ashri (eds). *Oil Crops of the World.* McGraw-Hill, New York, USA, pp. 363-374.

Kodad, O., M.S. Gracia Gómez, R. Socias i Company. 2005. Fatty acid composition as evaluation criterion for kernel quality in almond breeding. *Acta Hort.* 663: 301-304.

Kodad, O., R. Socias i Company. 2008. Variability of oil content and of major fatty acid composition in almond (*Prunus amygdalus* Batsch) and its relation with kernel quality. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4096-4101.

Kodad, O., G. Estopañan, T. Juan, F. Molino, A. Mamouni, Z. Messaoudi, M. Lahlou, R. Socias i Company. 2010. Plasticity and stability in the major fatty acid content of almond kernels grown under two Mediterranean climates. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 85: 381-386.

Kodad, O., R. Socias i Company, M.S. Prats M.C. López Ortiz. 2006. Variability in tocopherol concentration in almond oil and its use as a selection criterion in almond breeding. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 81: 501-507.

Introducción

- Koehler, F.W, E. Lee, L.H. Kidder, E.N. Lewis. 2002.** Near Infrared Spectroscopy: The practical chemical imaging solution. *Spectroscopy Europe* 14: 112-119.
- Kotretsou, S.I., A. Koutsodimou. 2006.** Overview of the application of tandem mass spectrometry (MS/MS) in food analysis of nutritionally harmful compounds. *Food Rev. Int.* 22: 125-172.
- Kramer, R., J. Workman, J.B Reeves III. 2004.** Qualitative analysis. Near Infrared Spectroscopy in Agriculture. Robert, C.A., J. Workman, J.B. Reeves III (eds). *Agronomy Series N°.* 44. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin, USA, pp. 175-206.
- Labalette, F., A. Estragnat, A. Messéan. 1996.** Development of castor bean production in Francia. Janick, J. (eds). *Progress in new crops.* ASHS Press, Alexandria, Virginia, USA, pp. 340-342.
- Lampi, A.M., A. Kamal-Eldin. 1998.** Effect of α - and γ -tocopherol on thermal polymerisation of purified high-oleic sunflower triacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1699–1703.
- Lampi, A.M., L. Kataja, A. Kamal-Eldin, V. Piironen. 1999.** Antioxidant activities of α - and γ -tocopherol in the oxidation of rapeseed oil triacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 749–755.
- Le Moigne, M., M. Chantal, D. Bertrand, F. Jourjon. 2008.** Sensory and instrumental characterization of Cabernet Franc grapes according to ripening stages and growing location. *Food Qual. Prefer.* 9: 220-231.
- Lee, J., J. Shin, J. Lee, K. Lee. 2004a.** Production of lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts. *Food Res. Int.* 37: 967-974.

Introducción

- Lee, Y., S. Oh, J. Chang, K. In-Hwan. 2004b.** Chemical composition and oxidative stability of safflower oil prepared from safflower seed roasted with different temperatures. *Food Chem.* 84: 1-6.
- Liu, L, D. Cozzolino, W.U. Cynkar, R.G. Damberg, L. Janik, B.K O'Neil, C.B. Colby, M. Gishen. 2008.** Preliminary study on the application of Visible Near Infrared Spectroscopy and Chemometrics to classify Riesling wines from different countries. *Food Chem.* 106: 781-786.
- Mark, H., Y. Workman. 1991.** *Statistics in Spectroscopy.* Academic Press Inc., New York, USA, 313 p.
- Marmesat, S., L. Velasco, M.V. Ruiz-Méndez, J.M. Fernández-Martínez, C. Dobarganes. 2008.** Thermostability of genetically modified sunflower oils differing in fatty acid and tocopherol composition. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110: 776-782.
- Martens, H., T. Naes. 1991.** *Multivariate calibration.* John Wiley and Sons Inc., Chichester, UK, 419 p.
- Martens H., M. Martens. 2001.** *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction.* Wiley, J., L. Sons (eds), Chichester, UK, 445 p.
- Massart, D.L., B.G.M. Vandeginste., L.M.C Buydens, S.P., De Jong., J. Lewi, S. Smeyers-Verbeke. 1998.** *Principal Components.* Vandenste, B.G.M, S.C. Rutan (eds). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B,* Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 552 p.
- Mauri, A.M. Llobat, R. Herráez. 2010.** *Laboratorio de análisis instrumental.* Editorial Reverte, Universitat de Valencia, España, 301 p.

Introducción

- McLure, W.F. 2003.** Review: 204 years of Near Infrared Technology: 1800-2003. *J. Near Infrared Spectrosc.* 11: 487-518.
- McNair, H.M., J. M., Miller, F.A. Settle. 2009.** *Basic Gas Chromatography*, Wiley InterScience, New York, USA, 239 p.
- Miller, C.E. 2001.** *Chemical Principles of Near Infrared Technology. Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries.* Williams, P., K., Norris (eds). 2nd Edition. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 19-37.
- Miller, J.F., Fick, G.N. 1997.** The genetics of sunflower. Schneiter, A.A. (eds) *Sunflower technology and production. Agronomy Monograph 35.* ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin, USA, pp. 441-495.
- Miller, J.N., J.C. Miller. 2002.** *Estadística y Quimiometría para Química Analítica.* 4^a edición. Editorial Prentice Hall, Madrid, España, 286 p.
- Moreau, R. 2005.** Phytosterols and phytosterol esters. Akoh, C., O-M. Lai (eds) *Healthful Lipids*, AOCS Press, Champaign. Illinois, USA, pp. 335-360.
- Moreno, C., J. Larrauri. 1998.** Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. *Food Sci.Tech. Int.* 4: 391-399.
- Morrison, D.F. 1976.** *Multivariate statistical methods.* 2nd edition. Mac Graw Hill Inc., New York, USA, 338 p.
- Moya, L., A. Garrido, J.E. Guerrero, J. Lizaso, A. Gómez. 1995.** Quality control of raw materials in the feed compounds industry. Leaping ahead with near infrared spectroscopy. Batten, G.D., Flinn, P.C., Welsh, L.A. and Blakeney, A.B. (eds.). NIR Spectroscopy Group, Royal Australian Chemistry Institute, Melbourne, Victoria, Australia, pp. 111-117.

Introducción

Muggli, R. 1994. Vitamin E-Bedarf bei Zufuhr von Polyenfettsäuren. *Fat Sci. Technol.* 96: 17-19.

Müller-Esterl, W. 2008. *Bioquímica. Fundamentos para la medicina y ciencias de la vida.* Editorial Reverte, Barcelona, España, pp. 549-550.

Murphy, D.J. 1995. The use of conventional and molecular genetics to produce new diversity in seed oil composition for the use of plant breeders progress, problems and future prospects. *Euphytica* 85: 433-440.

Naes, T., T. Isaksson, T. Fearn, A. Davies. 2007. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification.* NIR Publication, Chichester, UK. 344 p.

Naidenova, I.A, J. Andrieu, P.V. Tomov. 1995. Scanning NIR spectral analysis of cell walls of three perennial grasses by stepwise multiple Linear and modified partial least squares regression. Batten G.D., P.C. Flinn, L.A. Welsh, A.B. Blakeney (eds). *Leaping Ahead with Near Infrared Spectroscopy.* NIR Spectroscopy Group, Royal Australian Chemical Institute, Melbourne, Victoria, Australia, pp. 243- 247.

National Cholesterol Education Program. 2002. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). National Institutes of Health (NIH) Publication No. 02-5215, September 2002. Available online in: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3full.pdf> (Último acceso Agosto 2013).

Naz, S., H. Sheik, R. Siddiqui, S. Syed. 2005. Deterioration of olive, corn and soybeans oils due to air, light, heat and deep-frying. *Food Res. Int.* 38: 127-134.

Introducción

- Normén, L. L. Ellegård, H. Brants, P. Dutta, H. Andersson. 2007.** A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. *J. Food Comp. Anal.* 20: 193-201.
- Nyström, L., A. Schär, A.M. Lampi. 2012.** Steryl glycosides and acylated steryl glycosides in plant foods reflect unique sterol patterns. *Eur. J. Lipid Technol.* 114: 656-669.
- Obiols, J. 1997.** The importance of analytical control. *Options Méditerranéennes* 26: 83-86.
- Ogunniyi, D.S. 2006.** Castor oil: a vital industrial raw material. *Bioresour. Technol.* 97: 1086-1091.
- Ohlrogge, J.B. 1994.** Design of new plant products: Engineering of fatty acid metabolism. *Plant Physiol.* 104: 821-826.
- Osborne, B.G., T. Fearn, P.H. Hindle. 1993.** Theory of Near Infrared Spectrophotometry. Browning, D. (eds). *Practical NIR spectroscopy with Applications in Food and Beverage analysis*. 2nd edition. Longman Scientific and Technical, Harlow, UK, pp. 13-35.
- Osorio, J., J. Fernández-Martínez, M. Mancha, R. Garcés. 1995.** Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Sci.* 35: 739-742.
- Padley, F.B., F.D. Gunstone, J.L. Harwood. 1994.** Occurrence and characteristics of oils and fats. F.D. Gunstone et al. (eds). *The Lipid Handbook*. Chapman & Hall, Londres, UK, pp. 47-223.
- Palou, A. 2005.** El libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación. Barcelona: 2^a edición. Unilever Foods S.A. Barcelona, España, 177 p.

Introducción

- Pearson, T.A. 1994.** Stearic acid and cardiovascular disease: answer and questions. *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 1071S–1072S.
- Pérez-Marín, D.C, A. Garrido-Varo, J.E. Guerrero. 2005.** Implementation of Local algorithm with Near Infrared Spectroscopy for compliance assurance in compounds feedingstuff. *Appl. Spectrosc.* 59: 69-77.
- Pérez-Vich, B., L. Velasco, J.M. Fernández-Martínez. 1998.** Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 547-555.
- Petruci, R.H., F.G. Herring, J.D. Madura, C. Bissonnete. 2011.** Química general. Principios y aplicaciones modernas. 10ª edición. Editorial Pearson, Madrid, España, pp. 499-507.
- Phillips, K.M., D.M. Ruggio, M. Ashraf-Khorassani. 2005.** Analysis of steryl glucosides in foods and dietary supplements by solid-phase extraction and gas chromatography. *J. Food Lipids* 12: 124-140.
- Piironen, V., D.G. Lindsay T.A. Miettinen, J. Toivo, A.M. Lampi. 2000.** Review Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 80: 939-966.
- Pintó, X. 2006.** Las estatinas, los hábitos de vida y el tratamiento de la hipercolesterolemia, los tiempos cambian y los criterios también. *Med. Clin.* 126: 217-219.
- Plat, J., R. Mensink. 2005.** Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am. J. Cardiol.* 96: 15D-22D.

Introducción

Robert, C.A., J. Workman, J.B. Reeves III. 2004. Near Infrared Spectroscopy in Agriculture. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin, USA, 822 p.

Roche, J., A. Bouniols, Z. Mouloungui, T. Barranco, M. Cerny. 2006. Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 108: 287–297.

Roche, J., M. Alignan, A. Bouniols, M. Cerny, Z. Mouloungui, F. Vear, O. Mehrah. 2010. Sterol content in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) as affected by genotypes and environmental conditions. Food Chem. 121: 990–995.

Rodriguez, J. 2006. Química y análisis químico. 1ª edición. Ediciones Ceysa, Barcelona, España, 400 p.

Rojas-Barros, P., A. De Haro, J. Muñoz Y J.M. Fernández-Martínez. 2004. Isolation of a natural mutant in castor (*Ricinus communis* L.) with high oleic/low ricinoleic acid content in the oil. Crop Sci. 44: 76-80.

Ros, E. 2006. Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. Rev. Esp. Cardiol. 6: 52G-62G.

Rubinson, J.F., K.A. Rubinson. 2001. Análisis Instrumental. 1ª edición. Editorial Pearson Educación, Madrid, España, 872 p.

Sathe, S.K., N.P. Seran, H.H., Kshirsagar, D. Heber, K.A. Lapsley. 2008. Fatty acid composition of California grown almonds. J. Food Sci. 73: C607–C614.

SAS. 1990. SAS/STAT User's Guide Version 6. SAS. Institute Inc (eds). Cary, North Carolina, USA, 795 p.

Saura-Calixto, F., M.J. Cañedas, L. Soler. 1988. La almendra: composición, variedades, desarrollo y maduración. INIA, Madrid, España, 173 p.

Introducción

- Schneider, C. 2005.** Review chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 7-30.
- Schiefer, B., F. M. Loew, V. Laxdal, K. Prasad, G. Forsyth, R. G. Ackman, E. D. Olfert. 1978.** Morphologic effects of dietary plant and animal lipids rich in docosenoic acids on heart and skeletal muscle of cynomolgus monkeys. *Am J. Pathol.* 90: 551–564.
- Seppanen, C.M., Q. Song, A.S. Csallany. 2010.** The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats and food system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2010. 87: 469-481.
- Shenk, J.S., M.O. Westerhaus. 1991.** Population definition, sample selection, and calibration procedures for Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Crop Sci.* 31: 469-474.
- Shenk, J.S., M.O. Westerhaus. 1993.** Analysis of Agriculture and Food Product by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Infracore International, Port Matilda, Pennsylvania, USA, 116 p.
- Shenk, J.S., M.O. Westerhaus. 1995a.** Analysis of Agriculture and Food Product by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. NIRSystems, Silver Spring, Maryland, USA.
- Shenk, J.S., M.O. Westerhaus. 1995b.** Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual. NIRSystems, Silver Spring, Maryland, USA, pp. 247-277.
- Shenk, J.S., M.O. Westerhaus. 1996.** Calibration the ISI way. Davies, A.M.C., P.C. Williams (eds). *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves.* NIR Publications, Chichester, UK, pp. 198-202.

Introducción

- Shenk, J.S., J. Workman, M.O. Westerhaus. 1992.** Application of NIR spectroscopy to agricultural products. Burns, D.A, E.W. Ciurczak (eds). Handbook of Near Infrared Analysis. Practical Spectroscopy Series, Vol. 13, Marcel Dekker, New York, USA, pp. 383-431.
- Siesler, H.W., Y. Ozaki, S. Kawata, H.M. Heise. 2006.** Near infrared Spectroscopy. Principles, Instrument, Applications. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 348 p.
- Simopoulos, A., A. Leaf., N. Salem. 1999.** Essentialy of and recomended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. Ann. Nutr. Metab. 43: 127-130.
- Singh, V., N. Nimbkar. 2007.** Safflower (*Carthamus tinctorius* L). Singh, R. (eds). Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Oilseed crops. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 167-194.
- Skoog, D.A., D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch. 2009.** Fundamentos de Química analítica. 8ª edición. Editorial Cengage Learning, México, 1065 p.
- Smania, E.F., F. Delle Monache, A. Smania, R.A. Yunes, R.S. Cuneo. 2003.** Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Gadonerma annulare*. Fitoterapia 74: 375-377.
- Socias i Compani, R., O. Kodad, J.M. Alonso, T. M. Gradziel. 2008.** Almond quality: a breeding perspective. Horti. Rev. 34: 197-238.
- Soldatov, K.I. 1976.** Chemical mutagenesis in sunflower breeding. Proc. 7th Int Sunflower Conf. Krasnodar, USSR. Sunflower Assoc., Vlaardingen, the Netherlands, pp. 352-357.
- Tian, K., D. Purnendu. 1999.** Determination of oxidative stability of oils and fat. Anal Chem. 71: 1692-1698.

Introducción

- Timberlake, K.C. 2011.** Química. Una introducción a la química general orgánica y biológica. 10ª edición. Editorial Pearson, Madrid, España, pp. 516-518.
- Toivo, J., A.M. Lampi, S. Aalto, V. Piironen. 2000.** Factors affecting sample preparation in the gas chromatographic determination of plant sterols in whole wheat flour. *Food Chem.* 68: 239-245.
- Töpfer, R., N. Martín, J. Schell. 1995.** Modification of plant lipid synthesis. *Science* 268: 681-686.
- Valcárcel, M., A. Gómez Hens. 1988.** Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverte, Madrid, España, 800 p.
- Valenzuela, A. 2004.** Los fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Rev. Chil. Nutr.* 31: 161-169.
- Valenzuela, A., C. Yáñez, C. Golusda. 2010.** Mantequilla o margarina diez años después. *Rev. Chil. Nutr.* 37: 505-513.
- Vandeginste, B.G.M, D.L. Massart, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. 1998.** Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B. Elsevier Science B.V., Amsterdam, the Netherlands, pp. 649-699.
- Velasco, J., M. Andersen, S. Leif. 2004a.** Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chem.* 85: 623-632.
- Velasco, L., J.M. Fernández-Martínez. 2002.** Breeding oilseed crops for improved oil quality. Basra, A.S., L.S. Randhawa (eds). Quality improvement in field crops. The Harworth Press, New York, USA, pp. 309-344.

Introducción

- Velasco, L., J.M. Fernández-Martínez. 2003.** Identification and genetic characterization of new sources of β - and γ -tocopherol in sunflower germplasm. *Helia* 26: 17-23.
- Velasco, L., J.M. Fernández-Martínez. 2004.** Registration of CR-34 and CR-81 safflower germplasms with increased tocopherol. *Crop Sci.* 44: 2278.
- Velasco, L., B. Pérez-Vich, J.M. Fernández-Martínez. 2004b.** Novel variation for tocopherol profile in a sunflower created by mutagenesis and recombination. *Plant Breed.* 123: 490-492.
- Velasco, L., B. Pérez-Vich, J.M. Fernández-Martínez. 2004c.** Grain quality in oil crops. Benech-Arnold, R.L., R.A. Sánchez (eds). *Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture.* Food Products Press: Binghamton, New York, USA, pp. 389-427.
- Velasco, L., B. Pérez-Vich, J.M. Fernández-Martínez. 2005.** Identification and genetic characterization of a safflower mutant with modified tocopherol profile. *Plant Breed.* 124: 459-463.
- Verleyen, T., M. Forcades, R. Verhe, K. Dewettinck, A. Huyghebaert, W. De Greyt. 2002a.** Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 117-122.
- Verleyen, T., U. Sosinka, R. Verhé, K. Dewettig, A. Huyghebaert, W. De Greyt. 2002b.** Influence of the vegetable oil refining process on free and esterified sterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 947-953.
- Vick, B.A., C.C. Jan, J. Miller. 2002.** Inheritance of reduced saturated fatty acid content in sunflower oil. *Helia* 25: 113-122.

Introducción

- Vieira, C., S. Evangelista, R. Cirillo, A. Lippi, C.A., Maqqui, S. Manzini. 2000.** Effect of ricinoleic acid in acute und subchronic experimental models of inflammation. *Mediators Inflamm.* 9: 223-228.
- Vigneau, E., E.M. Qannari, M.F. Devaux. 2000.** Méthodes prédictives. *La Spectroscopie Infrarouge et Ses Applications Analytiques*. Bertrand D, E. Dufour (eds). Collection Sciences & Techniques Agroalimentaries. TEC & DOC, París, France, pp. 295-332.
- Vlahakis, C., J. Hazebroek. 2000.** Phytosterol accumulation in canola, sunflower and soybean oils: effects of genetics, planting location, and temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 49-53.
- Vles, R.O., J.J. Gottenbos. 1989.** Nutritional characteristics and food uses of vegetable oils. Downey et al. (eds). *Oil Crops of the World*. McGraw-Hill, New York, USA, pp. 63-86.
- Voet, D., J.G. Voet, C.W. Pratt. 2007.** Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp. 234-237.
- Walorczyk, S. 2007.** Development of a multi- residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas-chromatography – triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1165: 200-212.
- Wang, T., K.B. Hicks, R. Moreaur. 2002.** Antioxidant activity of phytosterol, oryzanol, and other phytosterol conjugates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 1201-1206.

Introducción

- Warner, K., J. Moser. 2009.** Frying stability of purified mid-oleic sunflower oil triacylglycerols with added pure tocopherols and tocopherols mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86: 1199-1207.
- Warner, K., J.F. Miller, Y. Demurin. 2008.** Oxidative stability of crude mid-oleic sunflower oils from seeds with high γ and δ - tocopherols levels. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85: 529-533.
- Weiss, E.A. 2000.** *Oilseed Crops*. 2nd Edition. Blackwell Science. Ltd. Oxford, UK, 364 p.
- Weyer L.G. 1995.** Practical calibration strategies. Batten G.D., P.C. Flinn, L.A. Welsh, A.B. Blakeney (eds). *Leaping Ahead with Near Infrared Spectroscopy*. NIR Spectroscopy Group, Royal Australian Chemical Institute, Melbourne, Victoria, Australia, pp. 84-90.
- Willard, H.H., L.L. Merritt, A. Dean, F.A. Settle. 1988.** *Instrumental Methods of Analysis*. 7^a Edition. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, USA, pp. 625-629.
- Williams, P.C. 2001.** Implementation of Near Infrared Technology. Williams, P., K. Norris (eds). *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2^a edition. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 145-169.
- Williams, P.C., K.H Norris. 2001.** Variables affecting Near Infrared Spectroscopic Analysis. Williams, P., K. Norris (eds). *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, 2^a edition. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 171-185.
- Windham, W.R., D.R. Mertens, F.E. Barton II. 1989.** Protocol for NIRS calibration: sample selection and equation development and validation. Martens, G.C., J.S.,

Introducción

Shenk, F.E. Barton II (eds). Near Infrared Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality. Agriculture Handbook, 643. USDA-ARS, US Government Printing Office, Washinton, District of Columbia, USA, pp 96-103.

Wise, B.M., N.B Gallagher, R. Bro, J.M. Shaver. 2006. PLS Toolbox Version 4 for Use with MATLAB. Eigenvector Research, Wenatchee, Washington, USA, 426 p.

White, P.J. 1992. Fatty acids in oilseeds (vegetable oil). Chow, C.K. (eds), Fatty Acids in Foods and Their Health Implications. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 237-262.

Workman, J.J., D.A. Burns. 2001. Commercial NIR instrumentation. Burns, D.A, E.W. Ciurzac (eds). Handbook of Near Infrared Analysis. 2nd Edition. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 53-70.

Zou, Y., Y. Jiang, T. Yang, P.Hu, X. Xu. 2012. Constituents of Palm Oil: characterization, processing and application. Lai, O.M., C.P. Tan, C.C. Akoh (eds). Palm Oil. Production, Processing, Characterization and Uses. AOCS Press: Champaign, Illinois, USA, pp. 471-526.

Zlatanov, M.D, M.J. Angelova-Romova, G.A. Antova, R.D Dimitrova, S.M. Momchilova, B.M. Nikolova-Damyanova. 2009. Variations in fatty acids, phospholipids and sterols during the seed development of a high oleic sunflower variety. J. Am. Oil Chem. Soc. 86: 867-875.



Objetivos

Objetivos

1. Puesta a punto y validación de un método para el análisis de fitoesteroles en semillas de girasol.
2. Identificación de semillas alto oleico en ricino mediante espectroscopía por reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).
3. Uso de la espectroscopia de infrarrojo cercano para el análisis del contenido en aceite y perfil de ácidos grasos en harina de almendras.
4. Caracterización química y estabilidad oxidativa de aceites de cártamo alto oleico con niveles elevados de gamma-tocoferol.



Capítulo 1

Puesta a punto y validación de un método para el análisis de fitoesteroles en semillas de girasol

Álvaro Fernández-Cuesta, Marta R. Aguirre-González, María V. Ruiz-Méndez and Leonardo Velasco

Validation of a method for the analysis of phytosterols in sunflower seeds

European Journal of Lipid Science and Technology, 114: 325-331 (2012)

Research Article

Validation of a method for the analysis of phytosterols in sunflower seeds**Álvaro Fernández-Cuesta¹, Marta R. Aguirre-González², María V. Ruiz-Méndez² and Leonardo Velasco¹**¹ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Alameda del Obispo s/n, Córdoba, Spain² Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Sevilla, Spain

Phytosterols are natural compounds that contribute to lower serum cholesterol in humans. Sunflower seeds and oils are rich sources of phytosterols. Breeding for phytosterol content in sunflower has been scarce thus far, mainly because of the lack of analytical methods suitable for use in plant breeding. The objective of this research was to validate a method for the analysis of phytosterols in small seed samples of sunflower. Samples consisting of six seeds were analyzed for phytosterol content in a set of 87 inbred lines using a method adapted to small samples. The accuracy of the method was evaluated through the standard error of the analysis of replicates of ground samples, which was 72.12 mg/kg compared to average values of 1665.3 and 1887.2 mg/kg seed in the samples. Sunflower inbred lines showed ranges of variation from 1426.0 to 4710.0 mg/kg seed and from 2855.2 to 9752.0 mg/kg oil. The method correlated strongly with the conventional method based on the analysis of extracted oils ($r = 0.85$). The results indicated that analysis of phytosterols on samples consisting of sunflower seeds is an accurate approach for breeding and genetic studies, in which extraction of the seed oil is not feasible.

Practical applications: Phytosterols are usually analyzed in extracted oils. However, studies in plant breeding and plant sciences often require a direct analysis of phytosterols in seeds, without previous oil extraction (e.g. large-scale screening of germplasm in breeding programs or genetic studies). Our results will be useful for plant scientists interested in the analysis of phytosterols in small samples of plant tissues.

Keywords: Oil analysis / Phytosterols / Seed analysis / Sunflower seeds

Received: April 9, 2011 / Revised: June 30, 2011 / Accepted: August 17, 2011

DOI: 10.1002/ejlt.201100138

1 Introduction

Phytosterols or plant sterols are natural constituents of plants that belong to the group of isoprenoids. They play essential functions in plant cells such as regulation of fluidity and permeability of cell membranes in a similar manner to cholesterol in mammalian cell membranes [1]. Ingestion of phytosterols prevents intestinal absorption of cholesterol in humans, resulting in a lowering of serum cholesterol [2]. These findings stimulated interest in the use of phytosterols and related compounds (phytosterol esters, phytostanol, and

phytostanol esters) for enrichment of food products [3]. The use of phytosterols as enriched food ingredients in functional foods has increased in recent years [4], though the effect of phytosterols is also exerted as natural components of regular diet [5].

Sunflower seeds and oils are rich sources of phytosterols [6–8]. However, no breeding research has been conducted to increase phytosterol content in sunflower seeds [9]. For other important seed quality traits such as tocopherols, breeding research led to the development of germplasm with modified tocopherol profiles [10, 11] or increased total tocopherol accumulation in the seeds [12]. Studies in canola reported high heritability estimates for phytosterol content in seeds, suggesting that the trait is amenable to selection [13]. However, the lack of analytical methods for phytosterol analysis suitable for use in plant breeding programs has been

Correspondence: Dr. Leonardo Velasco, Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14004 Córdoba, Spain
E-mail: lvelasco@ias.csic.es
Fax: +34 957 499252

a deterrent for selection for this trait in sunflower and in other major oilseed crops.

The most common methods for determination of phytosterols involve extraction of the lipid fraction followed by alkaline hydrolysis, extraction of the unsaponifiable fraction, derivatization of phytosterols, and separation and quantification by GC [14]. Alternatively, methods for direct saponification of the samples without previous extraction of the lipid fraction have been developed [14–16]. These methods have been adapted to the analysis of phytosterol content in oil seeds, both in canola [13] as well as in sunflower [17]. In sunflower, breeding for seed quality traits selection is usually conducted at a single plant level, except for traits such as fatty acid profile that are under embryogenic control [9]. This means that only a reduced number of seeds from a single plant can be used for the analysis, the rest of the seeds being used to continue selection. For selection to be effective, the analysis of phytosterol content on a reduced seed sample should show good correlation with the phytosterol content of the extracted oil. The objective of this research was to validate a method for the analysis of phytosterols in small seed samples of sunflower by comparing the results with those obtained using a conventional method of analysis of phytosterols of the extracted seed oils.

2 Materials and methods

2.1 Plant materials

A set of 87 sunflower inbred lines covering broad variation for genetic background as well as seed quality traits such as oil content, fatty acid profile, and tocopherol content and profile was selected for the study. Plants of the 87 inbred lines were grown in the field in the spring-summer season of 2008 in Córdoba, Spain, in rows 5-m-long with 1-m-spacing between rows and 0.25-cm-spacing between plants in the row. Sunflower heads were bagged before flowering to force

self-pollination. Seeds of all plants of each inbred line were bulked at harvest. Table 1 shows the average content and range of variation for seed traits and seed quality traits in the set of 87 inbred lines.

2.2 Analysis of phytosterol content in sunflower seeds

The method of analysis of phytosterols in sunflower seeds was adapted from previously published methods [13, 17–18]. Three replicates were analyzed per inbred line. For each replicate, six sunflower achenes were husked and the seeds (husked achenes) placed in 10-mL propylene tubes. Two-hundred microliters of internal standard solution prepared by dissolving cholesterol (99% purity, reference C8667, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in hexane-ethanol (3:2) solution at a concentration of 0.1%. Alkaline hydrolysis was performed by adding 2 mL of a solution of potassium hydroxide dissolved in ethanol at a concentration of 2%. Seeds were crushed and homogenized in a homogenizer (Heidolph RC 500, Kelheim, Germany) equipped with a stainless-steel rod of 8 mm diameter at a speed of 5000 rpm for about 15 s. Seed rests in the rod were washed with 1 mL of the ethanolic solution of potassium hydroxide and collected in the tube. The tubes were then left in a water bath at 80°C for 15 min. Phytosterols were extracted by vortexing with 1 mL hexane and 1.5 mL water. The upper hexane layer was transferred to 2-mL glass vials that were maintained in an oven at 37.5°C overnight. Fifty microliters hexane and 50 µL silylating mixture composed of pyridine:hexamethyldisilazane:trimethylchlorosilane 9:3:1 by volume (silan-sterol-1, reference 355650.0922, Panreac Química, Barcelona, Spain) were added to the dried pellets and the vials were left at RT for 15 min. The solution was transferred to 2-mL vials containing 200 µL inserts and centrifuged at 4000 rpm for 10 min (Unicen 21, Ortoalresa, Madrid, Spain). The vials were capped and conserved at –20°C.

Table 1. Seed traits in a set of 87 sunflower inbred lines

See quality trait	Mean ± SD	Minimum	Maximum
Thousand-achene weight (g)	67.4 ± 33.5	18.5	210.7
Achene oil content (% achene wt, dm)	35.1 ± 7.5	16.6	47.4
Kernel oil content (% kernel wt, dm)	48.8 ± 7.1	31.9	65.8
Palmitic acid (% fatty acids)	8.1 ± 6.0	3.6	32.2
Stearic acid (% fatty acids)	4.4 ± 2.8	1.4	26.4
Oleic acid (% fatty acids)	41.7 ± 16.9	10.0	90.5
Linoleic acid (% fatty acids)	45.3 ± 17.1	2.1	71.6
Tocopherol content (mg/kg kernel, dm)	299 ± 79	85	467
Tocopherol content (mg/kg oil)	621 ± 178	165	1050
Alpha-tocopherol (% tocopherols)	83.8 ± 31.1	0.4	99.5
Beta-tocopherol (% tocopherols)	4.9 ± 10.8	0.0	59.0
Gamma-tocopherol (% tocopherols)	8.6 ± 25.5	0.0	98.4
Delta-tocopherol (% tocopherols)	2.8 ± 12.1	0.0	68.0

Gas chromatographic analysis was performed on a Perkin Elmer Clarus 600 GC equipped with a ZB-5 capillary column (id = 0.25 mm, length = 30 m, film thickness = 0.10 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Hydrogen was used as carrier gas at a pressure of 125 kPa. Split injector and FID were maintained at 320°C. The oven thermal regime was the following: initial temperature of 240°C was increased at 5°C/min to final temperature of 265°C and held for 10 min. Total analytical time was 15 min.

2.3 Determination of the standard error of the method

The accuracy of the method of analysis of phytosterols in sunflower seeds was determined by calculating the standard error of the analysis of 48 replicates of two different ground samples, using an amount of flour equivalent to the weight of six sunflower kernels. The standard error was calculated following Windham et al. [19]:

$$SE = \sqrt{\frac{\sum_i \frac{\sum_j (X_{ij} - X_j)^2}{R - 1}}{N}}$$

where X_{ij} is the j th replicate on the i th sample, X_j is the mean value of all replicates of an i th sample, R is the number of replicates, and N is the number of samples.

2.4 Seed oil extraction

Seed oil was extracted using the official method UNE 55-062-80 [20]. About 15–20 g of sunflower seeds dry to constant weight in a vacuum oven at 70°C were crushed and solvent-extracted during 4 h using hexane in continuous soxhlet extractors. After this time, excess solvent was removed.

2.5 Analysis of phytosterol content in sunflower oils

Phytosterol content and composition in sunflower oil was analyzed in a two-step process comprising extraction of the unsaponifiable fraction by the method UNE 55-004-73 [20] and determination of sterols by the method UNE 55-019-73 [20]. For extraction of the unsaponifiable fraction, 50 mL ethanolic KOH 2 M were added to 2.5 ± 0.001 g of crude oil and 1 mg of 5 α -cholestan-3 β -ol used as internal standard (reference 26710, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and heated during 2 h [21]. The unsaponifiable matter was extracted three times with 50 mL ether.

The unsaponifiable matter was separated into subfractions on preparative silica gel TLC with hexane:ether:acetic acid (70:30:1, by volume) as developing solvent. The bands corresponding to phytosterols were scraped off the plate and eluted with dichloromethane. Phytosterols were converted to their corresponding trimethylsilyl ether derivatives by the addition of 200 μL silylating mixture composed of pyridine:-

hexamethyldisilazane:trimethylchlorosilane 9:3:1 by volume (silan-sterol-1, reference 355650.0922, Panreac Química, Barcelona, Spain) and heated at 60°C during 15 min. GC analyses were performed using an Agilent 7890 GC equipped with a FID, a PTV (programmed temperature vaporizing) injector, and a HP-5 capillary column (id = 0.25 mm, length = 15 m, film thickness = 0.22 μm ; Agilent, Avondale, PA, USA). Hydrogen was used as carrier gas at a flow of 10 mL/min. Split injector and FID were maintained at 350°C. The oven thermal regime was the following: initial temperature of 75°C during 1 min was increased at 40°C/min to final temperature of 250°C for 30 min. Total analytical time was 35.4 min.

2.6 Analysis of fatty acids and tocopherols

The fatty acid profile of the seed oil and the seed tocopherol content and profile were analyzed on three replicates of six seeds. Fatty acid analyses were done following the method described in ref. [22], using a gas-liquid chromatograph PE Autosystem XL (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA) equipped with a 2-m long column packed with 3% SP-2310/2% SP-2300 on Chromosorb WAW (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). The oven, injector, and FID were maintained at 195, 275, and 250°C, respectively. Tocopherol content and profile was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described in ref. [23] using a fluorescence detector (model 2475, Waters Corporation, Milford, MA, USA) at 295 nm excitation and 330 nm emission and iso-octane/tert-butylmethylether (94:6) as eluent at an isocratic flow rate of 0.7 mL/min. Chromatographic separation of the tocopherols was performed on a LiChrospher 100 diol column (250 mm \times 3 mm I. D.) with 5- μm spherical particles, connected to a silica guard column (LiChrospher Si 60, 5 mm \times 4 mm I. D.). Quantitative determination of tocopherols was carried out using external calibration curves. Total tocopherol content was calculated as the sum of alpha-, beta-, gamma-, and delta-tocopherol content expressed as mg/kg seed. The peak areas of the individual tocopherols were corrected according to their previously calculated response factors: alpha-tocopherol = 1.0; beta-tocopherol = 1.80; gamma-tocopherol = 1.85; delta-tocopherol = 2.30.

2.7 Statistical analyses

Comparison of means between data obtained by analysing seeds and extracted oils was conducted through paired t -tests. Simple correlation coefficients (r) between both types of analyses were also calculated. The significance of the correlation coefficients was calculated by the standard testing procedures for $r = 0$ null hypothesis [24]. The analyses were conducted using SPSS statistical package release 19.0.0.

3 Results

The accuracy of the method of analysis of phytosterols in sunflower seeds was evaluated through calculation of the standard error of the analysis of replicates of ground samples, which were used instead of intact seeds in order to minimize the effect of genetic variation among seeds. The results revealed a standard error of 72.12 mg/kg based on two samples that averaged 1665.29 and 1887.19 mg/kg, respectively. Accordingly, the average coefficient of variation attributable to the analytical method was 4.06%, assuming complete homogeneity of the ground seed samples.

The set of 87 sunflower inbred lines showed large variation for seed phytosterol content, measured on samples of six seeds, from 1426.0 to 4710.0 mg/kg seed. Seed phytosterol values were converted into oil phytosterol values by considering the percentage of kernel in the achene, which ranged from 45.6 to 83.7% and the achene oil content, which ranged from 16.6 to 47.4%. The so-calculated oil phytosterol content ranged from 2855.2 to 9752.0 mg/kg oil.

Table 2 shows a comparison of the results obtained by the analysis of phytosterols on husked achenes and those obtained by the analysis of extracted oils from the set of 87 sunflower inbred lines. The average oil phytosterol content determined on the extracted oils was 4704 mg/kg oil, which was not significantly different from the average phytosterol content determined on husked achenes and converted to phytosterol content in the oil (4694.9 mg/kg oil). Correlation between oil phytosterol content determined using both methods was 0.85 (Fig. 1), indicating that the analysis of phytosterols on samples consisting of six husked achenes provides a reliable estimation of the phytosterol content analyzed on the extracted oil.

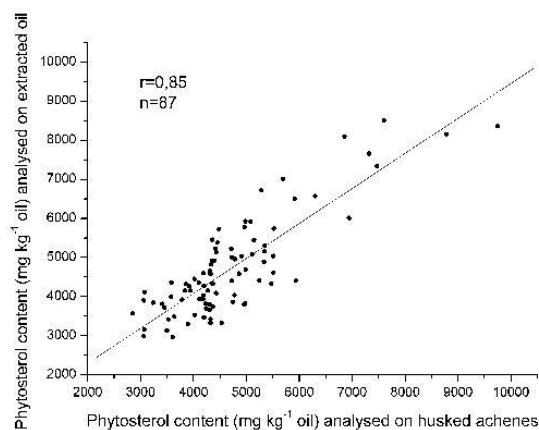


Figure 1. Scatter plot of oil phytosterol content (mg/kg oil) in a set of 87 sunflower inbred lines analyzed using a method based on the analysis of six husked achenes versus a conventional method based on the analysis of the extracted oil.

In contrast to the results obtained for total phytosterol content, both methods of analysis showed small but significant differences for phytosterol profile. Considering the four major phytosterols, the analysis of the extracted oil in the set of 87 sunflower inbred lines averaged 8.5% campesterol, 8.7% stigmasterol, 59.5% beta-sitosterol, and 14.0% delta-7-stigmastenol, whereas it averaged 8.0% campesterol, 8.1% stigmasterol, 56.7% beta-sitosterol, and 17.6% delta-7-stigmastenol in the analysis of husked achenes. Despite such small discrepancies, probably due to differences in

Table 2. Phytosterol content (mg/kg seed oil) and profile (% total phytosterols) in a set of 87 sunflower inbred lines analyzed using a conventional method based on the extracted oil and a method based on six husked achenes, and comparison of both methods through paired *t*-tests for comparison of means and coefficients of correlation^{a)}

Trait	Analysis of extracted oil	Analysis of husked achenes	<i>t</i> -test ^{b)}	<i>r</i>
Phytosterol content	4704 ± 1266	4695 ± 1199	0.12 ns	0.85**
Campesterol	8.5 ± 2.4	8.0 ± 2.7	5.03**	0.94**
Stigmasterol	8.7 ± 1.7	8.1 ± 1.7	7.38**	0.90**
Delta-7-campesterol	2.5 ± 1.1	2.0 ± 0.6	4.22**	0.39**
Clerosterol	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3	-1.00 ns	0.16 ns
Beta-sitosterol	59.5 ± 4.3	56.7 ± 4.3	10.25**	0.82**
Delta-5-avenasterol	2.0 ± 1.2	1.5 ± 1.5	2.81**	0.41**
Delta-5,24-stigmastadienol	0.9 ± 0.8	1.6 ± 1.1	-4.98**	0.02 ns
Delta-7-stigmastenol	14.0 ± 4.7	17.6 ± 4.7	-16.08**	0.90**
Delta-7-avenasterol	2.9 ± 0.9	3.5 ± 0.9	-8.16**	0.75**

^{a)} For comparison of both methods, seed phytosterol content determined on husked achenes was converted to oil phytosterol content using previously determined achene oil content and percentage of kernel in the achene.

^{b)} ns, not significant; *, significant at $p < 0.05$; **, significant at $p < 0.01$.

chromatographic conditions, correlation coefficients between the percentages of individual phytosterols using both methods of analysis were very high: 0.94 for campesterol, 0.90 for stigmasterol, 0.82 for beta-sitosterol, and 0.90 for delta-7-stigmasterol (Fig. 2). The high correlation coefficients suggest that the method of analysis of phytosterols in husked achenes is reliable enough for selecting for phytosterol profile in sunflower.

Kernel phytosterol content was negatively correlated with thousand-achene weight ($r = -0.48$, $p < 0.01$). Oil phytosterol content was negatively correlated with thousand-achene weight ($r = -0.32$, $p < 0.01$) and percentage of kernel in the achene ($r = -0.32$, $p < 0.01$). Also, oil phytosterol content was positively correlated with kernel phytosterol content ($r = 0.77$, $p < 0.01$) and negatively correlated with achene oil content ($r = -0.50$, $p < 0.01$) and kernel oil content ($r = -0.52$, $p < 0.01$). Both kernel phytosterol content and oil phytosterol content were negatively correlated with the percentage of delta-5,24-stigmastadienol. Correlation coefficients between individual phytosterols are shown in

Table 3. Positive correlations coefficients were observed between beta-sitosterol and campesterol, between delta-7-campesterol, delta-7-stigmasterol, and delta-7-avenasterol, and between delta-5-avenasterol and delta-7-avenasterol. Beta-sitosterol was negatively correlated with stigmasterol, delta-7-campesterol, 5-avenasterol, delta-7-stigmasterol, and delta-7-avenasterol. Stigmasterol was also negatively correlated with clerosterol and delta-5,24-stigmastadienol, whereas the strongest negative correlation involved campesterol and delta-7-stigmasterol.

4 Discussion

Breeding research to modify phytosterol content and profile in sunflower has been scarce thus far. One of the bottlenecks for breeders to work with phytosterols is that most analytical methods for phytosterol extraction and derivatization are rather sophisticated and require previous extraction of the seed oil [13]. To facilitate the analysis of phytosterols in breeding programs, research was conducted in sunflower

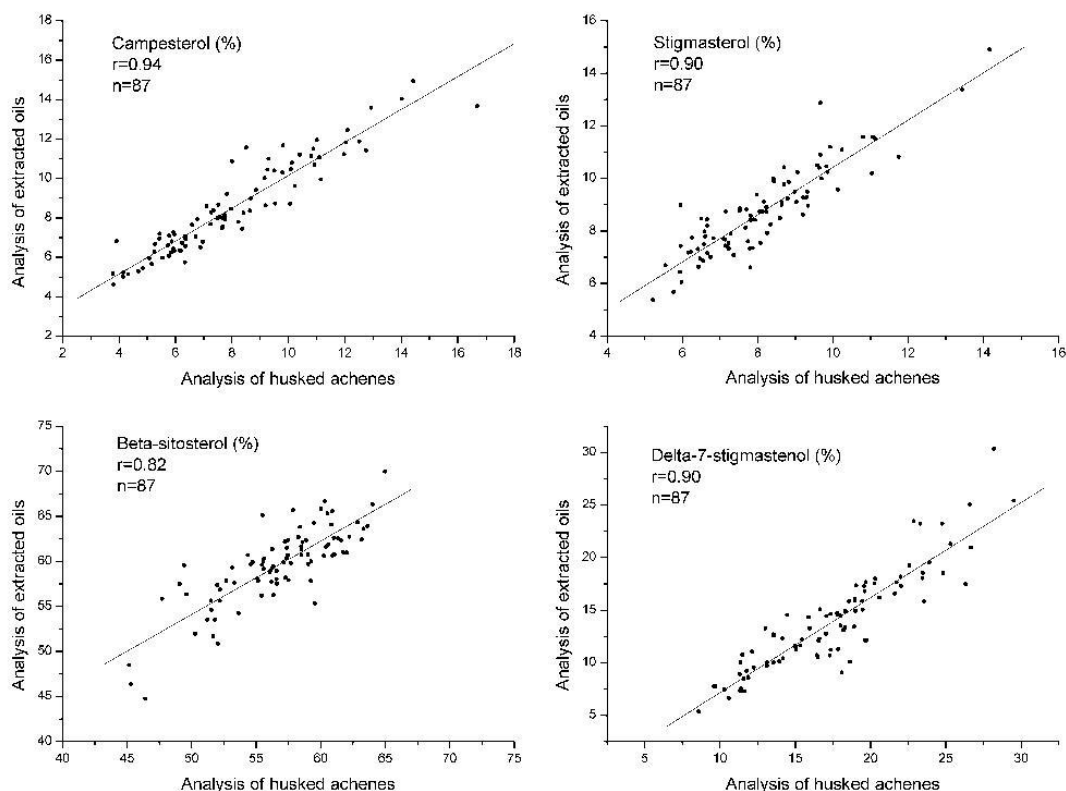


Figure 2. Scatter plot of the percentage of major phytosterols in a set of 87 sunflower inbred lines analyzed using a method based on the analysis of six husked achenes versus a conventional method based on the analysis of the extracted oil.

Table 3. Correlation coefficients between individual phytosterols expressed as percent of the total phytosterol content^{a)}

	Stig	7-Camp	Clero	B-Sito	5-Ave	5,24-Stig	7-Stig	7-Ave
Camp	0.19	−0.20	−0.15	0.26*	0.00	−0.16	−0.76**	−0.20
Stig		−0.01	−0.41**	−0.30**	0.04	−0.45**	−0.09	0.09
7-Camp			−0.13	−0.67**	−0.02	0.01	0.56**	0.32**
Clero				0.27*	−0.05	0.19	−0.07	−0.11
B-Sito					−0.30**	−0.17	−0.67**	−0.43**
5-Ave						0.19	−0.15	0.31**
5,24-Stig							0.12	−0.08
7-Stig								0.16

^{a)} Camp, campesterol; Stig, stigmasterol; 7-Camp, delta-7-campesterol; Clero, clerosterol; B-Sito, beta-sitosterol; 5-Ave, delta-5-avenasterol; 5,24-Stig, delta-5,24-stigmastadienol; 7-Stig, delta-7-stigmastenol; 7-Ave, delta-7-avenasterol.

[25] and rapeseed [26] to develop near-IR reflectance spectroscopy (NIRS) calibration equations for rapid screening of breeding materials. However, the results obtained in sunflower revealed a poor correlation between NIRS predicted and actual phytosterol values [25]. Alternatively, several authors have developed methods for direct extraction and derivatization of phytosterols from small amounts of seeds without previous oil extraction [13, 17]. However, it has not been reported how such methods correlate with conventional methods based on analysis of the extracted oil. The results of the present research indicated that the analysis of phytosterols on sunflower seeds is highly accurate, as it shows a low standard error in the analysis of replicates of ground sunflower seeds. Also, oil phytosterol content estimated from seed phytosterol content, percentage of kernel in the achene, and achene oil content correlates strongly with the analysis of phytosterols on the extracted oil.

Oil phytosterol content will depend on both the seed phytosterol content and the seed oil content. For instance, a sunflower germplasm with 60% seed oil content and phytosterol content of 2500 mg/kg seed will yield an oil with a theoretical phytosterol content of 4167 mg/kg oil, whereas a sunflower germplasm with 40% seed oil content and phytosterol content of 2500 mg/kg seed will yield an oil with a theoretical phytosterol content of 6250 mg/kg oil. As biosynthetic pathways of TAGs and phytosterols are not directly related [1, 27], analysis of phytosterols in the extracted oil in a set of sunflower accessions or lines does not provide information on genetic differences for phytosterol biosynthesis, as such differences may be masked by differences in seed oil content. Accordingly, the analysis of phytosterols in seeds is preferred for genetic and breeding studies to the analysis of phytosterols in extracted oils. Additionally, breeding programs involve the use of small amounts of seeds, particularly in the initial steps, which precludes the possibility of extracting the seed oil. The present research demonstrated that phytosterols can be accurately determined on small samples of just six sunflower seeds, which is an optimal situation for genetic and breeding studies.

There is little information on the variability for phytosterol content in sunflower germplasm. This research was based on 87 sunflower lines thoroughly selected for variation in seed and seed quality traits such as achene size, oil content, fatty acid profile, and tocopherol content and profile. Even though the number of lines included was low and they were grown only in a single environment, the results revealed large variation for seed phytosterol content, with a range of variation from 1426.0 to 4710.0 mg/kg seed and from 2855.2 to 9752.0 mg/kg oil. Previous studies including sunflower genotypes grown over a range of years and locations reported a range of variation between 1798 and 4713 mg/kg oil [25] and between 2100 and 4540 mg/kg oil [28]. Still higher variation should be expected in the evaluation of large germplasm collections. Further studies are required to determine the heritability of the trait and its amenability to selection. In rapeseed, high heritability values from 0.84 to 0.91 have been determined, suggesting a good response to selection [13].

To sum up, the results presented show that analysis of phytosterols in samples consisting of a few sunflower seeds is an accurate approach for breeding and genetic studies, in which extraction of the oil from the seeds is not feasible.

The authors thank Alberto Merino and Angustias Jiménez for technical assistance. This work was supported by research project P07-AGR-03011 from Junta de Andalucía and EU FEDER funds.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Hartmann, M. A., Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* 1998, 3, 170–175.
- [2] Pollack, O. J., Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* 1953, 7, 702–706.
- [3] Berger, A., Jones, P. J. H., Abumweis, S. S., Plant sterols: Factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis.* 2004, 3, 5.

- [4] Hearly, A., Duffy, E., Joyce, J., O'Connor, C. et al., Phytosterol-enriched products on the Irish market: Examination of intake and consumption patterns. *Public Health Nutr.* 2008, 12, 51–58.
- [5] Andersson, S. W., Skinner, J., Ellegård, L., Welch, A. A. et al., Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: A cross-sectional study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004, 58, 1378–1385.
- [6] Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Ashraf-Khorassani, M., Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 9436–9445.
- [7] Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Toivo, J. I., Swank, M. A., Simpkins, A. H., Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J. Food Comp. Anal.* 2002, 15, 123–142.
- [8] Normén, L., Ellegård, L., Brants, H., Dutta, P., Andersson, H., A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. *J. Food Comp. Anal.* 2007, 20, 193–201.
- [9] Fernández-Martínez, J. M., Perez-Vich, B., Velasco, L., in: Vollmann, J., Rajcan, I. (Eds.), *Oil Crop Breeding*, Springer, New York (USA) 2009, pp. 155–232.
- [10] Demurin, Y., Škorić, D., Karlovic, D., Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. *Plant Breed.* 1996, 115, 33–36.
- [11] Velasco, L., Domínguez, J., Fernández-Martínez, J. M., Registration of T589 and T2100 sunflower germplasms with modified tocopherol profiles. *Crop Sci.* 2004, 44, 361–362.
- [12] Velasco, L., Del Moral, L., Pérez-Vich, B., Fernández-Martínez, J. M., Selection for contrasting seed tocopherol content in sunflower seeds. *J. Agric. Sci.* 2010, 148, 393–400.
- [13] Amar, S., Becker, H. C., Möllers, C., Genetic variation and genotype × environment interactions of phytosterol content in three doubled haploid populations of winter rapeseed. *Crop Sci.* 2008, 48, 1000–1006.
- [14] Toivo, J., Lampi, A. M., Aalto, S., Piironen, V., Factors affecting sample preparation in the gas chromatographic determination of plant sterols in whole wheat flour. *Food Chem.* 2000, 68, 239–245.
- [15] Klatt, L. V., Mitchell, B. A., Smith, R. L., Cholesterol analysis in foods by direct saponification-gas chromatographic method: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 1995, 78, 75–79.
- [16] Kovacs, M. I. P., Determination of cholesterol in pasta products using gas–liquid chromatography. *J. Cereal Sci.* 1990, 11, 291–297.
- [17] Roche, J., Alignan, M., Bouniols, A., Cerny, M. et al., Sterol concentration and distribution in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) during seed development. *Food Chem.* 2010, 119, 1451–1456.
- [18] Bruni, R., Medici, A., Guerrini, A., Scalia, S. et al., Tocopherol, fatty acid and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. *Food Chem.* 2002, 77, 337–341.
- [19] Windham, W. R., Mertens, D. R., Barton, F. E., in: Marten, G. C., Shenk, J. S., Barton, F. E. (Eds.), *USDA-ARS Agricultural Handbook No. 643. Near Infrared Reflectance Spectroscopy: Analysis of Forage Quality*, U.S. Government Printing Office, Washington (USA) 1989, pp. 96–103.
- [20] Asociación Española de Normalización, Catálogo de Normas UNE. Madrid (Spain) 1991.
- [21] Herchi, W., Harrabi, S., Sebei, K., Rochut, S. et al., Phytosterols accumulation in the seeds of *Linum usitatissimum* L. *Plant Physiol. Biochem.* 2009, 47, 880–885.
- [22] Garcés, R., Mancha, M., One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 1993, 211, 139–143.
- [23] Velasco, L., Pérez-Vich, B., Fernández-Martínez, J. M., Novel variation for tocopherol profile in a sunflower created by mutagenesis and recombination. *Plant Breed.* 2004, 123, 490–492.
- [24] Snedecor, G. W., Cochran, W. G., *Statistical Methods*, 8th Edn., Iowa State University Press, Ames, IA (USA) 1989.
- [25] Ayerdi Gotor, A., Farkas, E., Berger, M., Labalette, F. et al., Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007, 109, 525–530.
- [26] Amar, S., Becker, H. C., Möllers, C., Genetic variation in phytosterol content of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibration equations. *Plant Breed.* 2009, 128, 78–83.
- [27] Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J. G., Ohlrogge, J. B., in: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD (USA) 2000, pp. 456–527.
- [28] Vlahakis, C., Hazebroek, J., Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2000, 77, 49–53.



Capítulo 2

Identificación no destructiva de semillas con alto contenido en ácido oleico en ricino mediante espectroscopía por reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).

Álvaro Fernández-Cuesta, José Fernández-Martínez and Leonardo Velasco

Identification of High Oleic Castor Seeds by Near Infrared Reflectance Spectroscopy

Journal of the American Oil Chemists' Society, 89: 431-435 (2012)

J Am Oil Chem Soc (2012) 89:431–435
DOI 10.1007/s11746-011-1933-6

ORIGINAL ARTICLE

Identification of High Oleic Castor Seeds by Near Infrared Reflectance Spectroscopy

Álvaro Fernández-Cuesta · José M. Fernández-Martínez ·
Leonardo Velasco

Received: 4 May 2011 / Revised: 29 July 2011 / Accepted: 18 August 2011 / Published online: 30 August 2011
© AOCs 2011

Abstract Castor oil contains a high proportion (>80%) of the unusual hydroxy fatty acid ricinoleic acid. Additionally, a mutant with high oleic acid content (>70%) has been developed. Both fatty acids differ in the presence of an OH group in the C18 tail (ricinoleic acid). The objective of this research was to evaluate whether near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) can be used to discriminate between high oleic and high ricinoleic acid seeds. Eight hundred and seventy-two individual seeds collected in 2008, 688 high ricinoleic and 184 high oleic, were scanned by NIRS and further analyzed by GLC. As high oleic/low ricinoleic acid content is recessive and no intermediate fatty acid levels occur, the spectral data was subjected to linear discriminant analysis, which correctly classified all the seeds. The discriminant function was validated with a set of 637 seeds collected in 2009 from segregating populations, which were correctly classified in all cases. NIRS discrimination between oleic and ricinoleic acid was mainly based on spectral regions around 1,400 and 1,914 nm, putatively associated with the absorbance of the OH group. The results confirmed that NIRS provides an effective means of discriminating between high oleic and high ricinoleic acid seeds.

Keywords Castor seeds · Linear discriminant analysis · Near infrared reflectance spectroscopy · NIRS · Oleic acid · Ricinoleic acid · *Ricinus communis* L.

Introduction

Castor (*Ricinus communis* L.) is an oilseed crop characterized by a high oil content in the seeds, between 42 and 58%, which contains a high proportion of ricinoleic acid (12-hydroxy-9-*cis*-octadecenoic acid), a monounsaturated hydroxy fatty acid that accounts for more than 80% of the total fatty acids in the oil. Castor oil is very versatile as a raw material in many chemical industries such as paints, coatings, inks, lubricants and a wide variety of other products [1]. In addition to the high ricinoleic acid castor, a mutant in which ricinoleic acid is partly replaced by oleic acid, which accounts for more than 70% of the total fatty acids, has been developed [2]. High oleic acid castor oil is a promising alternative for uses such as biodiesel production, where oleic acid is preferred to ricinoleic acid due to the latter conferring a high viscosity to biodiesel, which must be corrected through the use of blends [3].

The concentration of oleic acid and ricinoleic acid in castor seeds is controlled by the genotype of the developing embryo, i.e. genetic variation for the traits can be identified at the single-seed level. Seeds in segregating populations are either high ricinoleic (>80%) or high oleic (>70%), with no occurrence of intermediate levels [4]. Rapid and cost-effective methods are required to discriminate between high oleic and high ricinoleic acid seeds in breeding programs.

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) has been extensively used to estimate the fatty acid profile in single seeds of sunflower [5–8], rapeseed [9–11], peanut [12], and corn [13]. In all cases, NIRS was used to discriminate between major fatty acids such as stearic, oleic and linoleic acid, which differ in the number of double bonds in their molecules (18:0 stearic acid, 18:1 oleic acid, 18:2 linoleic acid). Near-infrared spectral differences associated with the

A. Fernández-Cuesta · J. M. Fernández-Martínez ·
L. Velasco (✉)
Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC),
Alameda del Obispo s/n, 14004 Córdoba, Spain
e-mail: lvelasco@ias.csic.es

degree of fatty acid unsaturation have been identified between 1,600 and 1,800 nm and between 2,100 and 2,200 nm [5, 6, 14].

Ricinoleic acid is isostructural with oleic acid, with the only difference being the presence of a hydroxyl group in position 12 of the C18 molecule [15]. The objective of the present research was to evaluate whether NIRS can be used to discriminate between single castor seeds with high oleic acid or high ricinoleic acid content.

Materials and Methods

Castor Seeds

A germplasm collection of 90 castor accessions, all of them with high ricinoleic acid content in the seed oil, was multiplied in Córdoba in 2008. Seeds from all the accessions were bulked and 688 seeds from the bulk were scanned by NIRS and analyzed for their fatty acid profile by GLC as described below. Seeds from 24 plants derived from the high oleic acid mutant OLE-1 [2], grown in Córdoba in 2008, were collected and bulked. One hundred and eighty-four seeds from the high oleic acid bulk were scanned by NIRS and analyzed for their fatty acid profile by GLC. Thirty-five putative F_1 plants from crosses between the high oleic acid mutant OLE-1 and six castor cultivars with high ricinoleic acid content were grown in Córdoba in 2009. F_2 seeds were collected and bulked. Six hundred and thirty-seven F_2 seeds were scanned by NIRS and analyzed for fatty acid profile by GLC.

NIRS Scanning

Individual castor seeds were scanned on a monochromator model 6500 (Foss NIRSystems, Inc., Laurel, MD) using a spinning ring cup (ref. IH-0307, Infrasoft International, Port Matilda, PA) implemented with a Teflon adapter developed by the authors with an internal diameter of 14 mm. Individual castor seeds were placed in the adapter and the cup was closed with a cardboard back covered with aluminium foil, which maintained the seed fixed into the adapter regardless of seed size. The absorbance spectra (log 1/R) from 400 to 2,500 nm was recorded at 2 nm intervals.

Gas–Liquid Chromatography

A small seed portion was excised after NIRS scanning and analyzed for fatty acid profile. Fatty acid methyl esters were prepared by simultaneous extraction and methylation following the procedure described by Rojas-Barros et al. [2], then analyzed by GLC on a Perkin-Elmer Autosystem gas–liquid chromatograph (Perkin-Elmer Corporation,

Norwalk, CT, USA) with a 2-m-long column packed with 3% SP-2310/2% SP-2300 on Chromosorb WAW (Supelco, Bellefonte, PA, USA). A temperature program of 190°C for 10 min, increasing by 5°C min⁻¹ up to 225°C maintained for 10 min was used. The injector and flame ionization detector were held at 275 and 250°C, respectively.

Spectral and Discriminant Analysis

Original reflectance spectra were corrected prior to calibration by applying second derivative transformation, standard normal variate transformation and de-trend scatter correction. Second derivative was calculated from the log (1/R) spectra at gaps of five data points (10 nm) and a smoothing over segments of five data points (2, 5, 5, 1). The average spectrum of 688 high ricinoleic acid seeds collected in 2008 and the average spectrum of 184 high oleic acid seeds collected the same year were computed. Both average spectra of high ricinoleic and high oleic acid seeds were combined in a single file and their standard deviation spectrum was calculated in order to identify variation in spectral regions attributable to differences between high ricinoleic and high oleic acid seeds. Mathematical procedures on the spectral information were carried out with ISI software, version 3.10 (Infrasoft International, Port Matilda, PA).

A linear discriminant analysis (LDA) was conducted on the spectra from high ricinoleic ($n = 688$) and high oleic acid seeds ($n = 184$) collected in 2008. The discriminant function obtained was validated with the set of 637 seeds collected in 2009. LDA was conducted using The Unscrambler X Version 10.1 (Camo Software AS, Oslo, Norway).

Results and Discussion

A set of 688 seeds from high ricinoleic acid cultivars and a set of 184 seeds from high oleic acid genotypes were collected in 2008, scanned by NIRS and further analyzed by GLC. Seeds from high ricinoleic acid cultivars showed low oleic acid content ($6.0 \pm 2.8\%$) and high ricinoleic acid content ($86.4 \pm 2.5\%$) in GLC analyses (Fig. 1a). Seeds from high oleic acid genotypes showed high oleic acid content ($79.2 \pm 3.5\%$) and low ricinoleic acid content ($14.4 \pm 3.0\%$) in GLC analyses (Fig. 1b). No seeds with intermediate levels of both fatty acids were identified (Fig. 2a). F_2 seeds collected in 2009 from F_1 plants derived from crosses between high oleic and high ricinoleic acid plants segregated for low (1.5–13.6%; $n = 600$) and high oleic acid content (73.2–82.7%; $n = 37$), with no intermediate levels of this fatty acid in GLC analyses (Fig. 2b). Due to the bimodal distribution of oleic acid content in

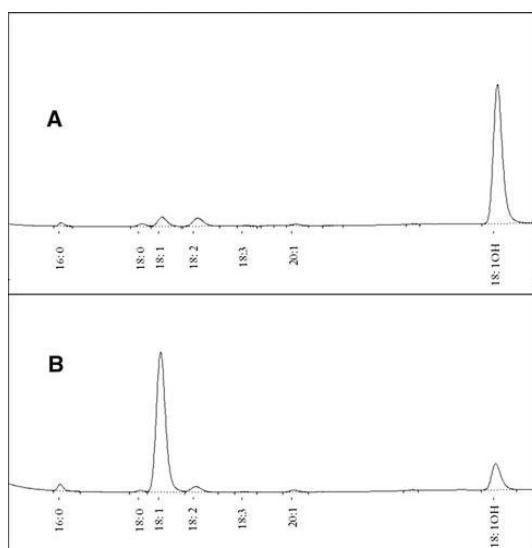


Fig. 1 GLC chromatograms of fatty acid methyl esters from low oleic/high ricinoleic acid (a) and high oleic/low ricinoleic acid (b) castor seeds. 16:0 = palmitic acid; 18:0 = stearic acid; 18:1 = oleic acid; 18:2 = linoleic acid; 18:3 = linolenic acid; 20:1 = eicosenoic acid; 18:1 OH = ricinoleic acid. Analysis time 17 min

castor seeds, the approach followed to identify high oleic acid seeds was a linear discriminant analysis rather than the development of a calibration equation.

Linear discriminant analysis on seeds collected in 2008 allowed the correct classification of 100% of the seeds into low oleic and high oleic acid classes (Fig. 3a). The application of LDA model developed in 2008 to a set of 637 seeds collected in 2009 also resulted in the correct classification of all the seeds into the fatty acid classes determined by GLC, i.e. 600 low oleic/high ricinoleic acid seeds were correctly classified into the low oleic class and 37 high oleic/low ricinoleic acid seeds were properly classified into the high oleic acid class (Fig. 3b).

A study was conducted to identify the most relevant spectral regions associated with NIRS discrimination between seeds with high ricinoleic acid and seeds with high oleic acid content. The average NIRS spectra of both types of seeds collected in 2008 differed for total absorbance throughout the whole scanning region (Fig. 4a), which was probably caused by differences in seed weight. High ricinoleic acid seeds had an average weight of 0.35 g (from 0.17 to 0.53 g), whereas high oleic acid seeds had an average weight of 0.27 g (from 0.18 to 0.46 g). Spectral differences between both types of seeds were minimized by applying several spectral transformations such as second derivative, standard normal variate transformation and de-trend scatter correction (Fig. 4b), which are intended to

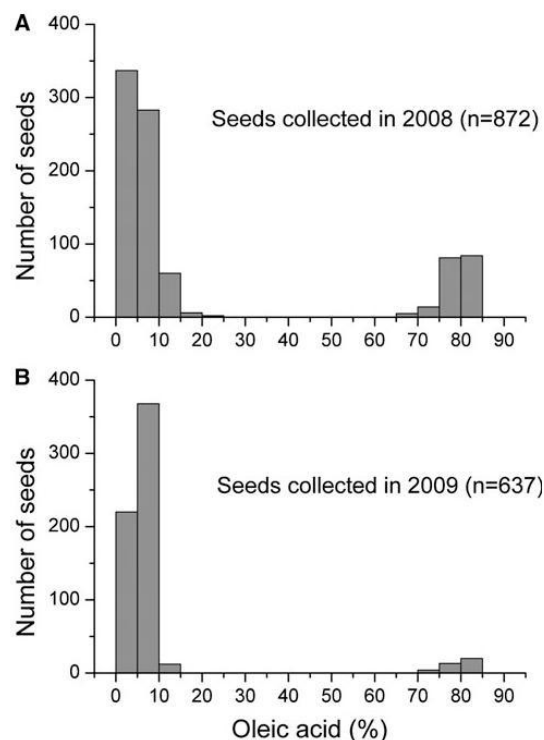


Fig. 2 Histograms of oleic acid content, determined by GLC, in castor seeds collected in 2008 (a) and 2009 (b)

minimize the influence of particle size, scatter coefficient, and path length on NIRS analysis [16].

As differences between average spectra were less evident after spectral corrections, the identification of spectral regions associated with differential absorption of high oleic and high ricinoleic acid seeds was conducted by computing the standard deviations between high oleic and high ricinoleic acid average spectra. Maximum standard deviation values were identified at 1,400 and 1,914 nm, with other peaks at 514, 1,170, and 1,686 nm (Fig. 5). The peak at 1,400 nm was particularly relevant, as several studies have associated this spectral region with the first overtone of OH stretch [17–20]. Differences between oleic acid ricinoleic acid lies precisely in the presence of an OH group in the ricinoleic acid C18 tail [15]. Figure 6 shows the average spectra of low oleic/high ricinoleic acid and high oleic/low ricinoleic acid seeds in the spectral region around 1,400 nm. The peak at 1,914 nm (Fig. 5) may be also related to the OH stretch in ricinoleic acid, as this wavelength region is associated with the absorption of the OH stretch in water molecules [18, 20]. Studies on sunflower showed that discrimination of individual seeds with high oleic acid content from those with high linoleic acid

Fig. 3 Classification of individual castor seeds collected in 2008 into low oleic and high oleic acid classes by linear discriminant analysis (a) and classification of seeds collected in 2009 with the model developed in 2008 (b)

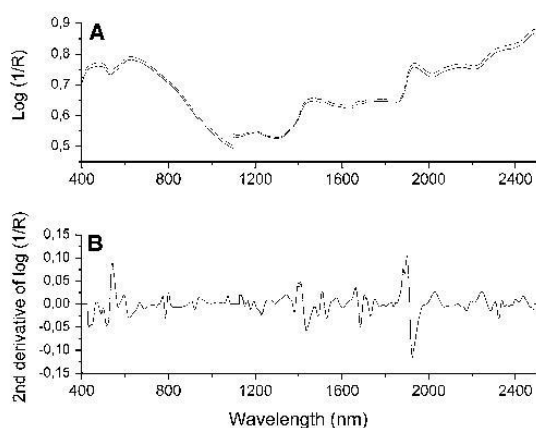
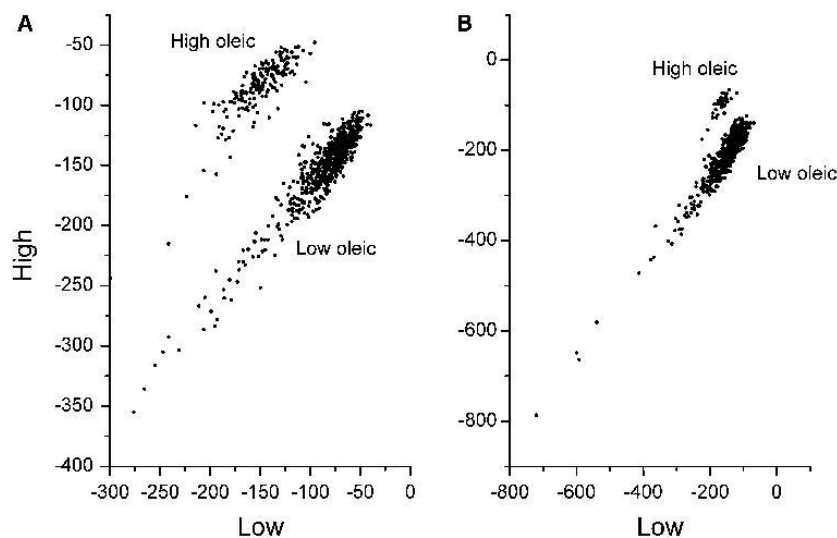


Fig. 4 Average near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) spectra of 688 individual seeds with low oleic/high ricinoleic acid (solid line) and 184 individual seeds with high oleic/low ricinoleic acid content (dotted line) (a), and the corresponding average spectra after applying second derivative transformation, standard normal variate transformation and de-trend scatter correction (b)

content was based on spectral differences associated with the degree of fatty acid unsaturation in the regions between 1,600 and 1,800 nm and between 2,100 and 2,200 nm [5, 6]. Even though differences in the region between 1,600 and 1,800 nm were also detected in this research (Fig. 5), major differences were observed in regions around 1,400 and 1,914 nm putatively associated with the presence of the OH group in ricinoleic acid.

Breeding for high oleic acid content in castor requires nondestructive analysis of the fatty acid profile at the

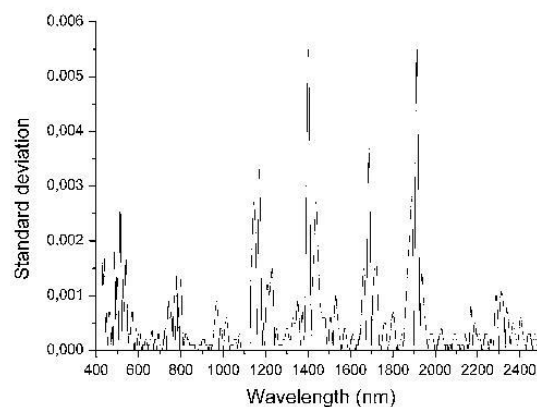


Fig. 5 Standard deviations between second derivative transformed average spectra of low oleic/high ricinoleic acid and high oleic/low ricinoleic castor seeds, respectively. Average spectra were computed from 688 individual seeds with low oleic/high ricinoleic acid and 184 individual seeds with high oleic/low ricinoleic acid content

single-seed level as the trait is gametophytic, i.e. it is controlled by the genotype of the developing embryo [4]. Nondestructive analysis of the fatty acid profile can be conducted using the half-seed technique that consists in excising a small seed portion from the seed part distal to the embryo, from which fatty acid methyl esters are prepared and further analyzed by GLC [2]. However, GLC analyses are expensive, time-consuming, and require the use of chemicals. The results of the present research suggest that accurate screening to identify individual seeds with high oleic acid content can be effectively conducted using NIRS.

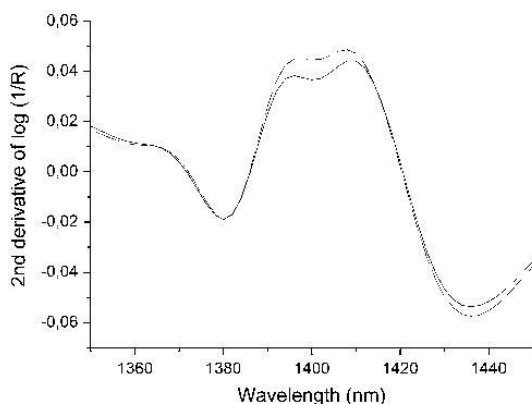


Fig. 6 Average near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) spectra from 1,350 to 1,450 nm of 688 individual seeds with low oleic/high ricinoleic acid (solid line) and 184 individual seeds with high oleic/low ricinoleic acid content (dotted line). Absorbance spectra were transformed by applying second derivative, standard normal variate, and de-trend scatter correction

Conclusion

The use of NIRS and linear discriminant analysis provides an effective means to discriminate between castor seeds with high oleic acid content and those with high ricinoleic acid content in a rapid and non-destructive manner. NIRS discrimination between both types of seeds is mainly based on spectral regions around 1,400 and 1,914 nm, putatively associated with the presence of an OH group in the ricinoleic acid molecule.

Acknowledgments The research was funded by Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía, Research Project P08-AGR03962 “Oilseeds with special triacylglycerols” and European Union FEDER funds.

References

- Ogunniyi DS (2006) Castor oil: a vital industrial raw material. *Bioresour Technol* 97:1086–1091
- Rojas-Barros P, De Haro A, Fernández-Martínez JM (2004) Isolation of a natural mutant in castor bean (*Ricinus communis* L.) with high oleic/low ricinoleic acid content. *Crop Sci* 44:76–80
- Conceição MM, Candeia RA, Silva FC, Bezerra AF, Fernandes VJ, Souza AG (2007) Thermoanalytical characterization of castor oil biodiesel. *Renew Sust Energy Rev* 11:964–975
- Rojas-Barros P, De Haro A, Fernández-Martínez JM (2005) Inheritance of high oleic/low ricinoleic acid content in the seed oil of castor mutant OLE-1. *Crop Sci* 45:157–162
- Sato T, Takahata Y, Noda T, Yanagisawa T, Morishita T, Sakai S (1995) Nondestructive determination of fatty acid composition of husked sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds by near infrared spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 72:1177–1183
- Velasco L, Pérez-Vich B, Fernández-Martínez JM (1999) Non-destructive screening for oleic and linoleic acid in single sunflower achenes by near-infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci* 39:219–222
- Velasco L, Pérez-Vich B, Fernández-Martínez JM (2004) Use of near-infrared reflectance spectroscopy for selecting for high stearic acid concentration in single husked achenes of sunflower. *Crop Sci* 44:93–97
- Biskupek-Korell B, Moschner CR (2006) Near-infrared spectroscopy (NIRS) for quality assurance in breeding, cultivation and marketing of high-oleic sunflowers. *Helia* 29:73–80
- Sato T, Uezono I, Morishita T, Tetsuka T (1998) Nondestructive estimation of fatty acid composition in seeds of *Brassica napus* L. by near-infrared spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 75:1877–1881
- Hom NH, Becker HC, Möllers C (2007) Non-destructive analysis of rapeseed quality by NIRS of small seed samples and single seeds. *Euphytica* 153:27–34
- Niewitzki O, Tillmann P, Becker HC, Möllers C (2010) A new near-infrared reflectance spectroscopy method for high-throughput analysis of oleic acid and linolenic acid content of single seeds in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Agric Food Chem* 58:94–100
- Tillman BL, Gorbet DW, Person G (2006) Predicting oleic and linoleic acid content of single peanut seeds using near-infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci* 46:2121–2126
- Weinstock BA, Janni J, Hagen L, Wright S (2006) Prediction of oil and oleic acid concentrations in individual corn (*Zea mays* L.) kernels using near-infrared reflectance hyperspectral imaging and multivariate analysis. *Appl Spectrosc* 60:9–16
- Pérez-Vich B, Velasco L, Fernández-Martínez JM (1998) Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 75:547–555
- Gyergyek S, Makovec D, Drogenik M (2011) Colloidal stability of oleic- and ricinoleic-acid-coated magnetic nanoparticles in organic solvents. *J Colloid Interface Sci* 354:498–505
- Shenk JS, Westerhaus MO (1995) Forage analysis by near infrared spectroscopy. In: Barnes RF, Miller DA, Nelson CJ (eds) *Forages, Volume II: The science of grassland agriculture*. Iowa State University Press, Ames, pp 111–120
- Holman RT, Edmondson PR (1956) Near-infrared spectra of fatty acids and some related substances. *Anal Chem* 28:1533–1538
- Goddu RF, Delker DA (1960) Spectra-structure correlations for the near-infrared region. *Anal Chem* 32:140–141
- Murray I, Williams PC (1987) Chemical principles of near-infrared technology. In: Williams PC, Norris K (eds) *Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of Cereal Chemists, St Paul, pp 17–34
- Weyer LG, Lo SC (2002) Spectra-structure correlations in the near-infrared. In: Chalmers J, Griffiths P (eds) *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Wiley, Chichester, pp 1817–1837



Capítulo 3

Aplicación de la tecnología NIRS para el análisis del contenido en aceite y perfil de ácidos grasos en harina de almendra.

Álvaro Fernández-Cuesta, José M. Fernández-Martínez, Rafael Socías i Company and Leonardo Velasco

Near-infrared spectroscopy for analysis of oil content and fatty acid profile in almonds

European Journal of Lipid Science and Technology, 115: 211-216 (2013)

Research Article

Near-infrared spectroscopy for analysis of oil content and fatty acid profile in almond flour

Álvaro Fernández-Cuesta¹, José M. Fernández-Martínez¹, Rafel Socias i Company² and Leonardo Velasco¹¹ Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Alameda del Obispo s/n, Córdoba, Spain² Unidad de Fruticultura, CITA de Aragón, Av. Montañana, Zaragoza, Spain

Almond kernels show large variability for oil content and fatty acid profile. The objective of this research was to evaluate the potential of near infrared (NIR) reflectance spectroscopy (NIRS) for the analysis of these traits in almond flour. Ground kernels of 181 accessions collected in 2009 were used for developing calibration equations for oil content and concentrations of individual fatty acids. Calibration equations were developed using second derivative transformation and modified partial least squares regression. They were validated with samples from 179 accessions collected in 2010. The accuracy of calibration equations was measured through the coefficient of determination (r^2) in external validation and the ratio of the SD in the validation set to the standard error of prediction (RPD). Both r^2 and RPD were high for oil content ($r^2 = 0.99$; RPD = 9.24) and concentrations of oleic ($r^2 = 0.97$; RPD = 5.37) and linoleic acids ($r^2 = 0.98$; RPD = 7.35), revealing that calibration equations for these traits are highly accurate. Conversely, the accuracy of the calibration equations for palmitic ($r^2 = 0.54$; RPD = 1.41) and stearic acids ($r^2 = 0.52$; RPD = 1.44) was too low for allowing their application in practice. NIRS discrimination of oil content and concentrations of oleic and linoleic acids was mainly based on the spectral region from 2240 to 2380 nm.

Practical applications: NIRS is a high-throughput analytical technique that allows fast measurement of several traits in a single analysis without using chemical reagents. We evaluated the feasibility of analyzing oil content and concentrations of palmitic, stearic, oleic, and linoleic acids in almond flour using fruits collected during 2 years from a world germplasm collection. The fruits collected in 2009 were used for NIRS calibration, whereas the fruits collected in 2010 were used for validation. NIRS equations were highly accurate for measuring oil content and concentrations of oleic and linoleic acids, which are important traits defining the quality of almond flour for specific uses in the food industry. These results have applications both in the research laboratory and the food industry, where NIRS is becoming a widely used technique for quality control.

Keywords: Almond / Fatty acid profile / Near IR reflectance spectroscopy / NIRS / Oil content

Received: March 17, 2012 / Revised: May 8, 2012 / Accepted: August 15, 2012

DOI: 10.1002/ejlt.201200115

1 Introduction

Almond is the most important tree nut crop in terms of commercial production, with an estimated annual world

production around 2.5 Mt mostly limited to areas characterized by a Mediterranean climate, including regions in the Mediterranean countries, the Central Valley of California, the Middle East, and some equivalent areas in the southern hemisphere [1, 2]. Almonds are globally used either as a snack food or as an ingredient in a number of food products, where almond flour contributes to improve the nutritional value, texture, and flavor [3].

Almonds are regarded as a healthy food, and a number of studies have demonstrated the beneficial effects of almonds on human health, particularly in relation to blood lipid profile and the risk of cardiovascular disease [4, 5]. Almond kernels possess high oil content that is generally over 50% kernel weight, though large cultivar variation exists [6, 7]. Oil content is

Correspondence: Dr. Leonardo Velasco, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14004 Córdoba, Spain
E-mail: lvelasco@ias.csic.es
Fax: +34-957499252

Abbreviations: MPLS, modified partial least squares; NIRS, NIR reflectance spectroscopy; RPD, ratio of the SD in the validation set to the standard error of prediction; SECV, standard error of cross validation; SEL, standard error of laboratory; SEP, standard error of performance

important for almond uses. High oil content is required for oil extraction as well as for confectionery uses. Conversely, low oil content is preferred for production of almond flour and almond milk [8]. The fatty acid profile is mainly made up of mono-unsaturated oleic acid and polyunsaturated linoleic acid, which together generally account for more than 90% of the fatty acids, and saturated palmitic and stearic acids. Large variability has been reported for almond oil fatty acid profile, particularly for the concentration of oleic and linoleic acid [6, 8].

Measuring almond kernel quality traits by conventional methods is costly, time consuming, and requires the use of chemical reagents. Alternatively, near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) is a high-throughput analytical technique that is routinely used to estimate numerous quality components in a number of agricultural crops [9]. NIRS allows fast spectrometric measurement of several traits in a single analysis provided that the corresponding calibration equations are available. NIRS have been extensively used to analyze oil content and fatty acid profile in oilseeds such as sunflower [10], rapeseed [11], soybean [12], peanut [13], and castor [14], as well as in other commodities such as cereals [15], forages [16], or animal products [17]. However, little research has been conducted in tree nuts. Davrieux *et al.* [18] developed accurate calibration equations for total fat content and concentrations of the predominant fatty acids stearic and oleic in shea tree nuts, whereas calibration equations for the concentrations of other fatty acids were less accurate.

The objective of this research was to evaluate the feasibility of analyzing oil content and fatty acid profile in almonds by NIRS.

2 Materials and methods

2.1 Samples

The study was conducted on almond accessions of the world germplasm collection at the Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) of Aragón, Spain [19]. Twenty nuts per accession from open pollination were harvested at mature stage from 181 accessions in 2009 and from 179 accessions in 2010. From these, 163 accessions were collected in both 2009 and 2010, whereas the remaining accessions were different in both years, as some of them did not produce fruits. After blanching, the kernels were ground in a laboratory mill.

2.2 NIRS scanning

Almond flour samples were scanned on a monochromator NIR Systems model 6500 (NIR Systems, Silver Springs, MD), equipped with a transport module, by using a small ring cup (ref. IH-0307, NIR Systems). The reflectance spectra ($\log 1/R$) from 400 to 2500 nm were recorded at 2 nm intervals.

2.3 NIRS calibration

NIRS calibration equations were developed for oil content, palmitic (16:0), stearic (18:0), oleic (18:1), and linoleic (18:2) acids from 181 samples collected in 2009. For calibration, only the spectral data from 1100 to 2500 nm were used, since the inclusion of the segment from 400 to 1100 nm led to poorer results. Second derivative transformation, detrend, and standard normal variate (SNV) scatter corrections [20] were applied to the $\log(1/R)$ spectra. Second derivative was calculated from the $\log(1/R)$ spectra at gaps of four data points (8 nm) and a smoothing over segments of four data points (2, 4, 4, 1). This combination was selected after having tested alternative math treatments with and without spectral corrections. Calibration equations were developed by using modified partial least squares (MPLS) regression (ISI v. 3.10, Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA). Cross validation was used in MPLS regression to avoid overfitting. The criterion for outlier elimination was T -value > 3.5 . This value was chosen in order to minimize outlier detection. External validation was conducted using 179 samples collected in 2010, not included in the calibration set. Calibration quality was evaluated by the coefficient of determination in external validation and the RPD ratio, defined as the ratio of SD of validation samples to the standard error of prediction (SEP) in external validation [21]. No outliers were eliminated in external validation.

2.4 Analysis of oil content and fatty acid profile

Oil was extracted from 4 to 5 g of ground almond kernel in the commercial fat-extractor Soxtec Avanti 2055 (Tecator, Barcelona, Spain) for 2 h using petroleum ether as solvent and keeping the heating source at 135°C because previous checks showed that extraction is practically completed after 2 h, with no differences after 4 h [7]. The oil content was expressed as the difference in weight of the dried kernel flour sample before and after extraction. The fatty acid composition of the oil was analyzed by methyl esterification [22] followed by GC on a Perkin–Elmer Autosystem gas–liquid chromatograph (Perkin–Elmer Corporation, Norwalk, CT) equipped with a 2-m long column packed with 3% SP-2310/2% SP-2300 on Chromosorb WAW (Supelco Inc., Bellefonte, PA). The oven, injector, and FID were held at 195, 275, and 250°C, respectively. The carrier gas was nitrogen at a flow of 20 mL/min.

The standard error of the reference methods, known as standard error of laboratory (SEL) was determined by calculating the standard error of the analysis of 24 replicates for oil content and 48 replicates for fatty acid composition of three different samples of almond flour [23]:

$$SEL = \sqrt{\frac{\sum_i \sum_j \frac{(x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{R-1}}{N}} \quad (1)$$

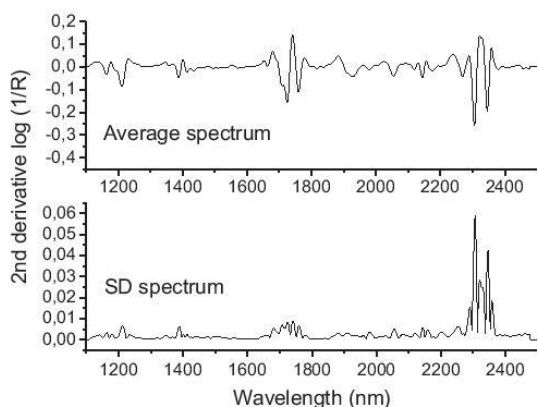


Figure 1. Average spectrum and SD spectrum of 181 almond samples of the calibration set after scatter correction and second derivative transformation.

where X_{ij} is the j th replicate on the i th sample, X_j is the mean value of all replicates of an i th sample, R is the number of replicates, and N is the number of samples.

3 Results and discussion

Figure 1 shows the average spectrum and SD spectrum of the almond samples of the calibration set after scatter correction

and second derivative transformation. Maximum variation within the calibration set occurred in the spectral region from 2280 to 2370 nm, with maximum SD peaks at 2304 and 2344 nm (Fig. 1).

Calibration and validation sets included wide ranges of variation for oil content (51.5–65.6% in calibration, 47.2–66.7% in validation), oleic acid (60.4–81.7% in calibration, 61.7–80.5% in validation) and linoleic acid (10.3–29.0% in calibration, 11.8–27.8% in validation), whereas ranges of variation were narrower for palmitic and stearic acid concentration (Table 1). Development of calibration equations using MPLS on the samples collected in 2009 revealed high goodness of fit between NIRS spectral data and reference method analyses for oil content and concentrations of oleic and linoleic acid, for which coefficients of determination higher than 0.98 were obtained both in calibration and cross-validation (Table 2). Conversely, cross-validation indicated poorer adjustment for concentrations of palmitic acid ($r^2 = 0.62$) and stearic acid ($r^2 = 0.53$). Previous studies have emphasized the importance of the existence of wide ranges of variation in the calibration set for developing accurate calibration equations [24], which was not the case for the two latter fatty acids. The SEC/SEL (Table 2) and SEP/SEL (Table 3) ratios confirmed the accuracy of NIRS equations for oil content and proportions of oleic and linoleic acids. In the case of palmitic and stearic acids, low SEC/SEL and SEP/SEL ratios did probably reflect the limited ranges of variation for both fatty acids in the calibration and validation sets, as the SEP scales

Table 1. Number of samples (n), mean value, SD, minimum and maximum values of oil content (% kernel weight, dm basis), and concentration of palmitic (16:0), stearic (18:0), oleic (18:1), and linoleic (18:2) acids (% total fatty acids) in calibration and validation sets

Trait	Calibration set					Validation set				
	n	Mean	SD	Min	Max	n	Mean	SD	Min	Max
Oil	181	59.90	2.67	51.53	65.57	179	59.78	3.14	47.24	66.71
16:0	181	6.18	0.56	4.93	8.69	179	6.27	0.48	5.16	7.60
18:0	181	1.99	0.43	1.22	3.64	179	2.05	0.49	0.84	3.98
18:1	181	73.81	4.19	60.39	81.66	179	72.08	4.17	61.66	80.50
18:2	181	17.51	3.69	10.30	29.00	179	19.11	3.76	11.78	27.84

Table 2. Calibration and cross-validation statistics in the development of NIRS calibration equations for oil content (% kernel weight, dm basis) and concentration of palmitic (16:0), stearic (18:0), oleic (18:1), and linoleic (18:2) acids (% total fatty acids)

Trait	n	SEC	R^2	SECV	r^2	SEL	SEC/SEL	nt
Oil	176	0.38	0.98	0.39	0.98	0.27	1.44	10
16:0	177	0.26	0.75	0.32	0.62	0.20	1.60	7
18:0	176	0.20	0.72	0.27	0.53	0.16	1.69	9
18:1	178	0.42	0.99	0.57	0.98	0.22	2.59	10
18:2	178	0.29	0.99	0.40	0.99	0.22	1.82	10

SEC, standard error of calibration; R^2 , coefficient of determination in calibration; SECV, standard error of cross validation; r^2 , coefficient of determination in cross validation; SEL, standard error of laboratory (reference analyses); nt, number of terms in MPLSs calibration.

Table 3. Results of the external validation of NIRS calibration equations for oil content (% kernel weight, dm basis) and concentration of palmitic (16:0), stearic (18:0), oleic (18:1), and linoleic (18:2) acids (% total fatty acids)

Trait	<i>n</i>	SD	r^2	SEP	RPD	SEL	SEP/SEL
Oil	179	3.14	0.99	0.34	9.24	0.27	1.26
16:0	179	0.48	0.54	0.34	1.41	0.20	1.70
18:0	179	0.49	0.52	0.34	1.44	0.16	2.13
18:1	179	4.19	0.97	0.78	5.37	0.22	3.55
18:2	179	3.75	0.98	0.51	7.35	0.22	2.32

SD, standard deviation of the validation set; SEP, standard error of prediction; RDP, ratio of SD to SEP; SEL, standard error of laboratory (reference analyses).

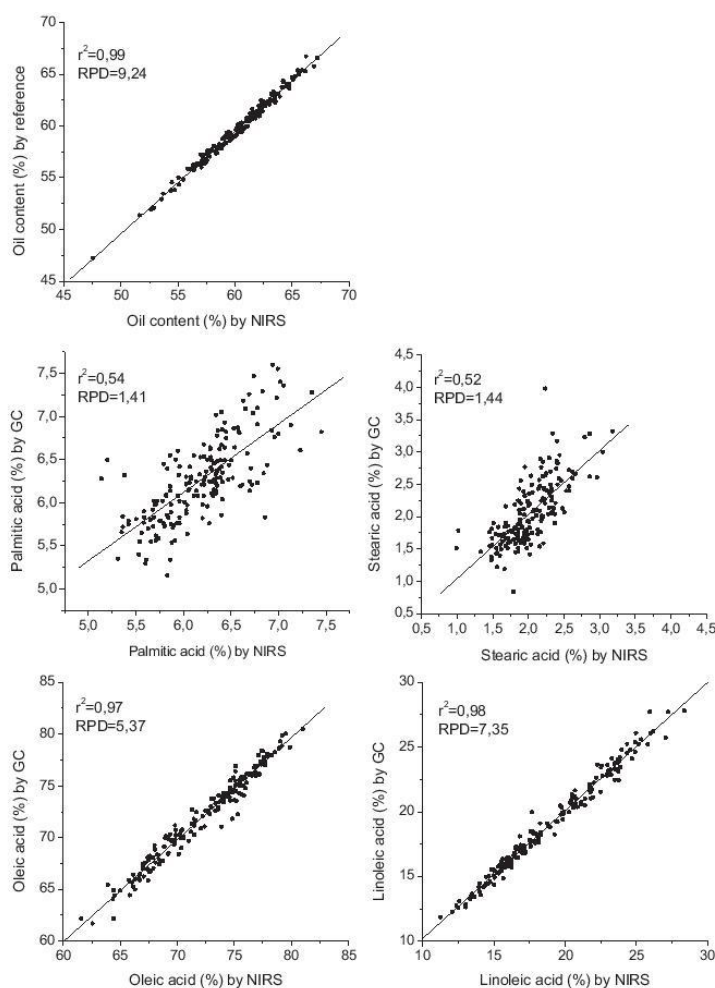


Figure 2. External validation plots for seed oil content and concentrations of palmitic acid, stearic acid, oleic acid, and linoleic acid in a set of 179 flour samples of almond. RPD, ratio of SD of the validation set to the SEP.

with the concentration range such that the SEP is typically smaller for small ranges of variation [25].

External validation with the samples collected in 2010, not included in the calibration set, showed similar results as cross-validation (Table 3). The coefficient of determination was high for oil content ($r^2 = 0.99$) and concentrations of oleic ($r^2 = 0.97$) and linoleic acids ($r^2 = 0.98$), and low for the concentrations of palmitic ($r^2 = 0.54$) and stearic acids ($r^2 = 0.52$). The ratio RPD measures the accuracy of NIRS calibration equations. Williams and Sobering [21] suggested that RPD should be higher than 3 for the equations to be reliable for screening. This cut-off was clearly surpassed in the cases of oil content (RPD = 9.24) and concentrations of oleic acid (RPD = 5.37) and linoleic acid (RPD = 7.35), but not in the calibration equations for palmitic and stearic acid concentration (Table 3). Similar results were obtained for the development of NIRS calibration equation for oil content and concentrations of predominant fatty acids in shea nut flour [18] as well as in ground oilseeds such as sunflower [10]. Figure 2 shows the external validation scatter plots for oil content and concentrations of individual fatty acids.

The analysis of the weights of wavelengths in the first factor of MPLS equations (Fig. 3) confirmed the significant role of the spectral region from around 2280 to 2346 nm, with peaks at 2304 and 2344 for both oil content and oleic acid concentration (positive peaks) as well as linoleic acid

concentration (negative peaks). The presence of the same peaks but of opposite sign for oleic acid and linoleic acid concentration responds to a strong negative correlation between the concentration of both fatty acids in the oil ($r = -0.99$, $p < 0.01$). Similarly, the same wavelengths had an important role in the equation of oil content due to the predominance of oleic and linoleic acid in almond oil. In the analysis of sunflower oil, the main spectral regions associated with changes in oleic and linoleic acid concentrations were those from 1600 to 1800 nm and from 2100 to 2200 nm, though the region from 2250 to 2370 nm was also found to be important for discrimination of both fatty acids [10]. In the analysis of *Brassica carinata* seeds, differences for oleic acid concentration were mainly associated with the spectral region from 2240 to 2380 nm [24]. NIRS principal component (PC) analysis of shea nut flour samples differing for fatty acid profile showed a strong correlation of PC1 with oleic acid content ($r = 0.79$) and of PC2 with oil content ($r = -0.86$), with the wavelength at 2308 nm having the highest loading in PC1 and the second highest loading in PC2 [18]. The spectral region from around 2200–2400 nm is associated with C–H stretch and bending combination bands of $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$, and $-\text{CH}_3$ groups present in fatty acid molecules [26, 27]. More specifically, the wavelength at 2308 nm has been strongly associated with oil content in other commodities such as forages [26] and milk [28]. Accordingly, it

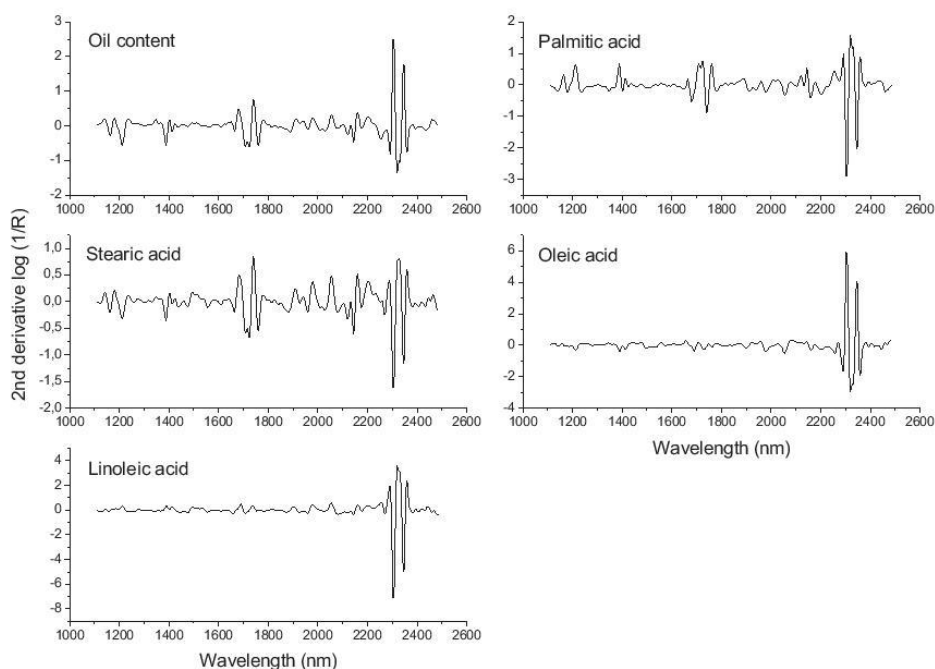


Figure 3. Weights of the first factor of the MPLS equations for oil content and concentrations of palmitic acid, stearic acid, oleic acid, and linoleic acid across the wavelength range used for calibration (1100–2500 nm).

can be concluded that spectral variation in almond samples shown in Fig. 1, in which maximum SD peaks were found at 2304 and 2344 nm, was mainly associated with differences for oil content and oleic acid concentration in the samples.

4 Conclusions

In conclusion, the present research showed that NIRS can be accurately used for high-throughput analysis of oil content and concentration of oleic and linoleic acid in almond flour samples. NIRS discrimination of these traits is mainly based on the spectral region from 2240 to 2380 nm, with the main wavelengths being 2304 and 2344 nm. The accuracy of NIRS for measuring the concentration of saturated palmitic and stearic acid is low, which is attributed to the low variation for these fatty acids in almond germplasm.

Research partially funded by Spanish grant AGL2010-22197-C02-01. The technical collaboration of J. Búbal, J.M. Ansóñ and O. Frontera in preparing the almond flour is highly appreciated.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Kester, D. E., Asay, R., in: Janick, J., Moore, J. N. (Eds.), *Advances in Fruit Breeding*, Purdue Univ. Press, West Lafayette, IN (USA) 1975, pp. 387–419.
- [2] FAOSTAT. Statistics Database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2011 (<http://faostat.fao.org>; accessed 23 January 2012).
- [3] Ahrens, S., Venkatachalam, M., Mistry, A. M., Lapsley, K., Sathe, S. K., Almond (*Prunus dulcis* L.) protein quality. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2005, 60, 123–128.
- [4] Sathe, S. K., Seeram, N. P., Kshirsagar, H. H., Heber, D., Lapsley, K. A., Fatty acid composition of California grown almonds. *J. Food Sci.* 2008, 73, 607–614.
- [5] Kamil, A., Chen, C. Y. O., Health benefits of almonds beyond cholesterol reduction. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 6694–6702.
- [6] Askin, M. A., Balta, M. F., Tekintas, F. E., Kazankaya, A., Balta, F., Fatty acid composition affected by kernel weight in almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.] genetic resources. *J. Food Comp. Anal.* 2007, 20, 7–12.
- [7] Kodad, O., Socias i Company, R., Variability of oil content and of major fatty acid composition in almond (*Prunus amygdalus* Batsch) and its relationship with kernel quality. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 4096–4101.
- [8] Socias i Company, R., Kodad, O., Alonso, J. M., Gradziel, T. M., Almond quality: A breeding perspective. *Hortic. Rev.* 2008, 34, 197–238.
- [9] Font, R., Del Rio-Celestino, M., De Haro-Bailon, A., The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind. Crops Prod.* 2006, 24, 307–313.
- [10] Pérez-Vich, B., Velasco, L., Fernández-Martínez, J. M., Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1998, 75, 547–555.
- [11] Hom, N. H., Becker, H. C., Möllers, C., Non-destructive analysis of rapeseed quality by NIRS of small seed samples and single seeds. *Euphytica* 2007, 153, 27–34.
- [12] Hurburgh, C. R., Measurement of fatty acids in whole soybeans with near infrared spectroscopy. *Lipid Technol.* 2007, 19, 88–90.
- [13] Sundaram, J., Kandala, C. V., Butts, C. L., Chen, C. Y., Sobolev, V., Nondestructive NIR reflectance spectroscopic method for rapid fatty acid analysis of peanut seeds. *Peanut Sci.* 2011, 38, 85–92.
- [14] Fernández-Cuesta, A., Fernández-Martínez, J. M., Velasco, L., Identification of high oleic castor seeds by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2012, 89, 431–435.
- [15] Roussel, V., Branlard, G., Vézine, J. C., Bertrand, D., Balfourier, F., NIRS analysis reveals temporal trends in the chemical composition of French bread wheat accessions cultivated between 1800 and 2000. *J. Cereal Sci.* 2005, 42, 193–203.
- [16] Foster, J. G., Clapham, W. M., Fedders, J. M., Quantification of fatty acids in forages by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 3186–3192.
- [17] García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., De Pedro, A., Classification of real farm conditions Iberian pigs according to the feeding regime with multivariate models developed by using fatty acids composition or NIR spectral data. *Grasas Aceites* 2009, 60, 233–237.
- [18] Davrieux, F., Allal, F., Piombo, G., Kelly, B. et al., Near infrared spectroscopy for high-throughput characterization of shea tree (*Vitellaria paradoxa*) nut fat profiles. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 7811–7819.
- [19] Espiau, M. T., Ansóñ, J. M., Socias i Company, R., The almond germplasm bank of Zaragoza. *Acta Hortic.* 2002, 591, 275–278.
- [20] Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., Lister, S. J., Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* 1989, 43, 772–777.
- [21] Williams, P. C., Sobering, D. C., in: Davies, A. M. C., William, P. C. (Eds.), *Near-Infrared Technology: The Future Wave*, NIR publications, Chichester (UK) 1996, pp. 185–188.
- [22] Garcés, R., Mancha, M., One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 1993, 211, 139–143.
- [23] Windham, W. R., Mertens, D. R., Barton, F. E., in: Marten, G. C., Shenk, J. S., Barton, F. E. (Eds.), *USDA-ARS Agricultural Handbook No. 643. Near Infrared Reflectance Spectroscopy: Analysis of Forage Quality*, US Government Printing Office, Washington, DC 1989, pp. 96–103.
- [24] Velasco, L., Fernández-Martínez, J. M., De Haro, A., Determination of the fatty acid composition of the oil in intact-seed mustard by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74, 1595–1602.
- [25] Riley, M. R., Crider, H. M., The effect of analyte concentration range on measurement errors obtained by NIR spectroscopy. *Talanta* 2000, 52, 473–484.
- [26] Murray, I., in: Davies, A., Baker, R. D., Grant, S. A., Laidlaw, A. S. (Eds.), *Sward Measurement Handbook*, 2nd Edn., The British Grassland Society, Reading (UK) 1993, pp. 285–312.
- [27] Workman, J. J., Interpretive spectroscopy for near infrared. *Appl. Spectrosc. Rev.* 1996, 31, 251–320.
- [28] Robert, P., Bertrand, D., Devaux, M. F., Multivariate analysis applied to near-infrared spectra of milk. *Anal. Chem.* 1987, 59, 2187–2191.



Capítulo 4

Caracterización físico-química y estabilidad oxidativa de aceite de cártamo con alto contenido en γ -tocoferol.

Álvaro Fernández-Cuesta, Leonardo Velasco and M. Victoria Ruiz-Méndez

Characterization of novel safflower oil with high γ -tocopherol content

European Journal of Lipid Science and Technology, (2014)

Research Article**Characterization of novel safflower oil with high γ -tocopherol content[†]**Álvaro Fernández-Cuesta¹, Leonardo Velasco¹ and M. Victoria Ruiz-Méndez²¹Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Alameda del Obispo s/n; 14004, Córdoba, Spain²Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Avda Padre García Tejero 4, 41012 Sevilla, Spain**Running title:** Novel safflower oil with high gamma-tocopherol content**Correspondence:** M. Victoria Ruiz-Méndez, Instituto de la Grasa (CSIC), Avda. Padre García Tejero 4, 41012 Sevilla, Spain.**E-mail:** mvrui@ig.csic.es**Telephone:** +34 954 690110**Fax:** +34 954 691262**Abbreviations:**

[†]This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: [10.1002/ejlt.201300208].

© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Received: June 18, 2013 / Revised: January 11, 2014 / Accepted: February 20, 2014

Safflower oil, either with high linoleic acid or high oleic acid content, has a tocopherol profile dominated by α -tocopherol. Novel safflower germplasm that accumulates predominantly γ -tocopherol in seeds instead of α -tocopherol has been developed. The objective of this research was to evaluate the chemical properties and stability of safflower oil with high oleic acid and γ -tocopherol contents, produced by either mechanical pressing or solvent extraction from seeds of safflower line IASC-2. Safflower oil with high oleic acid and α -tocopherol contents from seeds of safflower line CR-6 was used as a control. Seeds of IASC-2 had low oil content (22.2% compared to 39.3%), which is the result of its wild origin. Oil samples showed only slight differences for fatty acid profile and total tocopherol content. The predominant tocopherol form, either α or γ , accounted in all cases for more than 95% of total tocopherols. Solvent extracted oils had more sterols than pressed oils, with oils from IASC-2 having higher sterol content than oils from CR-6. Major differences were observed for oil stability, measured with Rancimat. High γ -tocopherol pressed oil from IASC-2 had an induction period of 66.4 h, compared to 38.0 h for high α -tocopherol oil from CR-6, whereas solvent extracted oil from IASC-2 had an induction time of 121.0 h, compared to 32.0 h for oil from CR-6.

Practical applications: Safflower oil, either with high oleic or high linoleic acid contents, has been traditionally valued as a healthy edible oil. The results of the present research indicated that the nearly complete replacement of α -tocopherol by γ -tocopherol has a great impact on enhancing oil oxidative stability. Oils with high oxidative stability are demanded for high temperature applications such as deep frying of biolubrication. Also, extended oxidative stability is required for biofuels. According to the results of this research, the novel safflower oil with high oleic acid and high γ -tocopherol content is more advantageous for such applications than safflower oils with high α -tocopherol content.

Keywords: α -tocopherol / γ -tocopherol / Mechanical extraction / Safflower oils / Solvent Extraction/ Stability / Sterols /

1. Introduction

Antioxidants increase the shelf-life of oils and food by inhibiting the spread of chain reactions of oxidation. In general, there are two basic categories of antioxidants: natural and synthetic. There is growing interest in using natural antioxidants in foods due to their health-promoting properties as well as to health concerns regarding synthetic antioxidants, particularly in relation to potential carcinogenic effects [1]. Tocopherols are the main antioxidants present in most seed oils. α -tocopherol possesses maximum nutritional value as vitamin E [2], whereas γ -tocopherol and δ -tocopherol are associated with enhanced oxidative stability of the oils [3, 4].

Despite current world production of safflower oil is very low, around 140.000 t per year compared to 38 million t of soybean oil [5], safflower oil is highly valued as an edible oil for cooking, salad dressing, and margarine manufacturing [6]. There are two groups of safflower cultivars according to their seed oil quality, characterized by high linoleic acid and high oleic acid content, respectively [7]. Unlike most seed oils in which γ -tocopherol is the predominant form, safflower and sunflower oils contain most of the tocopherols (ca. 95%) in the α -tocopherol form [8]. This high content in α -tocopherol makes safflower oil an excellent dietary source of vitamin E, but confers it low thermostability for high temperature applications such as deep frying or lubrication [3, 9]. A safflower mutant with high concentration of γ -tocopherol in the seeds has been developed [10], though the effect of tocopherol profile modification on oil oxidative stability has not been evaluated.

Safflower oil is extracted by mechanical pressing followed by solvent extraction. Generally, both oils are mixed and refined before commercialization [11]. However, the growing interest of consumers for minimally processed products has encouraged the production of cold pressed oils [12].

The objective of this study was to evaluate the chemical properties and stability of new safflower oil with high oleic acid content and high concentration of γ -tocopherol produced by either mechanical pressing or solvent extraction.

2. Materials and methods

2.1. Seed samples

CR-6 is a safflower line with high oleic acid content (75 to 83%) and conventional tocopherol profile (>95% a-tocopherol) isolated from the cultivar Oleic Leed [7]. IASC-2 is a safflower breeding line with high oleic acid content similar to CR-6 and tocopherol profile dominated by g-tocopherol (>95%), developed from crosses between CR-6 and the mutant line IASC-1, with high g-tocopherol content, derived from the wild species *Carthamus oxyacanthus* [10]. Four-hundred and eighty individual seeds of CR-6 and IASC-2 were non-destructively analysed for fatty acid and tocopherol profiles using the half-seed technique to confirm high oleic and a- or g-tocopherol phenotypes [10]. The seeds were then germinated, maintained for three weeks in small pots in a growth chamber, and transplanted to the field. Before flowering, plants of each line were isolated with insect proof net to avoid cross-pollination between plants of both lines. Around 6 kg seed of each line were harvested at maturity.

2.2. Oil extraction

Seeds of CR-6 and IASC-2 were conditioned at 70°C for 60 min. Moisture content of samples was 10% when expelled. The seed oil was extracted using a small expeller press Täby Pressen model 40a (Skeppsta Maskin AB, Örebro, Sweden) with a capacity of 3.5 kg h⁻¹. Oil retained in the pellets was further extracted with 2.5 L hexane during 4 h at 60 °C in a Soxhlet apparatus with a capacity of 2 kg for solids, after which the solvent was removed under vacuum.

2.3. Analytical methods

The oil content of ground seeds was determined using a Soxhlet extractor according to the official method UNE 55-062-80 [13]. Free fatty acids were determined following the method UNE 55-011-73 [13].

Fatty acids were determined by GC after derivatization to fatty acid methyl esters with 2 N KOH in methanol, according to the UNE 55-037 method [13] using an HP-7890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with an SP-2380 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) capillary column of fused silica 30 m × 0.32 mm I.D., 0.2 μm film thickness, and a flame ionisation detector (FID). Hydrogen was used as carrier gas

with a linear rate of 28 cm s^{-1} . The oven temperature was maintained at $170 \text{ }^\circ\text{C}$, and that of the injector and the detector at $220 \text{ }^\circ\text{C}$. The injection split ratio was 1:50.

Tocopherols were determined by HPLC with fluorescence detection (excitation at 290 nm and emission at 330 nm), following the IUPAC standard method [14], using n-hexane:isopropanol (99:1, by vol.) as mobile phase at a flow rate of 1 mL min^{-1} and a LiChrosorb Si 60 ($250 \times 4 \text{ mm}$) column packed with silica (5 mm particle size) (Merck, Darmstadt, Germany). Sample solutions of 50 mg mL^{-1} were used.

Sterols were analysed in a two-step process comprising extraction of the unsaponifiable fraction by the method UNE 55-004-73 [13] and determination of sterols by the method UNE 55-019-73 [13]. For extraction of the unsaponifiable fraction, 50 mL ethanolic KOH 2 M were added to $2.5 \pm 0.001 \text{ g}$ of crude oil and 1 mg of 5 α -cholestan-3 β -ol used as internal standard (Cat. No. 26710, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and heated during 2 h at 60°C . The unsaponifiable matter was extracted three times with 50 mL ether and separated into sub-fractions on preparative silica gel thin layer chromatography (TLC) with hexane:ether:acetic acid (70:30:1, by vol.) as developing solvent. The bands corresponding to sterols were scraped off the plate and eluted with isopropyl ether. Phytosterols were converted to their corresponding trimethylsilyl ether derivatives by addition of $200 \text{ }\mu\text{L}$ silylating mixture composed of pyridine:hexamethyldisilazane:trimethylchlorosilane 9:3:1 by vol. (Cat. No. 355650.0922, Panreac Quimica, Barcelona, Spain) and heated at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min . Gas chromatography analyses were performed using an Agilent 7890 GC equipped with a FID, a programmed temperature vaporizing (PTV) injector, and a HP-5 capillary column $15 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm I.D.}$, $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ film thickness (Agilent, Avondale, PA, USA). Hydrogen was used as carrier gas at a flow of 10 mL min^{-1} . The FID was maintained at $350 \text{ }^\circ\text{C}$. The oven thermal regime was the following: initial temperature of $75 \text{ }^\circ\text{C}$ during 1 min was increased at $40 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ to a final temperature of $250 \text{ }^\circ\text{C}$ maintained for 30 min . Total analytical time was 35.4 min .

The oil stability index (OSI) was determined following AOCS method number Cd 12b-92 [15] using a Rancimat Instrument (Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland) at $110 \text{ }^\circ\text{C}$ and an air flow of 20 L h^{-1} .

3. Results and discussion

Commercial production of vegetable oils is commonly carried out by physical methods of mechanical pressing followed by solvent extraction. Before pressing, the seed is pretreated by conditioning with moisture and heat [16, 17]. In this study, whole safflower seeds were used because previous assays demonstrated that husked seeds were plasticized in the screw press and the drainage canals were occluded. The same drawbacks have been described for sunflower seeds [18].

Table 1 shows the results of oil yields in the extraction process. The seeds from the high oleic, high α -tocopherol safflower cultivar CR-6 had an oil content of 39.27%, as measured by Soxhlet. Mechanical pressing resulted in 16.17% of extracted oil, whereas further solvent extraction led to an additional 21.58% of extracted oil. The resulted defatted meal contained less than 1% of oil. Seeds from the new safflower selection IASC-2 with high oleic acid and high γ -tocopherol content showed much lower oil content, 22.23% as measured by Soxhlet, resulting in pressed oil yield of 11.50% and of solvent extracted oil yield of 8.96%. Defatted meal contained 2.6% of oil. Seeds of CR-6 and IASC-2 showed differences in size and hull content, which in turn determined differences in total oil content and probably in the relative proportion of oil extracted by mechanical pressing. Hundred-seed weight averaged 2.9 g in CR-6 and 3.8 g in IASC-2. However, the latter had much higher hull content, 66.4% compared to 41.9% in CR-6, which determined lower hundred-kernel weight in IASC-2 (1.3 g compared to 1.7 g in CR-6). As in sunflower, oil content in safflower seeds is highly dependent on hull content [6]. The higher hull content and subsequent lower oil content of IASC-2 seeds is attributed to the pedigree of this inbred line, derived from crosses with wild safflower (*C. oxyacanthus*) germplasm [10], with thicker hulls than modern safflower cultivars [19]. To our knowledge, there are no studies on the influence on seed and/or kernel size on oil extraction efficiency by mechanical pressing procedures.

Table 2 shows the physical and chemical characteristics of cold pressed and solvent extracted crude oils from sunflower lines IASC-2 and CR-6. Acidity values and unsaponifiable matter content were lower in pressed oils than in solvent extracted oils. A previous study showed larger differences between both extraction systems in safflower [20]. The four types of oils showed similar fatty acid profiles, with high oleic

acid content above 76%. Pressed oils had lower sterol contents than solvent extracted oils. In both cases, oils from IASC-2 had higher sterol content than oils from CR-6, with the difference being more pronounced in solvent extracted oils. Pressed and solvent extracted oils differed for the phytosterol profile as well. Solvent extracted oils had more relative concentration of *b*-sitosterol and subsequently less concentration of other sterols such as campesterol, Δ^7 -stigmastenol and Δ^7 -avenasterol than pressed oils. Differences between oils from IASC-2 and CR-6 were in general of lower magnitude within each group.

Differences for total tocopherol content were observed but they were not consistent. Pressed oil from CR-6 had more tocopherols than that from IASC-2, whereas the opposite situation was observed in solvent extracted oils (Table 2). As expected, the tocopherol profile was completely different in oils from CR-6 and IASC-2, with the predominant tocopherol form accounting in all cases for more than 95% of the total tocopherols.

The main difference between both oils was found for oil stability. In pressed oils, induction time was 38.0 h in the oil from CR-6 and 66.4 h in the oil from IASC-2 (Table 2). The difference was still more marked for solvent extracted oils, in which induction time was 32.0 in the oil from CR-6 and 121.0 h in the oil from IASC-2, i.e. three times greater. These results demonstrated the marked effect of replacing *a*- by *g*-tocopherol on oil stability, both in pressed as well as in solvent extracted oils. Discrepancies found between stability values of crude pressed oil and solvent extracted oil from IASC-2 could be explained by small differences for minor compounds of antioxidant or pro-oxidant effect, taking particularly into account the low oil content of the seeds (Table 1). As the fatty acid composition was very similar in oils from CR-6 and IASC-2, the large differences in stability between them are mainly attributed to the contrasting tocopherol profiles.

Safflower oil has been traditionally valued as a healthy oil with hypocholesterolemic action on account of its high content in *n*-6 polyunsaturated linoleic acid [21]. However, scientific studies in the mid 1980's raised concern about negative health effects of unbalanced *n*-6/*n*-3 fatty acid consumption [22]. Safflower gemplasm producing seed oil with high oleic acid content was identified much earlier

than in other oilseeds [23]. High linoleic safflower oil has low oxidative stability, typically between 2 and 4 h of induction time measured by Rancimat [20, 24, 25]. Oxidative stability is enhanced to around 14 h in high oleic acid safflower oil with the tocopherol fraction dominated by α -tocopherol [26]. Our results confirmed the extended oxidative stability of high oleic safflower oil, though we obtained higher induction times than those previously reported [26]. Similar induction times to those obtained in the present research for high oleic safflower oil have been reported for high oleic sunflower oil, also with high α -tocopherol content [27]. Furthermore, our results revealed that the nearly complete replacement of α -tocopherol by γ -tocopherol was associated with a drastic enhancement of oil stability, with induction times of 66.4 h in pressed oil and 121.0 in solvent extracted oil. Previous studies in sunflower, which also contains nearly all the tocopherols in the α -tocopherol form, have also shown a dramatic increase of oxidative stability associated with the replacement of α - by γ -tocopherol [3, 4, 28].

Safflower oil is a minor commodity in the world vegetable oil market. However, the crop has great agronomic potential for areas such as the Mediterranean basin [29]. The present research demonstrated that the novel safflower oil with high oleic acid content and high γ -tocopherol content has very high oxidative stability and accordingly is well suited for applications such as deep frying [27], biolubrication [30], or biofuels [31]. These results encourage research to develop safflower cultivars with high oleic acid and high γ -tocopherol contents together with good agronomic performance and high seed oil content.

Acknowledgments

The research was partly funded by Junta de Andalucía grant P07-AGR-03011.

The authors have declared no conflict of interest

References

- [1] Shahidi, F., Zhong, Y., Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* 2010, *39*, 4067–4079.
- [2] Traber, M. G., Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.* 2007, *27*, 347–362.
- [3] Marmesat, S., Velasco, L., Ruiz-Méndez, M. V., Fernández-Martínez, J. M., Dobarganes, C., Thermostability of genetically modified sunflower oils differing in fatty acid and tocopherol compositions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008, *110*, 776–782.
- [4] Warner, K., Moser, J., Frying stability of purified mid-oleic sunflower oil triacylglycerols with added pure tocopherols and tocopherol mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2009, *86*, 1199–1207.
- [5] FAOSTAT, Statistical Database of the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. 2012. Available online in <http://faostat.fao.org/> [6 February 2013].
- [6] Singh, V., Nimbkar, N., Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). In: *Oilseed Crops, Volume 4: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement*. Ed. Singh, R. J. CRC Press, Boca Raton, FL (USA) 2007, pp. 167–194.
- [7] Hamdan, Y. A. S., Pérez-Vich, B., Velasco, L., Fernández-Martínez, J. M., Inheritance of high oleic acid content in safflower. *Euphytica* 2009, *168*, 1–69.
- [8] Padley, F. B., Gunstone, F. D., Harwood, J. L., Occurrence and characteristics of oils and fats. In: *The Lipid Handbook*. Eds. Gunstone, F. D., Harwood, J. L., Padley, F.B. Chapman and Hall, London (UK) 1994, pp. 47–223.
- [9] Schneider, M. P., Plant-oil-based lubricants and hydraulic fluids. *J. Sci. Food Agric.* 2006, *86*, 1769–1780.
- [10] Velasco, L., Pérez-Vich, B., Fernández-Martínez, J. M., Identification and genetic characterization of a safflower mutant with a modified tocopherol profile. *Plant Breeding* 2005, *124*, 459–463.

- [11] Salunkhe, D. K., Chavan, J. K., Adsule, R. N., Kadam, S. S., World Oilseeds. Chemistry, Technology, and Utilization. Van Nostrand Reinhold, New York (USA) 1992.
- [12] Ramadan, R. F., Healthy blends of high linoleic sunflower oil with selected cold pressed oils: Functionality, stability and antioxidative characteristics. *Ind. Crops Prod.* 2013, *43*, 65–72.
- [13] AENOR, *Catálogo de Normas UNE*. Asociación Española de Normalización, Madrid (Spain) 1991.
- [14] IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry: Standard Methods for the Analysis of Oils, Fat and Derivatives. 1st Suppl. to 7th Edn*. Pergamon Press, Oxford (UK) 1992.
- [15] AOCS, *American Oil Chemists' Society: Official Methods and Recommended Practices, 6th ed.* AOCS Press, Champaign, IL (USA) 2008.
- [16] Williams, M. A., Preparation of oil-bearing materials for extraction. In: *Technology and Solvent for Extracting Oilseeds and Non Petroleum Oils*. Eds. Wan, P. J., Wakely, P.J. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL (USA) 1997, pp. 121–136.
- [17] Van Hoed, V., Ben Ali, C., Slah, M., Verhé, R., Quality differences between prepressed and solvent extracted rapeseed oil. *Eur. J Lipid Sci. Technol.*, 2010, *112*, 1241–1247.
- [18] Rass, M., Schein, C., Matthäus, B., Virgin sunflower oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2008, *110*, 618–624.
- [19] Mündel, H. H., Bergman, J. W., Safflower. In: *Oil crops*. Eds. Vollmann, J., Rajcan, I. Springer, New York, NY (USA) 2009, pp. 423–447.
- [20] Mihaela, P., Rathbauer, J., Negrea, M., Zeller, R. Perspectives of safflower oil as biodiesel source for South Eastern Europe (comparative study: Safflower, soybean and rapeseed). *Fuel* 2013, *111*, 114–119.
- [21] Dajue, L., Mündel, H. H., *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, 7: Safflower (Carthamus tinctorius L.)*. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben (Germany) and International Plant Genetic Resources Institute, Rome (Italy) 1996.

- [22] Mattson, F. H., Grundy, S. M., Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J. Lipid Res.* 1985, *26*, 194–202.
- [23] Horowitz, B., Winter, W., A new safflower oil with low iodine value. *Nature* 1957, *179*, 582–583.
- [24] Bozan, B., Temelli, F., Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Biores. Technol.* 2008, *99*, 6354–6359.
- [25] Mailer, R. J., Potter, T. D., Redden, R., Ayton, J., Quality evaluation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. In: *Proceedings of the 7th International Safflower Conference*. Eds. Knights, S. E., Potter, T. D. Wagga Wagga, NSW (Australia) 2008. Electronic Publication.
- [26] Merrill, L. I., Pike, O. A., Ogden, L. V., Dunn, M. L., Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2008, *85*, 771–776.
- [27] Matthäus, B., Utilization of high-oleic rapeseed oil for deep-fat frying of French fries compared to other commonly used edible oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2006, *108*, 200–211.
- [28] Demurin, Y., Skoric, D., Karlovic, D., Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. *Plant Breeding* 1996, *115*, 33–36.
- [29] Yau, S. K., Ryan, J., Response of rainfed safflower to nitrogen fertilization under Mediterranean conditions. *Ind. Crops Prod.* 2010, *32*, 318–323.
- [30] Garcés, R., Martínez-Force, E., Salas, J.J., Vegetable oil basestocks for lubricants. *Grasas Aceites* 2011, *62*, 21–28.
- [31] Frölich, A., Schober, S., The Influence of tocopherols on the oxidation stability of methyl esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2007, *84*, 579–585.

Table 1. Oil content (% w/w) extracted from seeds of two high oleic acid safflower lines, CR-6 with high α -tocopherol and IASC-2 with high γ -tocopherol, by mechanical extraction and further solvent extraction, as compared to total oil content determined by Soxhlet method.

	CR-6	IASC-2
Mechanical extraction	16.17	11.50
Solvent extraction ^a	21.58	8.96
Analytical Results (Soxhlet)	39.27	22.23

^aExtraction of the oil retained in the pellets after mechanical extraction

Table 2. Physical and chemical characteristics of pressed and solvent extracted crude oils from safflower lines CR-6, with high α -tocopherol and IASC-2, with high γ -tocopherol content.

	Pressed oils		Solvent extracted oils	
	CR-6	IASC-2	CR-6	IASC-2
Acidity (%)	0.29	0.34	0.63	0.60
Fatty acids				
C16:0 (%)	4.6	4.7	4,7	4.7
C18:0 (%)	1.7	1.7	1,8	1.7
C18:1 (%)	77.5	77.5	77,8	76.6
C18:2 (%)	14.3	13.9	14,2	14.0
Unsaponifiable (%)	1.09	1.39	1,57	1,97
Sterols (mg kg⁻¹)	3192	3572	4229	5745
Campesterol (%)	12.25	10.60	11,1	7.8
Stigmasterol (%)	5.63	6.71	5,9	5.0
Δ^7 -Campesterol (%)	2.14	1.79	1,4	1.1
$\Delta^{5,23}$ -Stigmasterol (%)	3.01	2.50	2,1	1.5
β -Sitosterol (%)	47.10	50.54	57,6	58.3
Δ^5 -Avenasterol (%)	8.25	6.25	7,4	6.9
$\Delta^{5,24}$ -Stigmastadienol (%)	3.06	1.84	0,9	2.0
Δ^7 -Stigmastenol (%)	11.95	13.02	9,6	12.0
Δ^7 -Avenasterol (%)	6.04	6.22	4.0	5.5
Tocopherols (mg kg⁻¹)	608	544	479	544
α -tocopherol (%)	97.25	4.24	97.49	4.12
γ -tocopherol (%)	1.06	95.72	1.00	95.87
Stability (Rancimat 110°C, h)	38.0	66.4	32,0	121,0



Conclusiones

Conclusiones

Con el objetivo del desarrollo y puesta a punto de nuevos métodos de análisis aplicables a componentes de calidad del aceite en distintas semillas oleaginosas, en esta tesis se han alcanzado las siguientes conclusiones:

1.- Se ha desarrollado y validado un método para el análisis de fitosteroles en muestras pequeñas de semillas de girasol, adaptando previos métodos publicados.

1.1 Los resultados de este estudio demuestran que el análisis del contenido y composición de fitosteroles puede llevarse a cabo en pequeñas muestras de semillas lo que facilita la selección en programas de mejora genética para este carácter.

1.2 La comparación de este método con el método estándar, utilizando la extracción previa del aceite, muestra una alta correlación ($r = 0,85$) entre ambos métodos.

1.3 La aplicación del método desarrollado a una colección de 87 líneas puras de girasol ha puesto de manifiesto una gran variación del contenido de fitosteroles, de 1426 a 4710 mg/kg en la semilla y 2855 a 9752 mg/kg en el aceite, que es mayor que la observada en otros estudios.

2.- Se ha puesto a punto un método basado en la utilización de Espectroscopía Infrarroja Cercana (Near Infrared Spectroscopy, NIRS) y Análisis Discriminante Lineal (Linear Discriminant Analysis, LDA) para la discriminación entre semillas con alto contenido en oleico de semillas con alto contenido en ricinoleico.

2.1 Se ha demostrado que esta técnica constituye un medio efectivo, rápido y no destructivo para la discriminación de semillas de ricino con alto contenido en ácido oleico y semillas con alto contenido en ácido ricinoleico.

2.2 La discriminación por NIRS de ambos tipos de semillas está basada principalmente en regiones espectrales entre 1400 y 1914 nm asociadas con la presencia del grupo OH en la molécula de ácido ricinoleico.

Conclusiones

3.- Se ha demostrado que la técnica NIRS también puede ser utilizada con precisión para el análisis de contenido de aceite y la concentración de los ácidos oleico y linoleico en muestras de harina de almendras.

3.1 La discriminación por NIRS de estos caracteres en la almendra está basada principalmente en regiones espectrales entre 2240 y 2380 nm.

3.2 La precisión para el análisis de la contenido concentración de los ácidos saturados, palmítico y esteárico, fue baja posiblemente por la escasa variación existente para estos ácidos grasos en el germoplasma de almendra.

4.- Se han evaluado las características funcionales de un nuevo aceite de cártamo con alto contenido en ácido oleico y γ -tocoferol

4.1 Este nuevo aceite presentó una mayor estabilidad oxidativa que el aceite alto oleico convencional, con alto contenido en α -tocoferol.

4.2 El análisis de la termoestabilidad del aceite de cártamo extraído mediante presión, evaluada mediante el método de Rancimat fue inferior que para los aceites extraídos con disolvente. En particular, se obtuvieron valores de 38.0 h en el caso del aceite con alto contenido en ácido oleico y α -tocoferol, frente a 66,4 h en el caso del aceite con alto contenido en ácido oleico y γ -tocoferol. Para los aceites extraídos con disolvente, estos valores fueron de 32.0 h y 121.0 h respectivamente

4.3 Estos resultados demuestran que el nuevo aceite de cártamo, con alto contenido en ácido oleico y γ tocoferol es muy adecuado para diversas aplicaciones tales como frituras, biolubricantes y biocombustibles.



Informe del factor de impacto

Álvaro Fernández-Cuesta, Marta R. Aguirre-González, María V. Ruíz-Méndez and Leonardo Velasco (2012). **Validation of a method for the analysis of phytosterol in sunflower seeds**. Eur. J. Lipid Sci. Tech., 114, 325-331

Factor de impacto en 2012

Cites in 2012 to items published in:	2011 = 381	Number of items published in:	2011 = 172
	2010 = 351		2010 = 151
	Sum: 732		Sum: 323
Calculation: <u>Cites to recent items</u>	<u>732</u>	=	2.266
Number of recent items	323		

Journal Ranking en 2012

For 2012, the journal **EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY** has an Impact Factor of **2.266**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY	124	31	Q2
NUTRITION & DIETETICS	76	33	Q2

Research Article

Validation of a method for the analysis of phytosterols in sunflower seeds**Álvaro Fernández-Cuesta¹, Marta R. Aguirre-González², María V. Ruiz-Méndez² and Leonardo Velasco¹**¹ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Alameda del Obispo s/n, Córdoba, Spain² Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Sevilla, Spain

Phytosterols are natural compounds that contribute to lower serum cholesterol in humans. Sunflower seeds and oils are rich sources of phytosterols. Breeding for phytosterol content in sunflower has been scarce thus far, mainly because of the lack of analytical methods suitable for use in plant breeding. The objective of this research was to validate a method for the analysis of phytosterols in small seed samples of sunflower. Samples consisting of six seeds were analyzed for phytosterol content in a set of 87 inbred lines using a method adapted to small samples. The accuracy of the method was evaluated through the standard error of the analysis of replicates of ground samples, which was 72.12 mg/kg compared to average values of 1665.3 and 1887.2 mg/kg seed in the samples. Sunflower inbred lines showed ranges of variation from 1426.0 to 4710.0 mg/kg seed and from 2855.2 to 9752.0 mg/kg oil. The method correlated strongly with the conventional method based on the analysis of extracted oils ($r = 0.85$). The results indicated that analysis of phytosterols on samples consisting of sunflower seeds is an accurate approach for breeding and genetic studies, in which extraction of the seed oil is not feasible.

Practical applications: Phytosterols are usually analyzed in extracted oils. However, studies in plant breeding and plant sciences often require a direct analysis of phytosterols in seeds, without previous oil extraction (e.g. large-scale screening of germplasm in breeding programs or genetic studies). Our results will be useful for plant scientists interested in the analysis of phytosterols in small samples of plant tissues.

Keywords: Oil analysis / Phytosterols / Seed analysis / Sunflower seeds

Received: April 9, 2011 / Revised: June 30, 2011 / Accepted: August 17, 2011

DOI: 10.1002/ejlt.201100138

1 Introduction

Phytosterols or plant sterols are natural constituents of plants that belong to the group of isoprenoids. They play essential functions in plant cells such as regulation of fluidity and permeability of cell membranes in a similar manner to cholesterol in mammalian cell membranes [1]. Ingestion of phytosterols prevents intestinal absorption of cholesterol in humans, resulting in a lowering of serum cholesterol [2]. These findings stimulated interest in the use of phytosterols and related compounds (phytosterol esters, phytostanol, and

phytostanol esters) for enrichment of food products [3]. The use of phytosterols as enriched food ingredients in functional foods has increased in recent years [4], though the effect of phytosterols is also exerted as natural components of regular diet [5].

Sunflower seeds and oils are rich sources of phytosterols [6–8]. However, no breeding research has been conducted to increase phytosterol content in sunflower seeds [9]. For other important seed quality traits such as tocopherols, breeding research led to the development of germplasm with modified tocopherol profiles [10, 11] or increased total tocopherol accumulation in the seeds [12]. Studies in canola reported high heritability estimates for phytosterol content in seeds, suggesting that the trait is amenable to selection [13]. However, the lack of analytical methods for phytosterol analysis suitable for use in plant breeding programs has been

Correspondence: Dr. Leonardo Velasco, Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14004 Córdoba, Spain
E-mail: lvelasco@ias.csic.es
Fax: +34 957 499252

Álvaro Fernández-Cuesta, Leonardo Velasco, José M. Fernández-Martínez (2012).
Identification of High Oleic Castor Seeds by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. J. Am Oil Chem Soc., 89, 431-435

Factor de impacto en 2012

Cites in 2012 to items published in:	2011 = 323	Number of items published in:	2011 = 220
	2010 = 298		2010 = 170
	Sum: 621		Sum: 390

Calculation: $\frac{\text{Cites to recent items}}{\text{Number of recent items}} = \frac{621}{390} = 1.592$

Journal Ranking en 2012

For 2012, the journal **JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY** has an Impact Factor of **1.592**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
CHEMISTRY, APPLIED	71	27	Q2
FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY	124	51	Q2

Identification of High Oleic Castor Seeds by Near Infrared Reflectance Spectroscopy

Álvaro Fernández-Cuesta · José M. Fernández-Martínez · Leonardo Velasco

Received: 4 May 2011/Revised: 29 July 2011/Accepted: 18 August 2011/Published online: 30 August 2011
© AOCS 2011

Abstract Castor oil contains a high proportion (>80%) of the unusual hydroxy fatty acid ricinoleic acid. Additionally, a mutant with high oleic acid content (>70%) has been developed. Both fatty acids differ in the presence of an OH group in the C18 tail (ricinoleic acid). The objective of this research was to evaluate whether near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) can be used to discriminate between high oleic and high ricinoleic acid seeds. Eight hundred and seventy-two individual seeds collected in 2008, 688 high ricinoleic and 184 high oleic, were scanned by NIRS and further analyzed by GLC. As high oleic/low ricinoleic acid content is recessive and no intermediate fatty acid levels occur, the spectral data was subjected to linear discriminant analysis, which correctly classified all the seeds. The discriminant function was validated with a set of 637 seeds collected in 2009 from segregating populations, which were correctly classified in all cases. NIRS discrimination between oleic and ricinoleic acid was mainly based on spectral regions around 1,400 and 1,914 nm, putatively associated with the absorbance of the OH group. The results confirmed that NIRS provides an effective means of discriminating between high oleic and high ricinoleic acid seeds.

Keywords Castor seeds · Linear discriminant analysis · Near infrared reflectance spectroscopy · NIRS · Oleic acid · Ricinoleic acid · *Ricinus communis* L.

Introduction

Castor (*Ricinus communis* L.) is an oilseed crop characterized by a high oil content in the seeds, between 42 and 58%, which contains a high proportion of ricinoleic acid (12-hydroxy-9-*cis*-octadecenoic acid), a monounsaturated hydroxy fatty acid that accounts for more than 80% of the total fatty acids in the oil. Castor oil is very versatile as a raw material in many chemical industries such as paints, coatings, inks, lubricants and a wide variety of other products [1]. In addition to the high ricinoleic acid castor, a mutant in which ricinoleic acid is partly replaced by oleic acid, which accounts for more than 70% of the total fatty acids, has been developed [2]. High oleic acid castor oil is a promising alternative for uses such as biodiesel production, where oleic acid is preferred to ricinoleic acid due to the latter conferring a high viscosity to biodiesel, which must be corrected through the use of blends [3].

The concentration of oleic acid and ricinoleic acid in castor seeds is controlled by the genotype of the developing embryo, i.e. genetic variation for the traits can be identified at the single-seed level. Seeds in segregating populations are either high ricinoleic (>80%) or high oleic (>70%), with no occurrence of intermediate levels [4]. Rapid and cost-effective methods are required to discriminate between high oleic and high ricinoleic acid seeds in breeding programs.

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) has been extensively used to estimate the fatty acid profile in single seeds of sunflower [5–8], rapeseed [9–11], peanut [12], and corn [13]. In all cases, NIRS was used to discriminate between major fatty acids such as stearic, oleic and linoleic acid, which differ in the number of double bonds in their molecules (18:0 stearic acid, 18:1 oleic acid, 18:2 linoleic acid). Near-infrared spectral differences associated with the

A. Fernández-Cuesta · J. M. Fernández-Martínez · L. Velasco (✉)
Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC),
Alameda del Obispo s/n, 14004 Córdoba, Spain
e-mail: lvelasco@ias.csic.es

Álvaro Fernández-Cuesta, José M. Fernández-Martínez, Rafael Socias i Company and Leonardo Velasco (2013). **Near-infrared spectroscopy for analysis of oil content and fatty acid profile in almond flour.** Eur. J. Lipid Sci. Technol, 115, 211-216

This release of *Journal Citation Reports* provides 2012 data. The 2013 data will be made available in *Journal Citation Reports* mid-year 2014.

Factor de impacto en 2012

Cites in 2012 to items published in:	2011 = 381	Number of items published in:	2011 = 172
	2010 = 351		2010 = 151
	Sum: 732		Sum: 323
Calculation: <u>Cites to recent items</u>	<u>732</u>	=	2.266
Number of recent items	323		

Journal Ranking en 2012

For 2012, the journal **EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY** has an Impact Factor of **2.266**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY	124	31	Q2
NUTRITION & DIETETICS	76	33	Q2

Research Article

Near-infrared spectroscopy for analysis of oil content and fatty acid profile in almond flour

Álvaro Fernández-Cuesta¹, José M. Fernández-Martínez¹, Rafel Socias i Company² and Leonardo Velasco¹¹ Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Alameda del Obispo s/n, Córdoba, Spain² Unidad de Fruticultura, CITA de Aragón, Av. Montañana, Zaragoza, Spain

Almond kernels show large variability for oil content and fatty acid profile. The objective of this research was to evaluate the potential of near infrared (NIR) reflectance spectroscopy (NIRS) for the analysis of these traits in almond flour. Ground kernels of 181 accessions collected in 2009 were used for developing calibration equations for oil content and concentrations of individual fatty acids. Calibration equations were developed using second derivative transformation and modified partial least squares regression. They were validated with samples from 179 accessions collected in 2010. The accuracy of calibration equations was measured through the coefficient of determination (r^2) in external validation and the ratio of the SD in the validation set to the standard error of prediction (RPD). Both r^2 and RPD were high for oil content ($r^2 = 0.99$; RPD = 9.24) and concentrations of oleic ($r^2 = 0.97$; RPD = 5.37) and linoleic acids ($r^2 = 0.98$; RPD = 7.35), revealing that calibration equations for these traits are highly accurate. Conversely, the accuracy of the calibration equations for palmitic ($r^2 = 0.54$; RPD = 1.41) and stearic acids ($r^2 = 0.52$; RPD = 1.44) was too low for allowing their application in practice. NIRS discrimination of oil content and concentrations of oleic and linoleic acids was mainly based on the spectral region from 2240 to 2380 nm.

Practical applications: NIRS is a high-throughput analytical technique that allows fast measurement of several traits in a single analysis without using chemical reagents. We evaluated the feasibility of analyzing oil content and concentrations of palmitic, stearic, oleic, and linoleic acids in almond flour using fruits collected during 2 years from a world germplasm collection. The fruits collected in 2009 were used for NIRS calibration, whereas the fruits collected in 2010 were used for validation. NIRS equations were highly accurate for measuring oil content and concentrations of oleic and linoleic acids, which are important traits defining the quality of almond flour for specific uses in the food industry. These results have applications both in the research laboratory and the food industry, where NIRS is becoming a widely used technique for quality control.

Keywords: Almond / Fatty acid profile / Near IR reflectance spectroscopy / NIRS / Oil content

Received: March 17, 2012 / Revised: May 8, 2012 / Accepted: August 15, 2012

DOI: 10.1002/ejlt.201200115

1 Introduction

Almond is the most important tree nut crop in terms of commercial production, with an estimated annual world

production around 2.5 Mt mostly limited to areas characterized by a Mediterranean climate, including regions in the Mediterranean countries, the Central Valley of California, the Middle East, and some equivalent areas in the southern hemisphere [1, 2]. Almonds are globally used either as a snack food or as an ingredient in a number of food products, where almond flour contributes to improve the nutritional value, texture, and flavor [3].

Almonds are regarded as a healthy food, and a number of studies have demonstrated the beneficial effects of almonds on human health, particularly in relation to blood lipid profile and the risk of cardiovascular disease [4, 5]. Almond kernels possess high oil content that is generally over 50% kernel weight, though large cultivar variation exists [6, 7]. Oil content is

Correspondence: Dr. Leonardo Velasco, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14004 Córdoba, Spain
E-mail: lvelasco@ias.csic.es
Fax: +34-957499252

Abbreviations: MPLS, modified partial least squares; NIRS, NIR reflectance spectroscopy; RPD, ratio of the SD in the validation set to the standard error of prediction; SECV, standard error of cross validation; SEL, standard error of laboratory; SEP, standard error of performance

Álvaro Fernández-Cuesta, Leonardo Velasco and M. Victoria Ruíz Méndez (2014).
Characterization of novel safflower oil with high g-tocopherol content. Eur. J. Lipid Sci. Technol, 116, 211-accepted

This release of *Journal Citation Reports* provides 2012 data. The 2013 data will be made available in *Journal Citation Reports* mid-year 2014.

Factor de impacto en 2012

Cites in 2012 to items published in:	2011 = 381	Number of items published in:	2011 = 172
	2010 = 351		2010 = 151
	Sum: 732		Sum: 323
Calculation: <u>Cites to recent items</u>	<u>732</u>	=	2.266
Number of recent items	323		

Journal Ranking en 2012

For 2012, the journal **EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY** has an Impact Factor of **2.266**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY	124	31	Q2
NUTRITION & DIETETICS	76	33	Q2

Research Article**Characterization of novel safflower oil with high g-tocopherol content[†]****Álvaro Fernández-Cuesta¹, Leonardo Velasco¹ and M. Victoria Ruiz-Méndez²**¹Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Alameda del Obispo s/n; 14004, Córdoba, Spain²Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Avda Padre García Tejero 4, 41012 Sevilla, Spain**Running title:** Novel safflower oil with high gamma-tocopherol content**Correspondence:** M. Victoria Ruiz-Méndez, Instituto de la Grasa (CSIC), Avda. Padre García Tejero 4, 41012 Sevilla, Spain.**E-mail:** mvruiiz@ig.csic.es**Telephone:** +34 954 690110**Fax:** +34 954 691262**Abbreviations:**

[†]This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: [10.1002/ejlt.201300208].

© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim**Received: June 18, 2013 / Revised: January 11, 2014 / Accepted: February 20, 2014**



**Aceptación por escrito
de los coautores
de los trabajos**



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Instituto de Agricultura Sostenible

Dña. Marta Aguirre González, coautora del artículo “Validation of a method for the analysis of phytosterol in sunflower seeds” (remitido a “European Journal of Lipid Science and Technology”), doy mi total consentimiento a D. Álvaro Fernández de la Cuesta para que sea incluido como parte de su tesis doctoral.

Y para que conste firmo la presente en Córdoba 4 de Marzo de dos mil catorce.

Fdo.;Marta Aguirre González



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Instituto de Agricultura Sostenible

D. José María Fernández Martínez, Profesor de Investigación del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), coautor del artículo “Identification of High Oleic Castor Seeds by Near Infrared Reflectance Spectroscopy” (remitido a “Journal of the American Oil Chemists Society”), doy mi total consentimiento a D. Álvaro Fernández de la Cuesta para que sea incluido como parte de su tesis doctoral.

Y para que conste firmo la presente en Córdoba 4 de Marzo de dos mil catorce.

José María Fernández Martínez



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Instituto de Agricultura Sostenible

Rafael Socias i Company, Investigador del CITA de Aragón, coautor del artículo “Near-Infrared spectroscopy for analysis of oil content and fatty acid profile in almonds” (remitido a “European Journal of Lipid Science and Technology”), doy mi total consentimiento a D. Álvaro Fernández de la Cuesta para que sea incluido como parte de su tesis doctoral.

Y para que conste firmo la presente en Zaragoza 4 de Marzo de dos mil catorce.

Rafael Socias i Company



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Instituto de Agricultura Sostenible

D. José María Fernández Martínez, Profesor de Investigación del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), coautor del artículo “Near-Infrared spectroscopy for analysis of oil content and fatty acid profile in almonds” (remitido a “European Journal of Lipid Science and Technology”), doy mi total consentimiento a D. Álvaro Fernández de la Cuesta para que sea incluido como parte de su tesis doctoral.

Y para que conste firmo la presente en Córdoba 4 de Marzo de dos mil catorce.

José María Fernández Martínez