



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

Departamento de Química



**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO OLEICO EN SEMILLAS DE  
GIRASOL POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO NIRS**



**TRABAJO DE TESIS DE GRADO  
LICENCIATURA EN QUÍMICA**

Presentado por

**ISRAEL GERMÁN ARISTÓTELES FUNES**

Director

**Dr. JOSÉ MANUEL CAMIÑA**

Co-directora

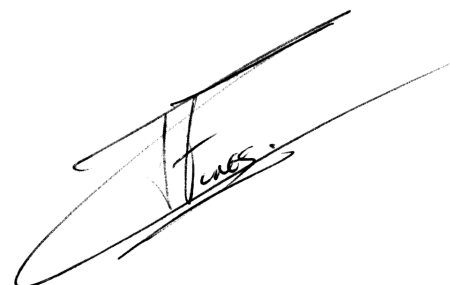
**Lic. GLADIS ESTER SCOLES**

SANTA ROSA - LA PAMPA

2008

## **PREFACIO**

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, durante el período comprendido entre el 13 de junio y el 14 de Noviembre de 2008, conjuntamente con el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Gente de La Pampa S.A., bajo la dirección del Dr. José Manuel CAMIÑA y bajo la codirección de la Lic. Gladis Ester SCOLES



**Israel Germán Aristóteles FUNES**  
**Departamento de Química**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Universidad Nacional de La Pampa**

14 de noviembre de 2008

A mis hijos, Abril y Eliam

Este trabajo está dedicado a mi madre, quien ha sido mi primer paso en el camino del conocimiento.

Le agradezco a mi director de tesis, Doctor José Camiña, por la invaluable ayuda que me ha brindado, por su excelente aporte científico y el compromiso. A mi Co-Directora, Licenciada Gladis Scoles, que colaboró en todo momento y en todos los aspectos del trabajo, desde la gestión de la idea hasta la conclusión del mismo.

Agradezco a mi familia que me apoyó en todo momento, y que fue uno de los pilares fundamentales para hacer esto posible. A mi tío Marcelo, a mis hermanos Pato, Ana y Jere, a mi mujer, a mi madre y a mi padre, a mis suegros Pocholín y Mirta, a mis tías Coco, Mari y Rosi, a mis tíos Peri, Abel, Lucas, y a mi cuñada Laura.

Al departamento de química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; especialmente a Susana Boeris, quien me ha ofrecido su ayuda en todo momento, desde mi época de estudiante, y a Mariela Sola, por impulsarme a desarrollar este trabajo.

A la empresa Gente de La Pampa S.A. y a Carlos Souto por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto; finalmente a mis compañeros de trabajo, especialmente a Walter Cerda.

## RESUMEN

La demanda de alimentos más sanos y nutritivos esta siendo capitalizada por las industrias como un factor de competencia. Impulsadas por las recomendaciones nutricionales para consumir grasas con bajo contenido de ácidos grasos saturados y por el interés de los fabricantes de alimentos en reducir la utilización de aceites hidrogenados, la industria aceitera ha desarrollado aceites con perfiles específicos de ácidos grasos para satisfacer tales requerimientos. En este sentido los granos de oleaginosas, especialmente girasol, tienen mucho para aportar, ya que ofrecen un aceite de alto contenido de ácido oleico en su composición. La importancia de la composición de los ácidos grasos de los aceites se basa en que la misma determina propiedades que caracterizan su calidad nutritiva, culinaria y/o industrial. En los últimos años se ha incrementado el consumo de ácido oleico en los países mas desarrollados debido a su influencia sobre la salud humana, como en Estados Unidos, Canadá y Japón. El ácido oleico le otorga al aceite mayor resistencia a la oxidación y en consecuencia, mayor durabilidad. En vista de ello, la industria que procesa girasol, debe mostrar la misma tendencia que el mercado, vale decir, hacia una mayor producción de aceites con alto contenido de ácido oleico; por tanto surge la necesidad de clasificar la materia prima de manera segura y atendiendo a los tiempos que impone el almacenaje de la semilla, el cual requiere ser el mínimo posible. La técnica utilizada por el método oficial para determinar el porcentaje de ácidos grasos en aceites vegetales es la cromatografía gaseosa, pero ésta demanda tiempos de análisis prolongados y un elevado costo. El objetivo del presente trabajo es el de explorar el uso de la espectroscopia del infrarrojo para cuantificar el contenido de ácido oleico en diferentes variedades de semillas de girasol empleando la versatilidad de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) y validar tales resultados a través de Cromatografía Gaseosa (CG).

## SUMMARY

The demand for more healthy and nutritious food is being funded by the industries as a factor of competition. Driven by nutritional recommendations to consume fats of low content in saturated fatty acids and in the interest of food manufacturers to reduce the use of hydrogenated oils, the oil industry has developed specific oils with fatty acid profiles to meet such requirements. Here grains oilseeds, especially sunflower, have much to contribute, as they offer a high oil content of oleic acid in its composition. The importance of the composition of fatty acids from oils it is based on determines the properties that characterize its nutritional quality, culinary and / or industrial. In recent years has increased the consumption of oleic acid in developed countries because of their influence on human health, as in the United States, Canada and Japan. The oleic acid gives to the oil more resistant to oxidation and consequently greater durability. In view of this, the industry that processes sunflower, must shows the same trend as the market, namely, towards greater production of oil with high content of oleic acid, thus arises the needed to classify the raw material safely and according to the times imposed by the storage of seed, which requires the minimum possible. The technique used by the official method to determine the percentage of fatty acids in vegetable oils is the gas chromatography, but this demand lengthy analysis times and a high cost. The purpose of this study is to explore the use of infrared spectroscopy to measure the content of oleic acid in different varieties of sunflower seeds using the versatility of Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) and validate such results by gas chromatography (GC).

# ÍNDICE

página

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

|  |                 |
|--|-----------------|
| <b>1.1 - INTRODUCCIÓN AL COMERCIO DE OLEAGINOSAS</b>           | <b>..... 1</b>  |
| <b>1.2 – GIRASOL</b>   | <b>..... 3</b>  |
| 1.2.1 – ORIGEN E HISTORIA DEL GIRASOL                          | ..... 3         |
| 1.2.2 – ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE GIRASOL                    | ..... 5         |
| 1.2.3 – COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA DE GIRASOL                   | ..... 6         |
| 1.2.4 – CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE DE GIRASOL                  | ..... 6         |
| 1.2.5 – VARIEDADES   | ..... 11        |
| 1.2.5.1 – Girasol Tradicional (Linoleico)                      | ..... 11        |
| 1.2.5.2 – Girasol Medio Oleico                                 | ..... 13        |
| 1.2.5.3 – Girasol Alto Oleico                                  | ..... 14        |
| 1.2.5.4 – Girasol Alto Linoleico                               | ..... 15        |
| 1.2.5.5 – Otros Aceites de Girasol                             | ..... 16        |
| <b>1.3 – CULTIVO DE GIRASOL EN ARGENTINA</b>                   | <b>..... 17</b> |
| 1.3.1 – HISTORIA   | ..... 17        |
| 1.3.2 – PRODUCCIÓN, EXPORTACIÓN Y CONSUMO DE ACEITE DE GIRASOL | ..... 18        |
| <b>1.4 - MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS</b>                | <b>..... 19</b> |
| 1.4.1 – INTRODUCCIÓN A LAS SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS        | ..... 19        |
| 1.4.2 – CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)                            | ..... 20        |
| 1.4.3 – INSTRUMENTAL   | ..... 21        |

|  |    |
|--|----|
| 1.4.4 – PRINCIPIO BÁSICO DE LA CROMATOGRAFÍA GAS – LÍQUIDO .....             | 22 |
| 1.4.5 – COMPONENTES DEL CROMATÓGRAFO .....                                   | 23 |
| 1.4.5.1 – Columna .....  | 23 |
| 1.4.5.2 – Detectores .....   | 24 |
| 1.4.5.2.1. <i>Detector de ionización de llama</i> .....                      | 25 |
| 1.4.5.3. Sistema de Integración de Picos Cromatográficos .....               | 27 |
| 1.4.5.4 – Inyector .....   | 28 |
| 1.4.6 – ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN INFRARROJA .....                         | 29 |
| 1.4.7 – ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIRS) ..... | 33 |
| 1.4.8 – MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIADA .....                            | 35 |
| 1.4.8.1 – Fundamentos matemáticos del PLS .....                              | 36 |
| 1.4.9 – METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR NIRS .....                               | 42 |
| 1.4.9.1- Recolección de datos .....  | 42 |
| 1.4.9.2- Calibración .....   | 42 |
| 1.4.9.3- Predicción .....  | 44 |
| 1.4.10 – INSTRUMENTAL .....  | 44 |

## **CAPÍTULO 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| <b>2.1 – OBJETIVOS .....</b> | <b>47</b> |
| <b>2.2 – HIPÓTESIS .....</b> | <b>48</b> |

## **CAPÍTULO 3. MATERIALES E INSTRUMENTOS**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.1 - MATERIALES DE LABORATORIO .....</b> | <b>49</b> |
|--|-----------|



|   |       |           |
|---|-------|-----------|
| <b>3.2 – REACTIVOS</b>                            | ..... | <b>49</b> |
| <b>3.3 - INSTRUMENTAL DE LABORATORIO</b>          | ..... | <b>49</b> |
| <b>3.4 – INSTRUMENTAL ANALÍTICO</b>               | ..... | <b>50</b> |
| 3.4.1 – ESPECTRÓMETRO DE INFRARROJO CERCANO (NIS) |       | 50        |
| 3.4.1.1 – Parámetros Instrumentales               | ..... | 50        |
| 3.4.2 – CROMATÓGRAFO DE GASES                     | ..... | 51        |
| 3.4.2.1 – Parámetros Instrumentales               | ..... | 51        |

## **CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

|   |       |           |
|---|-------|-----------|
| <b>4.1 – MUESTREO</b>   | ..... | <b>52</b> |
| <b>4.2 – PRETRATAMIENTO DE SEMILLAS</b>                               | ..... | <b>52</b> |
| <b>4.3 – CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO OLEICO POR CROMATOGRFÍA GASEOSA</b>  | ..... | <b>53</b> |
| 4.3.1. PROCEDIMIENTO DE ESTERIFICACIÓN                                | ..... | 53        |
| 4.3.2. ANÁLISIS INSTRUMENTAL CUANTITATIVO                             | ..... | 54        |
| <b>4.4 – CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO OLEICO A TRAVÉS DEL NIRS</b>         |       | <b>55</b> |
| 4.4.1. CALIBRACIÓN  | ..... | 55        |
| 4.4.2. VALIDACIÓN INTERNA DEL MODELO                                  | ..... | 56        |
| <b>4.5 – RESULTADOS NIRS OBTENIDOS CON SEMILLA ENTERA Y LIMPIA</b>    | ..... | <b>56</b> |
| 4.5.1. PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MÉTODOS POR EL MÉTODO DE LA PENDIENTE | ..... | 61        |
| 4.5.1.1 - Test Individual de la Pendiente y Ordenada al Origen        |       | 62        |
| 4.5.1.2 - Test Conjunto de la Pendiente y Ordenada al Origen          |       | 63        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.6 – RESULTADOS OBTENIDOS CON SEMILLA MOLIDA Y TAMIZADA .....</b>                     | <b>63</b> |
| 4.6.1. PRUEBA DE COMPARACIÓN POR EL MÉTODO DE LA PENDIENTE .....                          | 66        |
| 4.6.1.1 - Test Individual de la Pendiente y Ordenada al Origen                            | 67        |
| 4.6.1.2 - Test Conjunto de la Pendiente y Ordenada al Origen                              | 68        |
| 4.6.2 – LA PRUEBA <i>F</i> PARA LA COMPARACIÓN DE DESVIACIONES ESTÁNDAR .....             | 68        |
| <br>  |           |
| <b>4.7 – VALIDACION EXTERNA DE RESULTADOS CON MUESTRAS DESCONOCIDAS .....</b>             | <b>69</b> |
| 4.7.1.- VALIDACIÓN DE RESULTADOS DEL MODELO NIRS-PLS PARA SEMILA ENTERA .....             | 69        |
| 4.7.2 – VALIDACIÓN DE RESULTADOS DEL MODELO NIRS-PLS PARA SEMILLA MOLIDA Y TAMIZADA ..... | 69        |

## **CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5.1 - DEL TRATAMIENTO DE LA MUESTRA .....</b>          | <b>71</b> |
| <b>5.2 - DE LA IMPORTANCIA DEL MÉTODO PROPUESTO .....</b> | <b>72</b> |
| <b>5.3 - DE LAS APLICACIONES DEL MÉTODO .....</b>         | <b>72</b> |

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 6. REFERENCIAS .....</b> | <b>74</b> |
|--------------------------------------|-----------|

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 - INTRODUCCIÓN AL COMERCIO DE OLEAGINOSAS

Debido a exigencias actuales vinculadas a la calidad y a la salud humana, la industria de las oleaginosas ha manifestado una marcada tendencia a recurrir a materias primas con grasas vegetales que estén constituidas por ácidos grasos insaturados, a fin de incorporarlos a la dieta. En este sentido, el aceite de girasol es considerado de buena calidad comestible por su elevado tenor en ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico). A nivel mundial, el girasol constituye una de las oleaginosas más apreciadas. La importancia de la composición de ácidos grasos de los aceites es fundamental para describir sus propiedades en términos de calidad nutritiva, culinaria y/o industrial.

La semilla de girasol está constituida principalmente por aceite (50 % p/p aproximadamente) y proteína (alrededor del 15 % p/p) en segundo lugar, siendo su valor comercial debido fundamentalmente al contenido de aceite. Sin embargo, tanto sea la calidad del aceite obtenido y el valor proteico de su harina, permiten que este cultivo sea una interesante alternativa para los productores [1].

El aceite de girasol ha sido por años de tipo “linoleico” (aceite tradicional). Sin embargo, razones vinculadas al cuidado de la salud y la demanda de características especiales para usos industriales (en particular aquellas relacionadas con la tolerancia a altas temperaturas durante períodos prolongados) impulsaron el desarrollo de dos variedades de girasol: medio oleico y alto oleico. La exposición de aceites a altas temperaturas actúa en detrimento de su calidad debido que, en estas condiciones, los aceites poliinsaturados se oxidan y desvirtúan; bajo estas condiciones se produce un número de reacciones que incluyen oxidación, hidrólisis, polimerización y degradación térmica [1, 2, 3]. El proceso de hidrogenación catalítica resuelve parcialmente el problema, pero no es un proceso neutro pues surgen, como consecuencia, ácidos grasos con isomería trans asociados a cardiopatías, aumento de colesterol en sangre, desórdenes metabólicos y funcionales, etc., además de elevar el contenido final de ácidos grasos saturados, también perjudiciales para la salud humana [4, 5].

La demanda por la sustitución de aceites constituidos por ácidos grasos que presentan isomería trans, parece revalorizar estos nuevos perfiles acídicos, lo que significa una potencial

oportunidad para aquellos aceites que no necesitan ser hidrogenados (con alto contenido de oleico o medio oleico). El carácter de alto oleico se encuentra determinado genéticamente y el mejoramiento genético para obtener girasoles con elevado porcentaje de ácido oleico ha sido muy veloz a partir de la demanda mundial de dicho ácido, llegando a comercializarse varios híbridos en distintas partes del mundo.

En la Argentina, cerca del 95 % del aceite de girasol es del tipo linoleico y el resto del tipo alto oleico (lo que implica para éste último alrededor de 200.000 hectáreas sembradas), presumiéndose un fuerte crecimiento de cultivos alto oleico en los próximos años. Los mercados muestran inclinación hacia los aceites con alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, en un contexto de fuerte tendencia hacia una política de “alimentos sanos”; diversos estudios indican que las dietas con elevado consumo de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA de su sigla en inglés *mono unsaturated fatty acid*) podrían favorecer la disminución del riesgo de las enfermedades cardíacas, además de contribuir a la salud del corazón [1,6]. El tipo medio oleico no es comercializado hoy como tal en la República Argentina [1].

En virtud de lo expuesto, la industria del girasol, debe mostrar la misma tendencia que el mercado, vale decir, hacia una mayor producción de aceites con alto contenido de ácido oleico; por tanto, surge la necesidad de clasificar la materia prima de manera segura y atendiendo sobre todo a los tiempos que impone el almacenaje del material, el cual requiere ser el mínimo posible.

La metodología analítica oficial, utilizada para determinar el contenido de ácidos grasos en aceites vegetales es la cromatografía gaseosa, pero ésta demanda tiempos de análisis largos, un elevado costo instrumental y un grado de dificultad importante que solo es salvado por adecuada experiencia. Por otra parte, debido que las semillas de girasol son muestras sólidas se debe tener en cuenta además, la necesidad de extraer el aceite a ser analizado, ya sea por prensado en frío o la extracción con solvente, lo que suma una nueva etapa de pretratamiento de muestra al proceso de análisis. Todos estos factores juegan en detrimento del flujo comercial y aumentan el tiempo muerto de almacenaje, lo que es visto como un factor negativo en el proceso industrial.

En la búsqueda de agilizar las metodologías analíticas actuales por vía húmeda para el control de los alimentos balanceados y otros productos de la industria aceitera, se han

desarrollado técnicas para tal fin empleando la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) [7].

El empleo de propiedades ópticas en alimentos y en particular la aplicación de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), se ha desarrollado desde la década del 70 en la industria farmacéutica, petroquímica y alimenticia, como alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales [8]. El principio de análisis reside en la recolección de datos a diferentes longitudes de onda dentro de la región del infrarrojo cercano (datos espectrales), midiendo la intensidad de la energía reflejada, a longitudes de onda definidas, que permiten determinar ciertos parámetros de la muestra, tales como proteínas, humedad, grasa, etc. [7].

## 1.2 – GIRASOL

### 1.2.1 – ORIGEN E HISTORIA DEL GIRASOL

El girasol (*Helianthus annuus L.*) pertenece a la familia de las Compositae astereaceas y al género *Helianthus* [9]. El nombre “*Helianthus*”, deriva del griego “*helios*” que significa sol y de “*anthos*” que significa flor, por su característica especial de ser una flor que siempre sigue al sol. En español “girasol” o “mirasol”, en inglés “sunflower”, en francés “tournasol”, en alemán “sonnenblumen”, todas hacen referencia a su relación con el astro [10]. En la clasificación moderna del género *Helianthus* se reconocen 68 especies divididas en dos grandes grupos bien delimitados: las especies norteamericanas y las especies sudamericanas. Las especies norteamericanas se localizan en casi todas las zonas de los EEUU extendiéndose hasta Canadá e incluso hasta México [9]. Algunas variedades de girasol son cultivadas con fines ornamentales y otras como plantas alimenticias. Las especies sudamericanas no parecen estar emparentadas con las norteamericanas y cabe la posibilidad de que se hayan formado directamente en América del Sur por la evolución paralela del género *Viguiera* [11].

Según Vranceanu (1977), el girasol es originario del oeste de América del Norte y el norte de México [11]. Las primeras plantas silvestres se desarrollaron desde el norte de México, hasta Canadá, a través de las costas del Océano Pacífico. Posteriormente se cultivó en la zona central de América del Norte donde se lo utilizó como alimento; los indígenas de esa

zona también lo usaban para producir tinturas y el aceite como agente abrillantador del pelo y la piel. Las pruebas de su cultivo se remontan a 3000 años a.C. en excavaciones realizadas en Arizona y Nuevo México. Con la conquista, el girasol se trasladó a Europa y allí fue utilizado como planta ornamental desde el siglo XVI [9-11].

Vranceanu (1977) y Putt (1978) señalan que gran cantidad de obras históricas y etnográficas, atestiguan la utilización de los girasoles silvestres por los indios americanos como alimento y otros usos. Algunas tribus consumían los frutos directamente o bien los machacaban para obtener una harina con la cual preparaban pan. Otras tribus cocían las cabezuelas sin el involucre o machacaban sus raíces para tratar enfermedades y picaduras. En algunos casos fabricaban tinturas de distintos colores con las que pintaban sus caras y cuerpos para rituales o bien teñían sus ropas.

Se cree que la adaptación del girasol silvestre como planta útil se hizo desde la época prehistórica por ciertas tribus establecidas en el sudoeste del continente norteamericano. Pero recién al establecerse los colonizadores europeos en las costas del este de América del Norte, aparecieron las primeras informaciones referentes al cultivo de girasol por los indios. La primera prueba escrita referente a la utilización de los frutos de girasol como fuente de aceite se remonta a 1615, donde se relata el uso que le daban para abrillantar sus cabelleras.

La introducción en Europa se produjo en el siglo XVI. A partir de la Península Ibérica, el girasol se difundió rápidamente por Francia e Italia hacia el norte y este de Europa. La belleza de su inflorescencia hizo que fuera apreciada por los horticultores. Durante los 250 años posteriores a su introducción en Europa se siguió utilizando como ornamental, pero hacia 1740 ya era común que se consumieran sus frutos en forma directa [11].

En Inglaterra se encuentra una primera mención como fuente para obtener aceite industrial en una patente de 1716, la cual le fue concebida a Arthur Bunyan. Es en Rusia a partir del siglo XVIII que se comienza a utilizar como comestible y como oleaginosa y es donde se inicia el desarrollo y expansión del cultivo; en este país se mencionan algunos cultivos en 1770, siendo más importantes hacia 1820. Los investigadores rusos son los que realizan los primeros y fundamentales trabajos de mejoramiento de las semillas para elevar el contenido de aceite [10].

## 1.2.2 – ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE GIRASOL

El fruto o aquenio, mal llamado “semilla”, está constituido en su parte interna por un tejido rico en aceite denominado comúnmente “pepita”, cubierto por un pericarpio llamado normalmente “cáscara” [11]. El tamaño es variable con el cultivo y también según la ubicación en el capítulo: las mayores se encuentran en la periferia [9, 11] además las mismas son las más ricas en aceite [11]. Diferentes tipos de aquenios se pueden observar en un capítulo o flor [9]:

- *Aquenios estériles*: originados por una flor ligulada o una mal formación en el momento de la iniciación floral.
- *Aquenios vacíos*: resultantes del cultivado inapropiado o de la mal formación de la fruta.
- *Aquenios llenos*: semillas de tamaño variable. Existen aproximadamente 1500 aquenios por flor de girasol.

La semilla se encuentra formada por una cubierta de tres capas de parénquima, una capa simple de células ricas en proteínas (endosperma), muy unidas a la cubierta, y finalmente un embrión que contiene dos cotiledones. Dependiendo de las variedades, las semillas pueden tener entre 6 y 25 mm de largo, y de 4 a 13 mm de ancho [9,11]. El color va desde completamente blanco hasta negro, con intermedios estriados, grises o marrones [11]. Tanto el espesor de la cáscara, como la cáscara en sí misma, al igual que la semilla, son diferentes dependiendo de la variedad y de las condiciones ambientales [9].

El pericarpio representa del 18 al 35 % del total del peso. El mismo contiene una capa de células formando la epidermis, cubierta por una cutícula liviana. La presencia de pelos se puede notar en la superficie. A medida que el pericarpio se desarrolla, se observan varias capas de células; las paredes interiores de estas capas se esclerosan con la maduración y las fibras de celulosa aseguran la dureza del pericarpio. Una epidermis interna separa el pericarpio de la semilla, y a menudo se afloja para formar una cavidad ovárica [9].

La “pepita” contiene casi la totalidad del aceite y además sustancias proteicas e hidratos de carbono, principalmente solubles. El contenido de proteína bruta oscila entre 20 y

35 % dependiendo del contenido de aceite, mientras que este puede alcanzar el 65 % del peso de la pepita. El espesor del pericarpio determina en mayor medida el porcentaje del aceite total de los frutos [11].

### 1.2.3 – COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA DE GIRASOL

La semilla es rica en aceite y es probable encontrar grandes variaciones en su composición, dependiendo de los cultivares e híbridos. Dichas variaciones se presentan en los niveles de contenido de aceite y proteína. La cáscara está compuesta por sustancias fibrosas; pentosanos, lignina y materiales celulósicos, en proporciones aproximadamente iguales [11-12]. Una composición aproximada de la semilla de girasol es mostrada en forma resumida en la Figura 1 [12].

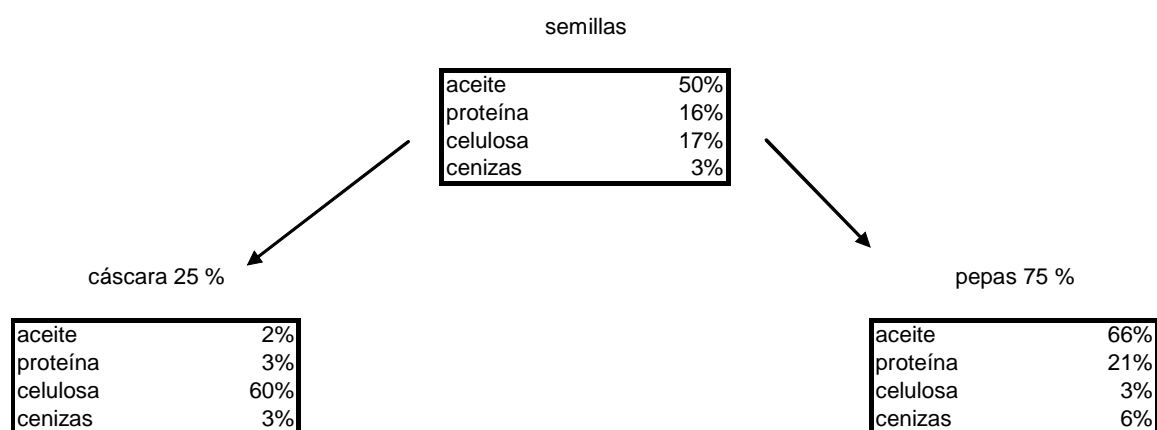


Figura 1. Diagrama de composición de la semilla de girasol.

### 1.2.4 – CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE DE GIRASOL

Los aceites y las grasas han sido reconocidos como nutrientes esenciales tanto en las dietas animales como en la humana. Constituyen la fuente de energía conocida mas concentrada, aportan ácidos grasos esenciales que son precursores de importantes hormonas, como las prostaglandinas y transportan vitaminas liposolubles. Influyen en gran medida sobre la sensación de saciedad tras la comida y hacen a los alimentos más apetitosos [13]. Además, constituyen la materia prima fundamental para el desarrollo de las membranas celulares.



Los aceites son predominantemente triésteres de ácidos grasos y glicerol, llamados triglicéridos; son insolubles en agua y solubles en la mayoría de los solventes orgánicos [13]. El aceite es una sustancia de reserva utilizada en la semilla como fuente de energía durante la germinación. Presenta algunas ventajas fisiológicas frente a otras sustancias de reserva, tales como no ser soluble en agua y contener más energía por unidad de peso [11]. Los triglicéridos representan normalmente más del 95 % en peso de la mayoría de los aceites alimentarios; entre los constituyentes minoritarios se encuentran monoglicéridos y diglicéridos, ácidos grasos libres, fosfátidos, esteroides, alcoholes grasos, vitaminas liposolubles y otras sustancias [13].

Al igual que la mayor parte de los aceites vegetales, el aceite de girasol se encuentra principalmente compuesto de triglicéridos (98-99 %) y una proporción mucho más baja de otras sustancias designadas bajo el término común de “fracción insaponificable”. Esta fracción está constituida por especies de muy diversa naturaleza: ceras, carbohidratos, esteroides y antioxidantes [9]. El aceite de girasol contiene, además, pequeñas cantidades de pigmentos (carotenoides, xantofilas y clorofila) y fosfolípidos, cuyo contenido en aceite crudo de girasol varía entre 0,5 y 1 %. En el caso de los fosfolípidos, su composición aproximada es 2,2 % de ácido fosfatídico, 27,9 % de fosfatidilinositol, y 48,7 de fosfatidilcolina [12].

El contenido de ceras es menor que el 1 % del total de lípidos. Aproximadamente el 83 % de ceras está contenido en el pericarpio, el 17 % en la corteza y la pepa contiene sólo vestigios. Por lo tanto el contenido de ceras en el aceite dependerá de la eficiencia en el descascarado. El aceite de girasol crudo contiene entre 50 y 3500 ppm de ceras, cuya cantidad depende de la variedad, origen o procedencia, estado de la semilla, método de molienda utilizado (donde se destaca el grado de descascarado), método de obtención del aceite y temperatura de extracción [12, 14].

Dos fracciones son importantes: los esteroides (o fitoesteroides) y los tocoferoles [12-13]. El contenido de esteroides se encuentra en un rango de 325 a 515 mg cada 100 g de aceite, mientras que el rango para los tocoferoles se halla entre 44 y 120 mg cada 100 g de aceite, aproximadamente. Los componentes principales de la fracción de esteroides son:  $\beta$  sitosterol, estigmasterol,  $\Delta$ -7 estigmasterol y campesterol [12]. Los tocoferoles (derivados de la vitamina E, antioxidantes) evitan que el aceite se transforme en rancio [9]. Estrictamente hablando atenúan el proceso de oxidación del aceite, prolongando el tiempo de vida útil del producto y en el

caso del girasol, la fracción más importante es el  $\alpha$ -tocoferol; este es el que se encuentra en mayor proporción pero es el que tiene la menor actividad antioxidante. La forma  $\alpha$  es la más común en el aceite de girasol, la forma  $\gamma$  es la más común en otros aceites. La variación en el contenido de tocoferoles depende de los cultivares, las condiciones de cosecha y la madurez de la semilla. Las pérdidas reportadas en literatura específica, han mostrado que la disminución de tocoferoles durante la refinación puede variar entre 10 y 33 % [12-13]; otros factores que influyen en dicha disminución son la luz, el oxígeno y la temperatura [12].

La Tabla 1 muestra la composición relativa porcentual de esteroides y tocoferoles de la fracción insaponificable (0,5 a 1,5%) del aceite de girasol [9].

| <i>esteroides</i>        | <i>%</i> | <i>tocoferoles</i>   | <i>%</i> |
|--------------------------|----------|----------------------|----------|
| Colesterol               | < 0,4    | $\alpha$ – Tocoferol | 91 – 97  |
| Brassicasterol           | 0        | $\beta$ – Tocoferol  | 3 – 6    |
| Campesterol              | 8 – 11   | $\gamma$ – Tocoferol | $\leq 2$ |
| Estigmasterol            | 7 – 10   | $\delta$ – Tocoferol | -        |
| B 5 sisteroles           | 58 – 64  | Tocotrienol          | -        |
| $\Delta$ Avenasterol     | 2 – 7    |                      |          |
| $\Delta$ 7 Estigmasterol | 9 – 14   |                      |          |
| $\Delta$ 7 Avenasterol   | 4 – 6    |                      |          |
| Isofucosterol            | 0,4 – 1  |                      |          |
| Fucosterol               | 2 - 3    |                      |          |

Tabla 1. Composición de la fracción insaponificable del aceite de girasol

Por otra parte, en la fracción insaponificable se halla el escualeno, un hidrocarburo que se encuentra en una proporción de 15 a 20 mg cada 100 g.

El aceite de girasol en Argentina tiene una composición de ácidos grasos que lo hace particularmente adecuado a las pautas actuales de nutrición y salud. Su contenido en ácidos grasos saturados es muy bajo, del orden del 10 al 14 %, mientras que los insaturados están en un 86 a 90 %. Dentro de los saturados, el ácido palmítico se encuentra en valores del orden de 7 %, sensiblemente menor que el resto de los aceites mas comunes [10]. Sin embargo, el equilibrio de ácidos grasos puede variar de acuerdo al híbrido de que se trate, y a la zona en la

que es sembrado. Así como las condiciones al final del ciclo de crecimiento (especialmente las condiciones de sequía asociadas con las altas temperaturas) ocasionan una reducción total del contenido de aceite, el equilibrio de los ácidos grasos también se encuentra sometido a fluctuaciones debido a diferentes factores [9]. Es conocido que la temperatura afecta la composición de ácidos grasos: a mayor temperatura ambiente durante el período de llenado de grano (hacia el principio de la etapa de síntesis de aceite), mayor será la proporción de ácido oleico y menor de linoleico; y a menor temperatura ocurrirá el efecto contrario [9,11,15,16]; la suma de ambos es siempre aproximadamente el 90 %. La temperatura afecta las enzimas vinculadas a la síntesis de ácidos grasos, sobre todo en la enzima que transforma el ácido oleico a linoleico.

Se ha observado que la temperatura que más incide sobre la enzima desaturasa, es la mínima nocturna, o sea, las bajas temperaturas que ocurren durante la noche [15]. Se ha estudiado además la respuesta de diferentes híbridos a la temperatura mínima nocturna durante ese estadio, comprobando que las respuestas se ajustan a una función sigmoidea, notándose que el porcentaje de oleico se relaciona con la temperatura mínima nocturna mediante una relación en la cual se pueden presentar tres fases [15]:

- 1) A bajas temperaturas, un incremento en la temperatura mínima nocturna no produce incremento del porcentaje de oleico.
- 2) Desde los 16 °C, un aumento de 1 °C en la temperatura, incrementa notablemente el porcentaje de oleico.
- 3) Desde los 20 a 22 °C, un aumento en la temperatura no incrementa el porcentaje de oleico.

Esto permite concluir que el porcentaje de ácido oleico depende de dos factores: del híbrido y de la temperatura en una etapa temprana del llenado de la semilla, lo cual sirve como base para ajustar el manejo del cultivo a fin de obtener diferentes calidades. Incorporando estas relaciones matemáticas a un modelo se puede simular el rendimiento y la calidad de granos y aceite.

El efecto de la temperatura sobre el cultivar puede ser regulado mediante la elección apropiada de la fecha de siembra (que puede ser temprana o tardía) y de la zona a sembrar

(norte, sur o centro del país). Se observa entonces, ya sea para una siembra temprana o tardía, que un híbrido de girasol tradicional, producirá aceites con alto porcentaje de ácido linoleico en el sur del país, debido a las bajas temperaturas. Pero también podría observarse que si se realiza una siembra tardía de este híbrido en el norte del país, el porcentaje de oleico podría llegar al 50 %, lo que es prácticamente un aceite similar al de un medio oleico pero obtenido a partir de híbridos, en localidades cálidas y en fechas adecuadas. Además, estos aceites producidos en condiciones cálidas contienen un menor porcentaje de ácidos grasos saturados, principalmente por tener menores cantidades de ácido esteárico y de ácidos grasos de cadena larga. Sin embargo, con híbridos tradicionales, no es posible pasar del 55 – 60 % de oleico, y en los casos en que se necesitan aceites con mayor contenido de oleico se deben utilizar híbridos medio o alto oleico según lo que se desee obtener. El mejoramiento ha producido híbridos alto y medio oleico con excelente calidad para diferentes usos, casi independientemente de la región y la fecha de siembra. Los híbridos alto oleico parecen estables sembrados en cualquier zona del país, por lo tanto, el cultivar se podría elegir por su rendimiento, porcentaje de aceite y otras características agronómicas tales como: ciclo, tolerancia a enfermedades, etc. [15].

En resumen, dependiendo del tipo de aceite que se desee obtener, se seleccionará el manejo más adecuado al cultivo, prestando especial interés a los siguientes dos factores [9]:

- **Factores genéticos:** como por ejemplo, cualquier contaminación del fragmento del girasol de alto oleico mediante el polen de girasol estándar, origina una reducción en el contenido de ácido oleico de la semilla cosechada. En consecuencia, existe la necesidad de mantener una separación adecuada entre las parcelas de girasol de los dos tipos (mínimo 500 m).
- **Factores ambientales:** en este caso el efecto de la temperatura es el principal factor. Durante el período de maduración, si existen condiciones de baja temperatura, se observa una disminución en el contenido de ácido oleico incrementándose a su vez el contenido de ácido linoleico.

Por su composición, el aceite de girasol está especialmente recomendado para dietas preventivas o terapéuticas de enfermedades cardiovasculares, ya que su bajo contenido en grasas saturadas, así como el significativo aporte de grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas, contribuyen a bajar el colesterol en sangre, especialmente el LDL sin disminuir el HDL.

El aceite de girasol se distingue por ser el que contiene el mayor contenido de  $\alpha$ -tocoferol, vitamina E, dentro de todos los aceites. Esto lo coloca a la vanguardia de los alimentos que aportan esta importante vitamina, la indicada para la prevención de la formación de radicales libres, ya que se trata de un poderoso antioxidante biológico natural [10].

### 1.2.5 – VARIEDADES

#### 1.2.5.1 – Girasol Tradicional (Linoleico)

La Tabla 2 muestra la composición media de los triglicéridos del aceite de girasol tradicional. Aproximadamente 1/3 de los triglicéridos se encuentran representados por la fracción LLL (trilinoleína), combinada con un contenido alto de oleo-dilinoleína (OLL), dando como resultado un punto de fusión relativamente bajo [9]. El resto de los triglicéridos presentes son: (PLL): palmito-dilinoleína, (OOL): dioleo-linoleína, SLL: estearo-dilinoleína, POL: palmito-oleo-linoleína, PPL: dipalmito-linoleína, OOO: trioleína, SOL: estearo-oleo-linoleína, POO: palmito-dioleína, PPO: dipalmito-oleína.

La Tabla 3 muestra la composición de los ácidos grasos en el aceite de girasol tradicional [9]. Los ácidos grasos detallados son: ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido margárico (C17:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolénico (C18:3), ácido araquídico (C20:0), ácido eicosenoico (o gadoleico) (C20:1), ácido behénico (C22:0) y ácido lignocérico (C24:0) [13].

| Triglicérido | % total |
|--------------|---------|
| LLL          | 36.3    |
| OLL          | 29.1    |
| PLL          | 11.3    |
| OOL          | 6.5     |
| SLL          | 7.5     |
| POL          | 4.0     |
| PPL          | 0.5     |
| OOO          | 0.6     |
| SOL          | 2.1     |
| POO          | 0.4     |
| PPO          | 0.7     |

Tabla 2: porcentajes de los triglicéridos del aceite de girasol tradicional

| Ácidos grasos | %       |
|---------------|---------|
| C 16:0        | 5 – 7   |
| C 16:1        | ≤ 0.4   |
| C 17:0        | ≤ 0.1   |
| C 18:0        | 4 – 6   |
| C 18:1        | 15 – 25 |
| C 18:2        | 62 – 70 |
| C 18:3        | ≤ 0,3   |
| C 20:0        | < 1     |
| C 20:1        | < 0,5   |
| C 22:0        | < 1     |
| C 24:0        | < 0,5   |

Tabla 3. Composición porcentual de los distintos ácidos grasos presentes en el aceite de girasol tradicional.

En la Tabla 4 se pueden apreciar las principales características físico-químicas o de genuinidad del aceite de girasol tradicional y sus respectivas normas [17].

| Parámetro   | Unidad                    | Mínimo           | Máximo           | Método de ensayo          |
|---|---------------------------|------------------|------------------|---------------------------|
| D <sub>25</sub> (densidad absoluta, en el vacío, a 25 °C) | g /ml                     | 0,9133           | 0,9173           | IRAM 5504-1               |
| Densidad relativa a 25 °C/4°                              |                           | 0,9130           | 0,9190           | C.A.A.                    |
| Índice de refracción a 25 °C                              | -                         | 1,4705<br>1,4719 | 1,4739<br>1,4740 | IRAM 5505<br>C.A.A.       |
| Índice de saponificación                                  | mg KOH / g                | 188,0<br>187,0   | 192,0<br>192,0   | IRAM 5516<br>C.A.A.       |
| Índice de yodo (Wijs)                                     | g de I <sub>2</sub> /100g | 110,0<br>119,0   | 138,0<br>138,0   | IRAM 5515-1 y 2<br>C.A.A. |
| Ácido oleico y sus isómeros                               | g / 100 g                 | -                | 54,9             | IRAM 5651                 |
| Ácido linoleico y sus isómeros                            | g / 100 g                 | -                | 69,9             | IRAM 5651                 |
| Índice de Bellier modificado                              | °C                        | 23               | 27               | C.A.A.                    |
| Reacción de Halphen-Gastaldi                              |                           | negativa         |                  | IRAM 5596                 |

Tabla 4. Propiedades físico-químicas y ensayos de genuinidad para el aceite de girasol tradicional.

#### 1.2.5.2 – Girasol Medio Oleico

Es el aceite de girasol que cumple con los requisitos de la Tabla 5 y está caracterizado por poseer un contenido de ácido oleico entre 55,0 g / 100 g y 76,9 g /100 g, expresado como éster metílico respecto de 100 g de ésteres metílicos totales [17]. En la tabla se pueden apreciar las principales características físico-químicas del aceite de girasol medio oleico y sus respectivas normas de calidad.

| Parámetro   | Unidad                    | Mínimo | Máximo | Método de Ensayo |
|---|---------------------------|--------|--------|------------------|
| D <sub>25</sub> (densidad absoluta, en el vacío, a 25 °C) | g /ml                     | 0,9108 | 0,9132 | IRAM 5504-1      |
| Índice de refracción a 25 °C                              | -                         | 1,4683 | 1,4704 | IRAM 5505        |
| Índice de saponificación                                  | mg KOH / g                | 188,0  | 192,0  | IRAM 5516        |
| Índice de iodo  | g de I <sub>2</sub> /100g | 91,1   | 109,9  | IRAM 5515-1 y 2  |
| Ácido oleico y sus isómeros.                              | g / 100 g                 | 55,0   | 76,9   | IRAM 5651        |

Tabla 5. Características físico-químicas del aceite de girasol medio oleico y sus respectivas normas de calidad.

### 1.2.5.3 – Girasol Alto Oleico

El aceite de girasol alto oleico está caracterizado por poseer un contenido de ácido oleico igual o superior a 77,0 g / 100 g, expresado como éster metílico respecto de 100 g de ésteres metílicos totales [17]. La aparición de variedades ricas en ácidos monoinsaturados se mencionó por primera vez en la ex - URSS en la segunda mitad de los años 70. La selección dio como resultado la aparición de materiales genéticos cuyas semillas contenían más de 50% de ácido oleico, rico en vitamina E y en buen equilibrio con los ácidos grasos polinsaturados. La característica más significativa es la inversión en los contenidos de ácidos linoleico y oleico entre el girasol alto oleico y el tradicional [9].

El aceite de girasol con alto oleico, especificado como  $\geq 77$  % de ácido oleico, según las normas de comercialización del Instituto Nacional de Productos Oleaginosos de los EEUU, es considerado como un sustituto de las grasas saturadas para numerosas aplicaciones, debido a su alta estabilidad [16] y baja concentración de ácidos linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3), lo cual le otorga un índice de iodo relativamente bajo, siendo dicho parámetro un buen indicador de la resistencia a la oxidación.

La producción de aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico ha experimentado un rápido crecimiento desde 1988; debido a la estabilidad de dicho aceite, el mismo no necesita la hidrogenación que otros aceites pueden requerir para ser usados en diversos productos.



El aceite de girasol alto oleico se obtiene de semillas híbridas de girasol, que presentan la característica de tener una elevada concentración de ácido oleico (grasa monoinsaturada), y una baja concentración de ácidos grasos polinsaturados y saturados. Este hecho representa una oferta interesante para el empleo en la industria culinaria, por su buena estabilidad oxidativa y su diseño nutricional.

La Tabla 6 muestra las principales características físico-químicas del aceite de girasol Alto Oleico y sus respectivas normas.

| Parámetro   | Unidad                      | Mínimo | Máximo | Método de Ensayo |
|---|-----------------------------|--------|--------|------------------|
| D <sub>25</sub> (densidad absoluta, en el vacío, a 25 °C) | g /ml                       | -      | 0,9107 | IRAM 5504-1      |
| Densidad relativa a 25 °C/4°                              |                             | 0,907  | 0,913  | C.A.A.           |
| Índice de refracción a 25 °C                              | -                           | -      | 1,4682 | IRAM 5505        |
|   |                             | 1,4672 | 1,4682 | C.A.A.           |
| Índice de saponificación                                  | mg KOH / g                  | 188,0  | 192,0  | IRAM 5516        |
|   |                             | 182,0  | 194,0  | C.A.A.           |
| Índice de yodo (Wijs)                                     | g de I <sub>2</sub> / 100 g | -      | 91,0   | IRAM 5515-1 y 2  |
|   |                             | 82,0   | 91,0   | C.A.A.           |
| Ácido oleico y sus isómeros                               | g / 100 g                   | 77,0   | -      | IRAM 5651        |
|   |                             | 75,0   |        | C.A.A.           |

Tabla 6. Características físico-químicas del aceite de girasol alto oleico.

#### 1.2.5.4 – Girasol Alto Linoleico

Es el aceite de girasol cuyas propiedades fisicoquímicas son descriptas en la Tabla 7, y está caracterizado por poseer un contenido mínimo de ácido linoleico de 73,0 g por 100 g, expresado como éster metílico respecto de 100 g de ésteres metílicos totales [17].

| Parámetro   | Unidad                      | Mínimo | Máximo | Método de Ensayo |
|---|-----------------------------|--------|--------|------------------|
| D <sub>25</sub> (densidad absoluta, en el vacío, a 25 °C) | g /ml                       | 0,9174 | -      | IRAM 5504-1      |
| Índice de refracción a 25 °C                              | -                           | 1,4740 | -      | IRAM 5505        |
| Índice de saponificación                                  | mg KOH / g                  | 188,0  | 192,0  | IRAM 5516        |
| Índice de iodo  | g de I <sub>2</sub> / 100 g | 140,1  | -      | IRAM 5515-1 y 2  |
| Ácido linoleico y sus isómeros                            | g / 100 g                   | 73,0   | -      | IRAM 5651        |

Tabla 7. Características físico-químicas del aceite de girasol alto linoleico.

#### 1.2.5.5 – Otros Aceites de Girasol

Recientemente se han publicado en revistas especializadas [18], aceites ricos en ácido esteárico y ricos en ácido palmítico, cuyos porcentajes de ácidos grasos se describen en la Tabla 8.

| aceite                | % saturados | % monoinsaturados | % poliinsaturados |
|-----------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| <b>alto esteárico</b> | 30/37       | 15                | 50                |
| <b>alto palmítico</b> | 33/45       | 12                | 45                |

Tabla 8. Composición media de ácidos grasos en aceites alto esteárico y alto palmítico.

Estos aceites tienen un valor muy importante porque son aceites vegetales sólidos y sirven para producir alimentos donde se requiere un cristal, por ejemplo, en galletitas, margarinas, alfajores y tortas. Por lo tanto, constituyen una importante herramienta tecnológica cuando se requieren productos con cristales, ya que se evitan los procesos de hidrogenación, que son los que producen las grasas trans, las que también deben limitarse en la ingesta [18].

## 1.3 – CULTIVO DE GIRASOL EN ARGENTINA

### 1.3.1 - HISTORIA

Los inmigrantes rusos llegaron a Argentina a mediados del siglo XIX, trayendo consigo semillas de girasol para comerlas como lo hacían en su tierra natal. No se sabe con certeza en que zona del país se cultivó por primera vez; posiblemente fue en Carlos Casares, provincia de Buenos Aires o en Colonia Santa Clara, provincia de Entre Ríos, hacia 1890 [11]. Se sembraba en pequeña escala para ser usado como alimento humano o para aves de corral [10]. Las áreas de cultivo fueron pequeñas hasta 1930, año en que se desata la gran crisis mundial. Por esta circunstancia, comenzó una siembra más intensiva para obtener aceite local y reemplazar el aceite importado. En 1930 se producen alrededor de 1500 ton y en 1945 alcanzan a 5000 ton. Comienzan a utilizarse algunas variedades de girasol de la Unión Soviética que tenían mejoramiento genético [11]. Durante esta etapa, caracterizada por la neta expansión del cultivo, se llegó a sembrar entre 1948 y 1949 la cifra récord de 1.806.256 hectáreas y se exportaron 103.000 ton de aceite en 1950, lo que le permitió al país ocupar una posición destacada dentro del mercado mundial [10].

En 1950 se obtuvieron bajos rendimientos, el clima y la aparición de enfermedades que afectan a los cultivos de girasol, tales como la roya negra y el complejo criptogámico “*peste negra*”, produjeron fuertes impactos negativos. Mundialmente hubo una caída de precios. Los avances en las técnicas de cultivo, así como las mejores semillas, no fueron suficientes incentivos para incrementar las hectáreas sembradas. No se logra superar las 500.000 ton anuales. En 1964 la situación cambia, comienzan a subir los precios, las enfermedades son controladas y entraron en escena los “girasoles rusos”, que contienen mas aceite. En una interesante publicación del Ing. Agr. Emilio Paulsen, “La industria de los aceites vegetales en la República Argentina” editada en 1923 se encuentran los siguientes datos [10]: rendimiento del girasol, hasta 200 hectolitros por hectárea y cada hectolitro pesa 40 kg; la semilla tiene un contenido de aceite de 30 % en Entre Ríos y 25 % en Buenos Aires y está conformada por 60 % de cáscara y 40 % de pepa.

En la actualidad se trabaja con semillas que contienen en promedio un 28 % de cáscara, 72 % de pepa y el contenido de aceite ronda el 50 % o más.

La etapa comprendida entre 1960 a 1975 puede denominarse etapa de recuperación. Gracias al trabajo de investigación realizado por las estaciones experimentales de INTA y de los semilleros particulares aparecieron variedades resistentes a enfermedades; el uso de estas nuevas variedades y la implementación de una mejor tecnología hicieron que los rindes obtenidos comenzaran una tendencia creciente [11].

A partir de de 1975 aparecieron los híbridos en el mercado nacional de semillas; si bien el primer híbrido se lanzó al mercado en 1972 recién en 1975 comenzaron a tener cierta difusión. En la actualidad casi el 100 % de la superficie se siembra con híbridos; su mayor capacidad de producción en semilla y aceite, así como el uso de mayor tecnología para su cultivo, explican el aumento de los rendimientos de aceite por hectárea alcanzados en los últimos años en el país [11].

En función de lo expuesto, es de suponer que los volúmenes de aceite producidos en un futuro inmediato en nuestro país seguirán la misma tendencia ascendente como consecuencia de [11]:

- La optimización de la tecnología aplicada al cultivo de girasol.
- El trabajo de la filotecnia que proveerá nuevos híbridos con mayor capacidad de producción o bien adaptados a zonas marginales, lo cual favorecerá la expansión del área cultivada.

### 1.3.2 – PRODUCCIÓN, EXPORTACIÓN Y CONSUMO DE ACEITE DE GIRASOL

Si bien una parte de la producción de semilla de girasol se emplea en confitería, la mayor cantidad se destina a la elaboración de aceite. En Argentina, el aceite de girasol es el segundo en importancia después de la soja por la magnitud de su producción y su consumo alimentario en el mercado interno. Las principales provincias productoras son Buenos Aires junto con Córdoba y La Pampa. El complejo oleaginoso constituye un sector estructuralmente exportador, llegando a abastecer a más de 80 países. Las exportaciones de girasol comprenden el aceite crudo y refinado, los pellets y en menor medida el grano [19].

La Tabla 9 detalla la producción, el comercio y el consumo mundial del aceite de girasol (valores expresados en miles de toneladas) [19].

Producción

| país             | 1997/98     | 1998/99     | 1999/00     | 2000/01     | 20001/02    | 2002/03     | 2003/04     | 2004/05     | 2005/06     | 2006/07     |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Federación Rusa  | 649         | 750         | 1240        | 1250        | 1025        | 1365        | 1610        | 1815        | 2320        | 2450        |
| UE - 27          |             |             | 2668        | 2442        | 1967        | 1985        | 2374        | 2181        | 2105        | 2223        |
| Ucrania          | 560         | 530         | 840         | 970         | 842         | 1150        | 1320        | 1265        | 1925        | 2050        |
| <b>Argentina</b> | <b>2118</b> | <b>2533</b> | <b>2019</b> | <b>1227</b> | <b>1441</b> | <b>1294</b> | <b>1205</b> | <b>1592</b> | <b>1551</b> | <b>1213</b> |
| Turquía          | 506         | 512         | 520         | 385         | 287         | 440         | 529         | 494         | 447         | 520         |
| India            | 370         | 390         | 425         | 408         | 470         | 532         | 546         | 397         | 512         | 417         |
| Resto            | 4286        | 4581        | 1590        | 1492        | 1386        | 1378        | 1609        | 1427        | 1642        | 1850        |
| Total mundial    | 8489        | 9296        | 9302        | 8174        | 7418        | 8144        | 9193        | 9171        | 10502       | 10723       |

Exportación

| país             | 1997/98     | 1998/99     | 1999/00     | 2000/01     | 20001/02    | 2002/03    | 2003/04     | 2004/05     | 2005/06     | 2006/07    |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| Ucrania          | 180         | 205         | 430         | 550         | 308         | 911        | 978         | 731         | 1579        | 1875       |
| <b>Argentina</b> | <b>1594</b> | <b>1854</b> | <b>1544</b> | <b>1004</b> | <b>1157</b> | <b>898</b> | <b>1007</b> | <b>1176</b> | <b>1220</b> | <b>870</b> |
| Federación Rusa  | 35          | 55          | 195         | 130         | 41          | 96         | 136         | 219         | 577         | 689        |
| UE - 27          |             |             | 303         | 161         | 85          | 154        | 230         | 184         | 128         | 147        |
| E.E.U.U.         | 370         | 363         | 286         | 247         | 205         | 51         | 107         | 57          | 95          | 77         |
| México           |             |             |             | 26          | 20          | 30         | 37          | 37          | 37          | 41         |
| Resto            | 797         | 636         | 141         | 104         | 108         | 108        | 170         | 228         | 241         | 159        |
| Total mundial    | 2976        | 3113        | 2899        | 2222        | 1924        | 2248       | 2665        | 2632        | 3877        | 3858       |

Consumo

| país             | 1997/98    | 1998/99    | 1999/00    | 2000/01    | 20001/02   | 2002/03    | 2003/04    | 2004/05    | 2005/06    | 2006/07    |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| UE - 27          |            |            | 2526       | 2537       | 2603       | 2553       | 2647       | 2900       | 3194       | 3302       |
| Federación Rusa  | 960        | 1005       | 1185       | 1366       | 1192       | 1482       | 1627       | 1720       | 1806       | 1884       |
| Turquía          | 545        | 577        | 562        | 517        | 443        | 474        | 591        | 625        | 712        | 724        |
| India            | 495        | 870        | 900        | 928        | 573        | 633        | 625        | 400        | 625        | 569        |
| China            | 169        | 183        | 199        | 335        | 230        | 313        | 329        | 282        | 352        | 437        |
| <b>Argentina</b> | <b>482</b> | <b>568</b> | <b>567</b> | <b>333</b> | <b>270</b> | <b>362</b> | <b>256</b> | <b>337</b> | <b>367</b> | <b>367</b> |
| Resto            | 5676       | 5654       | 2878       | 2170       | 2162       | 2045       | 2294       | 2269       | 2748       | 3156       |
| Total mundial    | 8327       | 8857       | 8817       | 8186       | 7473       | 7862       | 8369       | 8533       | 9804       | 10439      |

Tabla 9. Producción, exportación y consumo mundial de aceite de girasol desde 1997 a 2007.

## 1.4 - MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS

### 1.4.1 – INTRODUCCIÓN A LAS SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS

Sin duda, el método más comúnmente utilizado para realizar separaciones analíticas es la *Cromatografía*, un método que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. Su nombre deriva del griego *chroma* que significa “color” y *graphos* que significa “escribir”, dado que la primera descripción de la cromatografía hecha en términos casi modernos, atribuida a Michael Tswett en 1906, se trató de una separación de clorofila y otros pigmentos en un extracto de una planta, en donde obtuvo una secuencia de zonas coloreadas y cada una de estas franjas correspondía a un pigmento diferente.

Aunque en la actualidad, en muchas de las técnicas cromatográficas no se producen bandas coloreadas, Tswett anticipó las aplicaciones para una amplia variedad de sistemas químicos, que tienen en común los principios teóricos fundamentales y que se denominan bajo el término común de cromatografía.

La cromatografía es un método separativo basado en la distribución diferencial de los analitos entre dos fases, una de las cuales permanece estacionaria, y la otra es móvil; la separación es una consecuencia de las diferentes velocidades de migración que poseen los analitos al distribuirse repetidas veces entre las dos fases.

Las aplicaciones de la cromatografía han aumentado en gran manera en las últimas décadas, debido no solo al desarrollo de nuevos y diversos tipos de técnicas cromatográficas, sino también a la gran demanda por parte de los científicos, de mejores métodos para la caracterización de mezclas complejas.

La cromatografía agrupa un conjunto diverso de métodos, que permite a los científicos separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible, la cual se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria; aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. *“La cromatografía ha pasado a ser el principal método para la separación de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí”* [20].

#### 1.4.2 – CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

En la cromatografía de gases, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte,

y a diferencia de la mayoría de las separaciones cromatográficas, la fase móvil, no interacciona con las moléculas del analito, su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases: la *cromatografía gas-sólido* (CGS) y la *cromatografía gas-líquido* (CGL). La cromatografía gas-líquido es la que tiene mayor aplicación en todos los campos de la ciencia y su denominación se abrevia normalmente como *cromatografía de gases* o *cromatografía gaseosa* (CG). La cromatografía gas-sólido se basa en una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos como consecuencia de la adsorción física, o por la diferencia en los tamaños de las moléculas, como ocurre en la *cromatografía de exclusión por tamaños*. La cromatografía gas-sólido ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elución con colas, debido al carácter no lineal del proceso de adsorción, de modo que esta técnica no ha encontrado una gran aplicación excepto para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular [20].

#### 1.4.3 - INSTRUMENTAL

Si bien los instrumentos cromatográficos pueden ser muy complicados cuando poseen componentes adicionales, el instrumento básico es relativamente simple, tal como se muestra en la Figura 2. Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases son tres: el inyector, la columna y el detector; sin embargo, es necesario contar con otros accesorios que juegan roles muy importantes, y por tanto, resultan indispensables. Los mismos son, cilindros de gas transportador o gas *carrier* grado cromatográfico, válvulas reductoras de presión, manómetros, controladores de flujo (electrónicos o manuales), filtros para el gas transportador (tamiz molecular para eliminar agua y otras impurezas), jeringa tipo *Hamilton* para inyección de gases o líquidos (manual o automática), procesador de datos (computadora y sistema de adquisición de datos), sistemas independientes de control de temperaturas (para el horno, detector e inyector), estabilizador de corriente eléctrica, equipo UPS, y otros accesorios (liner, o-rings, septum, férulas, etc.).

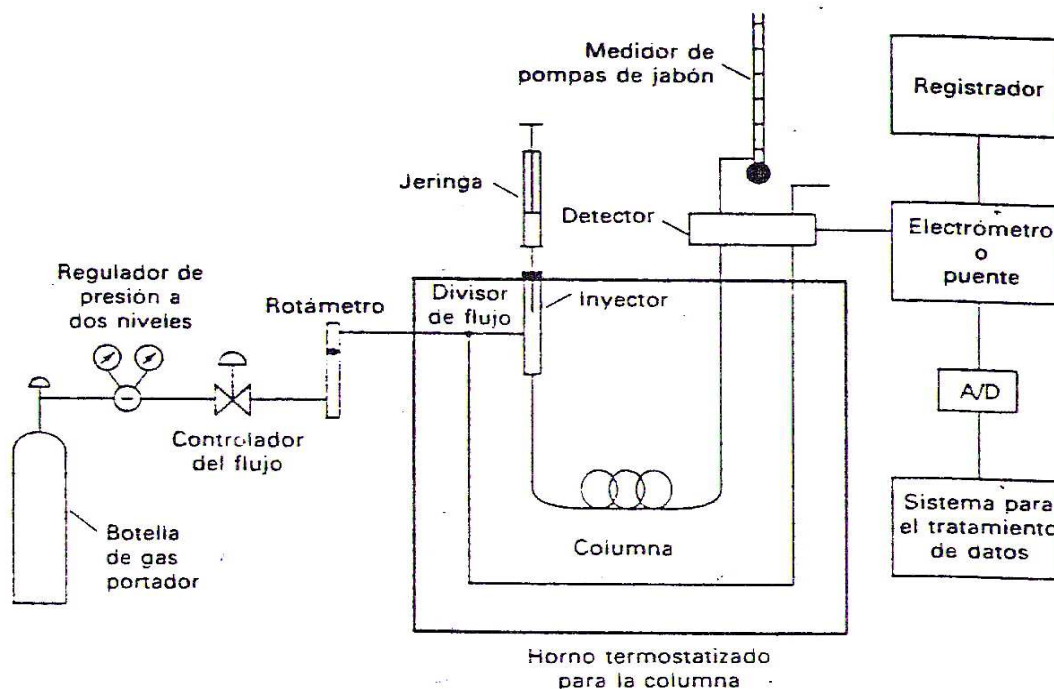


Figura 2. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases

#### 1.4.4 – PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA GAS - LÍQUIDO

Como ya se ha dicho, la fase móvil en CG es un gas (gas “carrier”) y los gases más comunes son el helio, hidrógeno, nitrógeno y argón. La elección del gas transportador depende principalmente de las características del detector. En la entrada o *cabeza* de columna está ubicado el puerto de inyección por medio del cual se pueden introducir las muestras en la corriente del gas transportador. Las muestras pueden ser gases o líquidos volátiles; es por ello el puerto de inyección está calefaccionado para que la fase líquida se vaporice con rapidez.

El volumen de inyección puede variar entre unos cuantos microlitros ( $\mu\text{L}$ ) para líquidos a unos cuantos mililitros (mL) para gases, y se introducen a través de un septum de plástico teflón por medio de una jeringa de inyección para CG. La corriente de gas transportador y muestra se encuentra con la columna, la cual está montada dentro de un horno a temperatura constante. Este es el corazón del instrumento, el lugar donde se lleva a cabo el proceso cromatográfico básico, es decir, la separación de los diferentes componentes de la muestra, debido a su diferente afinidad química con la fase estacionaria y el proceso de partición de las miríadas de moléculas entre ambas fases.



Las columnas varían mucho en tamaño (longitud y diámetro) y en material de empaque. Además, con el fin de ahorrar espacio, las columnas pueden tener forma de U o espiral.

La fase estacionaria es un líquido; la misma debe ser estable y no volátil a la temperatura de la columna, además debe ser adecuada a la separación que se va a realizar [21]. Hoy día las columnas vienen empacadas con una fase estacionaria adecuada a cada investigación de analitos que se desee realizar; en la etiqueta de la misma figura la temperatura máxima de trabajo, por encima de la cual se produce la volatilización o descomposición de la fase estacionaria, lo que comúnmente se conoce como el sangrado o *bleeding* de la columna.

El gas proveniente de la columna pasa a través de un detector, el cual tiene la capacidad de detectar una diferencia en la composición del gas debido a la presencia de un analito que forma parte de la muestra, para finalmente registrarlo en forma electrónica.

La velocidad de flujo del gas transportador es importante y por lo general, el aparato cuenta con un medidor de flujo electrónico. Puede existir otra válvula reguladora a la salida del sistema, aunque casi siempre los gases que salen se descargan a la presión atmosférica. Si se desea realizar una investigación posterior de los compuestos que salen de la columna, se debe instalar un accesorio que atrape estos analitos, siempre que el detector empleado no sea destructivo de la muestra [21].

#### 1.4.5 – COMPONENTES DEL CROMATÓGRAFO

##### 1.4.5.1 - Columna

La columna cromatográfica, es la que permite la separación de los componentes de una muestra y por ello, la elección de la misma determinará en gran medida el logro de los objetivos. Como ya se ha dicho, la fase estacionaria en la CGL es un líquido que se distribuye uniformemente en forma de una capa delgada en la superficie del soporte inerte, que luego se utiliza para empacar la columna, o bien en la cara interna de la columna misma. En este último caso, la columna se conoce como *columna tubular abierta* o *columna capilar*, que son actualmente, las más ampliamente usadas para determinaciones cuali-cuantitativas. Se trata de un tubo largo (enrollado para ahorrar espacio), de vidrio o de otro material.

La superficie de esta columna se cubre con una capa muy delgada de líquido estacionario, la cantidad justa que se adhiere como una película sobre el vidrio o el metal; no existe el empaque de la columna en el sentido acostumbrado. Los caminos a través de la columna son prácticamente de la misma longitud para todas las moléculas de la muestra y, por lo tanto, la difusión transversal y longitudinal es prácticamente cero en las columnas capilares. La película delgada del líquido, que no contiene estancamientos profundos, promueve una rápida aproximación al equilibrio durante el proceso de partición. Es por estos motivos que estas columnas son mucho más eficientes de lo que serían las columnas empacadas de la misma longitud [21].

Las columnas cromatográficas empacadas poseen una longitud de entre 2 m hasta 5 m aproximadamente. Las columnas capilares poseen largos que van desde los 10 m hasta los 60 m. Las columnas empacadas se construyen de acero inoxidable y vidrio, mientras que las capilares se construyen utilizando sílice fundida. A fin de poder colocarse en el interior del horno termostatzado, normalmente se configuran como helicoides con diámetros de 10 a 30 cm. La temperatura de la columna es una variable importante, que para un trabajo analítico preciso ha de regularse a las décimas de grado, por ello la columna normalmente se introduce dentro de un horno termostatzado [20].

#### 1.4.5.2 - Detectores

Si bien el proceso de separación ocurre en la columna, la misma tendría muy poco valor sin una forma para detectar y medir los analitos que se separan y salen de la columna. En la actualidad los cromatógrafos modernos utilizan detectores diferenciales que producen cromatogramas que consisten en picos; por lo general se trata de gráficos de una señal eléctrica en función del tiempo. Dos características son importantes en los detectores, su *sensibilidad* y su *estabilidad*. La sensibilidad del detector determina la cantidad de muestra más pequeña que se puede detectar y representa una limitación importante cuando se desea analizar vestigios de componentes mediante CGL. En lo referente a estabilidad, la línea base de un cromatograma siempre está sujeta a fluctuaciones a corto plazo cuya naturaleza es muy fortuita y que se conocen como “ruido”. Por otro lado, se le llama “desviación” o “deriva de la señal” a una línea más larga que va de arriba a abajo de la línea base; ambos fenómenos se

pueden originar en varios componentes del instrumento como los amplificadores o los registradores y en fluctuaciones de la velocidad del flujo del gas transportador. La desviación o deriva de la señal se observa cuando en una operación a temperatura programada, la columna tiene un tiempo de demora en alcanzar la estabilidad térmica. Este problema se puede eliminar por medio de un circuito bien diseñado, con componentes de alta calidad y con la operación adecuada del cromatógrafo, aunque, siempre existirá un nivel de ruido inherente al detector, el cual junto con la sensibilidad, establece el límite inferior para la detección de un soluto [21]. Existe una relación inversa entre la sensibilidad y el límite de detección, y se formula como:

$$S = R / LOD$$

Siendo:

S: sensibilidad

R: ruido

LOD: límite de detección

De la ecuación se refleja el hecho de que, para un nivel de ruido constante, a medida que disminuye el límite de detección, aumenta la sensibilidad.

Existen varios tipos de detectores, entre ellos los detectores de:

- conductividad térmica,
- ionización de llama,
- captura de electrones,
- electroquímico,
- emisión atómica
- espectrómetro de masas
- nitrógeno-fósforo
- descarga de helio

#### 1.4.5.2.1. *Detector de ionización de llama*

Los detectores de ionización (o FID de su sigla en inglés *flame ionization detector*) se basan en el principio de que una mezcla gaseosa es un aislante eléctrico casi perfecto a temperaturas comunes, a menos que estén presentes electrones, átomos o moléculas

eléctricamente cargadas. La presencia de esas partículas cargadas puede ser producida por una fuente de radiación externa, por ejemplo rayos beta, por la temperatura de una llama o por energías del orden de las radiofrecuencias. El número de partículas cargadas puede medirse aplicando una diferencia de potencial adecuada entre dos electrodos y midiendo la corriente que circula. Según la naturaleza del detector, la corriente puede aumentar o disminuir cuando se eluye una especie química particular de la columna de CGL e ingresa al detector.

En un detector de ionización de llama, que se muestra en la Figura 3, el gas efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y oxígeno, se pasa a través de una aguja hueca de acero inoxidable y se quema en la punta de la aguja. Justamente por encima de la llama se coloca un aro de alambre de platino; se aplica un potencial adecuado entre la aguja y el alambre de platino y se mide la corriente que fluye utilizando un amplificador de señal apropiado.

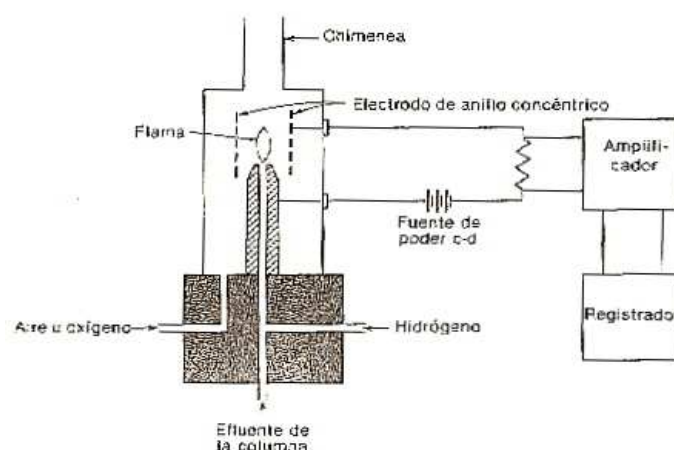


Figura 3. Diagrama esquemático del detector de ionización de llama y su circuito asociado.

La corriente que fluye es proporcional a la concentración de material que produce la ionización, para intensidades que oscilan entre  $10^{-12} - 10^{-5}$  A. Este detector responderá a todos los compuestos orgánicos con excepción del ácido fórmico. Es insensible a los compuestos inorgánicos, al agua y a los gases permanentes [22].

La ionización en la llama de los compuestos que contienen carbono no es un proceso bien establecido, aunque se observa que el número de iones que se produce es aproximadamente igual al de átomos de carbono transformados en la llama. El detector de ionización de llama, debido a que es un detector que responde al número de átomos de

carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, es sensible a la masa, mas que un sistema sensible a la concentración. En consecuencia, este detector tiene la ventaja de que los cambios en el caudal de la fase móvil tienen poco efecto sobre la respuesta del detector [20]. La concentración de los iones en el espacio entre los electrodos y, por tanto, la magnitud de la corriente, dependen de la velocidad con la que llegan las moléculas de soluto a la llama. Un peso determinado de soluto que alcanza la llama en una unidad de tiempo dará la misma respuesta del detector sin importar el grado de dilución causado por el gas transportador. Por esto se dice que el detector no responde a la concentración de soluto sino más bien a la velocidad del flujo de masa del soluto [21]. El detector de ionización de llama posee una elevada sensibilidad ( $\approx 10^{-13}$  g/s), un gran intervalo lineal de respuesta ( $\approx 10^{-7}$ ) y un bajo ruido. Una desventaja de este detector, es que se trata de un detector destructivo de la muestra [20].

#### 1.4.5.3. Sistema de Integración de Picos Cromatográficos

El área contenida bajo un pico cromatográfico es proporcional a la cantidad de material que fue inyectado originalmente en el cromatógrafo. Éste área puede ser determinada en una serie de modos, aunque en la actualidad el método de integración electrónica es el más preciso y forma parte de cualquier equipo moderno. En la integración electrónica, la señal eléctrica proveniente del detector es enviada a un integrador electrónico, que comúnmente es un convertidor de voltaje en frecuencia, cuya frecuencia de salida es proporcional al voltaje de entrada. El conteo de salida del integrador es totalizado, usando un contador electrónico de alta velocidad, y es proporcional al área del pico. En el integrador electrónico deben incluirse accesorios bastantes sofisticados para tener en cuenta el corrimiento de la línea base, y en los cromatogramas de picos múltiples para detectar el comienzo y el final del pico. El área de los picos sucesivos es registrada automáticamente. Estos accesorios son bastante caros, pero son ampliamente usados donde se requiere gran exactitud, y en donde deben integrarse diariamente un número muy grande de cromatogramas [22].

#### 1.4.5.4 - Inyector

Aquí es donde se introduce la muestra. Las muestras líquidas se inyectan a través de un pequeño disco o “septum” de goma de silicona, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna, utilizando una jeringa para cromatografía. El esquema de un inyector convencional se muestra en la Figura 4 [20].

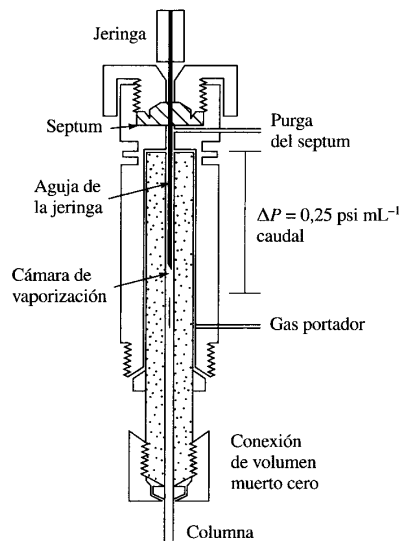


Figura 4. Vista transversal de un inyector de vaporización instantánea.

Por lo general, el puerto de inyección tiene un sistema de calentamiento independiente de la unidad de calentamiento del horno [21]. La cámara de inyección normalmente está unos  $50^\circ \text{C}$  por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra. Para las columnas analíticas ordinarias, el tamaño de muestra varía desde unas pocas décimas de microlitro a  $20 \mu\text{l}$ . Las columnas capilares exigen muestras mucho menores ( $\approx 10^{-3} \mu\text{L}$ ); en estos casos se emplea un divisor de la muestra (split) que permite pasar a la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechándose el resto [20].

#### 1.4.6 – ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN INFRARROJA

La espectroscopía es la medición de un espectro: la evaluación cuantitativa de la cantidad de luz a una determinada longitud de onda [7]. La espectroscopia infrarroja tiene una gran aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo. En el caso de la cuantificación de un componente, la elevada selectividad del espectro infrarrojo hace posible la cuantificación de una sustancia en una mezcla compleja, no siendo necesario una separación previa [23].

El término de espectroscopía infrarroja designa normalmente el estudio de la absorción de la radiación de longitudes de onda comprendidas entre 1 y 1000  $\mu\text{m}$  ( $10^3 - 10^6$  nm). Este intervalo se acostumbra a dividir en tres regiones: el “infrarrojo próximo o cercano”, que es la región comprendida entre 0,8 y 2,5  $\mu\text{m}$ , el “infrarrojo medio” que está entre 2,5 y 50  $\mu\text{m}$ , y el “infrarrojo lejano”, que corresponde a la región del espectro de 50 a 1000  $\mu\text{m}$  [23-24].

Por lo general, la radiación infrarroja no es suficientemente energética como para producir transiciones electrónicas [23], así los espectros de absorción en el infrarrojo (IR) se originan en las transiciones entre los niveles vibracionales y rotacionales de las moléculas que se encuentran en su estado electrónico fundamental [24].

La absorción de la radiación correspondiente al IR lejano sólo produce cambios de energía rotacional. Los espectros rotacionales puros solamente se observan en gases, pues en líquidos y en sólidos los estados rotacionales no están bien definidos y la absorción origina un espectro continuo en vez de líneas discretas. Cuando se absorben radiaciones de otras regiones del IR, el principal efecto producido por los cambios rotacionales sobre los espectros de las fases condensadas (sólidos y líquidos) es el de ensanchamiento de las bandas vibracionales resultando un espectro continuo [23-24].

Los átomos en las moléculas no son estacionarios; las moléculas vibrantes se pueden considerar con buena aproximación como conjuntos de masas puntuales que se mantienen unidas por fuerzas que siguen la ley de Hooke; de hecho, el comportamiento vibratorio de dos átomos unidos por un enlace es semejante al de un par de esferas unidas por un resorte. Para pequeños desplazamientos, la fuerza de retorno es proporcional al desplazamiento (ley de Hooke), y cuando el sistema se pone en movimiento, la vibración resultante viene regida por la ley del movimiento armónico simple, la que se describe a través de la ecuación 1:

$$\nu = \frac{\sqrt{k (M_a + M_b / M_a M_b)}}{2 \Pi}$$

Ecuación 1

En la que  $\nu$  es la frecuencia de vibración,  $M_a$  y  $M_b$  son las masas de los dos átomos unidos por el enlace, y  $k$  es la constante de fuerza de este enlace químico.

De acuerdo con la mecánica clásica, se puede demostrar que los desplazamientos de las masas a partir de sus posiciones medias son siempre iguales a la suma de los desplazamientos de determinados conjunto de vibraciones, en las cuales dichas masas se mueven en línea recta y en fase. Cuando las masas están en fase, los núcleos están en sus posiciones medias y sus puntos extremos simultáneamente, de modo que el centro de gravedad de la molécula permanece inalterado. El número de conjuntos de vibraciones de este tipo permitidas es igual al número de grados de libertad vibracional ( $3N-6$ ) y reciben el nombre de *modos normales o fundamentales de vibración* de la molécula; por lo tanto, un modo normal de vibración es aquel en el cual, en ausencia de otros modos normales, cada núcleo ejecuta oscilaciones armónicas simples en línea recta alrededor de su posición de equilibrio. Con frecuencia los modos normales de vibración están localizados preponderantemente en un grupo de átomos de la molécula, así algunas de las vibraciones moleculares son características de la molécula en conjunto (vibraciones llamadas “huellas dactilares”) y otras están asociadas a ciertos grupos funcionales [24].

Las vibraciones se pueden clasificar en dos grandes grupos: los de tensión o de valencia (*stretching*) y las de flexión o de deformación (*bending*). Las vibraciones de tensión son aquellas en las que dos átomos unidos por un enlace de valencia oscilan haciendo variar continuamente la distancia que les separa, pero sin alterar el eje ni los ángulos de enlace. Además, pueden ser vibraciones aisladas o acopladas. Las vibraciones de deformación o de flexión se caracterizan por producir la variación continua del ángulo de enlace. Se subdividen en vibraciones de aleteo, de balanceo, de torsión y de tijera [24] tal como se muestra en Figura 5.



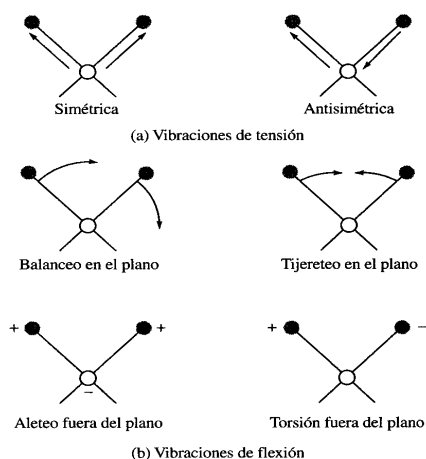


Figura 5. Diferentes modos de vibración molecular. (+) indica movimiento hacia la parte anterior del plano del papel y (-) indica movimiento hacia la parte posterior de dicho plano.

Las vibraciones de tensión y de flexión están cuantizadas; esto es, la energía vibracional total puede poseer solamente los valores que satisfagan la ecuación 2:

$$(Energía\ total)\ E = \sum E_j = hv_1 (v_1 + 1/2) + hv_2 (v_2 + 1/2) + \dots$$

Ecuación 2.

En la que  $\nu_j$  es la frecuencia del modo normal  $j$ -ésimo, y  $v_j$  es el número cuántico vibracional, que puede adoptar sólo valores enteros 0, 1, 2, 3, etc. Cuando se irradia una molécula con radiación electromagnética de la misma frecuencia que uno de sus modos normales de vibración, tiene lugar la absorción de la misma, lo que da lugar a un reforzamiento de la vibración molecular, con lo que aumenta su amplitud. El exceso de energía que libera la molécula cuando regresa a su estado vibracional fundamental se disipa en forma de calor [24].

Para que la molécula vibrante pueda interactuar con el campo eléctrico alternante de la radiación incidente (absorber radiación infrarroja) y pueda experimentar una transición entre dos de sus niveles energéticos, es preciso que su momento dipolar eléctrico molecular varíe de magnitud o de orientación durante el movimiento vibratorio [23-24]. Solo en estas circunstancias, el campo eléctrico alternante de la radiación puede interactuar con la molécula, y causar así cambios en la amplitud de alguno de sus movimientos.

Si la frecuencia de la radiación iguala exactamente a la frecuencia de vibración natural de la molécula, ocurre una transferencia neta de energía que da lugar a un cambio en la amplitud de la vibración molecular; como consecuencia se absorbe radiación.

De manera análoga, la rotación de moléculas asimétricas alrededor de sus centros de masa produce una fluctuación dipolar periódica que puede interactuar con la radiación [23]. La intensidad de la banda de absorción viene determinada por la magnitud de esta variación del momento dipolar. Debido a la simetría que presentan algunas moléculas, algunas vibraciones no inducen variaciones del momento dipolar y por lo tanto, no se detectan en el espectro infrarrojo [24].

Muchos de los modos de vibración posibles en las moléculas poliatómicas se comportan como absorbentes extremadamente débiles o *degenerados*, por lo tanto, el número de modos fundamentales observados en los espectros IR suele ser menor que el valor teórico  $3N-6$ . Por otra parte, en los espectros experimentales de ciertas moléculas se ha encontrado que se presenta un número de absorciones vibracionales superior a lo normal; este exceso se puede atribuir a los “armónicos” (múltiplos de las frecuencias normales,  $2\nu$ ,  $3\nu$ , etc.), a los “tonos de combinación” (es decir  $\nu_1 + \nu_2$ ,  $\nu_3 + \nu_4$ , etc.) y a los “tonos de sustracción” ( $\nu_1 - \nu_2$ ,  $\nu_5 - \nu_6$ , etc.). Generalmente, los armónicos y los tonos de combinación originan bandas de absorción débiles, y su presencia indica que el movimiento de los átomos no es verdaderamente armónico, ya que las transiciones en cuestión no están “permitidas”, si los cálculos se basan en el modelo del oscilador armónico [24].

La energía potencial de un oscilador armónico cambia periódicamente al fluctuar la distancia entre las masas. Sin embargo, desde un punto de vista cualitativo es evidente que esta es una descripción imperfecta de la vibración molecular. Por ejemplo, cuando dos átomos se acercan entre sí, la repulsión coulombica entre los dos núcleos produce una fuerza que actúa en la misma dirección que la fuerza restauradora del enlace y por tanto, puede esperarse que la energía potencial se eleve más rápidamente que lo que predice la teoría del oscilador armónico. En el otro extremo de la oscilación se produce una disminución de la fuerza restauradora, y a su vez de la energía potencial, cuando la distancia interatómica se acerca a aquella en la que se produce la disociación de los átomos [23].

Estas desviaciones del modelo, son las responsables de la aparición de las líneas de sobretono (armónicos de baja intensidad) a frecuencias unas dos o tres veces mayores que la frecuencia de la línea fundamental, y los picos de absorción con frecuencias que aproximadamente son la suma o la diferencia de sus frecuencias fundamentales [23].

#### 1.4.7 – ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIRS)

La Espectroscopía de reflectancia en la región del Infrarrojo Cercano (NIR) es una técnica que ha ido ganando aceptación en los últimos años como una poderosa herramienta de diagnóstico, control y monitoreo de procesos, principalmente por la velocidad de análisis y por constituirse en un método no destructivo ni contaminante [16]. De hecho es ampliamente utilizada en la determinación de proteínas, humedad, almidón, lípidos y celulosa en productos agrícolas [23].

Este método se basa en el siguiente principio: cuando la radiación IR incide sobre una muestra, una porción de los fotones serán absorbidos por uniones químicas específicas, mientras que otros serán diseminados y reflejados por la materia; este proceso es comúnmente descrito como Reflectancia en el Infrarrojo Cercano NIRS (del inglés *Next Infrared Reflectance Spectroscopy*). En contraste algunos de los rayos pasarán a través de la muestra, lo que es denominado Transmisión NIR (a menudo referida como NIT) [25].

La radiación que incide sobre una muestra, sufre tres posibles rutas de escape [7]:

- 1) Puede ser absorbida por la muestra.
- 2) Puede ser directamente reflejada (como un espejo).
- 3) Puede ser dispersada, es decir, reflectada en una gama amplia de ángulos.

La absorción de la radiación incidente, es la resultante del efecto de la radiación sobre los enlaces químicos específicos en la sustancia que se está analizando. A pesar de que el material pueda parecer sólido e inmóvil a nuestro sistema óptico, los átomos y los electrones que se encuentran en el material se mueven permanentemente, y los enlaces entre los átomos se encuentran constantemente bajo tensión; a medida que se aplica energía (a través de la radiación infrarroja incidente), aumenta esta vibración que hace doblar, retorcer y oscilar al enlace.

El tipo de enlace determina la longitud de onda que provocará su movimiento, es decir, la longitud de onda que será absorbida [7].

El gran número de vibraciones que presentan las moléculas poliatómicas es causa de que el espectro infrarrojo contenga una gran cantidad de información. Así, el espectro vibracional es una propiedad característica de las moléculas, por lo que resulta muy útil para fines de identificación cualitativa, análisis cuantitativo e identificación de estructuras [23].

Toda materia prima orgánica está formada por componentes que contienen grupos funcionales que absorben en la región del infrarrojo cercano. La cantidad relativa de enlaces específicos se relaciona directamente con la abundancia de las entidades químicas fundamentales que son de interés [7].

La interacción de la energía con la materia obedece la ley de Lambert-Beer, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional a la concentración de las moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación. Esto determina que para un material de naturaleza química heterogénea, el espectro obtenido en la región del infrarrojo cercano es la combinación de bandas de absorción parciales sobrepuestas o muy cercanas, que suelen confundirse en una línea suavizada, en la que se encuentran picos, valles y curvaturas en forma de hombro [8].

La absorción es la propiedad inversa de la reflectancia y a pesar de que el instrumento (en la mayoría de las situaciones) mide la reflectancia, los datos del espectro se convierten en unidades de absorbancia antes de continuar con el proceso. El argumento es simplemente de detección; se mide lo que se refleja y de allí se infiere lo que ha sido absorbido [7]. En el proceso de reflectancia, los rayos no son simplemente reflejados de la superficie externa, sino que realmente penetran la muestra. Una unión química que no absorbe una particular longitud de onda, reflejará la radiación incidente en todas direcciones. Estos rayos podrán ser absorbidos o reflejados por otras uniones químicas, hasta que una porción de los mismos eventualmente salga de la muestra en todas direcciones. La profundidad de penetración del haz dentro de la muestra no está determinada por la posición del detector, sino más bien por la potencia de la fuente de luz.

La reflectancia NIR es ideal para productos que son ópticamente densos, como es el caso de muestras de girasol [25]. La densidad óptica para una determinada longitud de onda se relaciona con la transmitancia de un elemento óptico. Cuanto mayor es la densidad óptica, menor es la transmitancia.

Los medios más refringentes son aquellos en los que la luz se propaga a menor velocidad; se dice también que tienen una mayor densidad óptica. Por regla general, la refringencia de un medio va ligada a su densidad de materia, pues la luz encontrará más dificultades para propagarse cuanta mayor cantidad de materia haya que atravesar para una misma distancia.

Así pues, a mayor densidad, menor velocidad y mayor índice de refracción (Cuanto más ópticamente denso es un material, más lentamente se moverá la onda a través de él).

En general, deben combinarse los datos obtenidos en el infrarrojo con la información procedente de otros métodos de análisis. Al desarrollar una calibración NIRS, la información espectral se relaciona mediante un algoritmo con la información de la composición físico-química obtenida de un método de referencia a través de la aplicación de modelos estadísticos como el Análisis de Componentes Principales (PCA de *Principal Component Analysis*), la Regresión de Componentes Principales (PCR de *Principal Component Regression*) o la Regresión por Cuadrados Mínimos Parciales (PLS de *Partial Least Square Regression*). De los anteriores, el más frecuentemente utilizado en análisis cuantitativo es el PLS [8, 26, 27, 28].

#### 1.4.8 – MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIADA

Estas herramientas estadísticas, PCA, PCR Y PLS, llamadas en conjunto herramientas de Calibración Multivariada, son usadas para el desarrollo de un modelo matemático-cuantitativo con el objeto de poder obtener una predicción de las propiedades de interés en una muestra ( $y_1, y_2, \dots, y_q$ , siendo  $y$ , por ejemplo, la concentración de diversos analitos de interés) desde un número de variables respuesta iniciales ( $x_1, x_2, \dots, x_p$ , siendo  $x$ , por ejemplo, medidas de absorbancia a diferentes longitudes de onda) [27].

En calibración uni o multivariada el procedimiento analítico general está constituido por dos etapas [26]:

- *Tratamiento de la muestra:* en donde se deben realizar algunos procedimientos químicos y/o físicos de diversa complejidad a fin de obtener el acondicionamiento de la muestra y del sistema, donde una cantidad física medible es correlacionada con una cantidad química a ser medida.
- *Cuantificación:* este proceso consta a su vez de tres etapas; 1) Modelado o Calibración, 2) Predicción y 3) Validación.

Los métodos de calibración multivariada involucran a más de una variable independiente ( $p > 1$ ), a diferencia de la calibración univariada en donde solamente hay una única variable ( $p = 1$ ).

Esta diferencia abre nuevas posibilidades como por ejemplo, el uso de todas o gran número de longitudes de onda en un espectro completo como mecanismo de calibración y predicción, en vez de la señal simple a la longitud de onda más sensible. El uso de información espectral completa puede permitir mejores predicciones, pero también existe la posibilidad de que regiones espectrales poco o nada relevantes sean incluidas en el modelo durante la calibración. Sin embargo, el uso de más de una variable independiente permite la estimación de más de una propiedad dependiente ( $q > 1$ ) y la corrección de covarianzas indeseables (interferencias). La mayor aplicación actual se centra en el área de química analítica, sobre todo en el desarrollo y aplicación de modelos de calibración predictivos con fines cuantitativos. Tal es el caso de la determinación simultánea de la concentración de varios analitos en una mezcla multicomponentes, donde se puede elegir la metodología más adecuada a partir de un gran arsenal de métodos espectroscópicos (por ejemplo, UV-Visible, IR, NIR, NMR) [27].

#### 1.4.8.1 – Fundamentos Matemáticos del PLS

El PLS es un procedimiento de modelado que estima simultáneamente los factores subyacentes en la matriz de concentraciones o variables dependientes  $Y$  (definida también como variables de concentraciones  $C$ ) y en la matriz de variables independientes  $X$  (o respuestas  $R$ ).

El PLS responde a un método inverso [29-30], cuya característica principal es por lo general, que el modelo permite relacionar las medidas instrumentales (R) y las concentraciones (C). La concentración se calcula en función de las respuestas, como lo muestra la ecuación 3 [26, 31, 32]:

$$R = TP + E \quad (a)$$

$$C = UQ + F \quad (b)$$

Ecuación 3

Donde los elementos T y U son matrices llamadas *scores* de R y C respectivamente, y relacionan la información en la matriz de respuesta R con la matriz de concentraciones C, a través de la correlación que existe en las matrices de covarianza de R y C.

Las matrices P y Q son conocidas como *loadings* de R y C respectivamente, e indican las coordenadas de los datos iniciales sobre las nuevas componentes PLS. E y F son las matrices de error asociado al modelado de R y C para el modelo PLS.

En situaciones de idealidad, las fuentes de variación de R son exactamente iguales a las fuentes de variación en C, siendo por consiguiente idénticos los factores de T y U para R y C. En aplicaciones reales, R varía en forma no correlacionada a la variación de C (ya que R depende de variaciones instrumentales y C de variaciones operacionales), por lo que  $t$  es distinto de  $u$  (escritos ahora en letra minúscula porque representan los vectores que dan origen a las coordenadas de cada uno de los componentes PLS utilizados en el modelo). Sin embargo, cuando las matrices R y C son utilizadas para estimar los factores, existen entre ellos una nueva relación, definida por la ecuación 4.

$$u = bt + g$$

Ecuación 4

Donde  $b$  es el término de relación interna entre  $u$  y  $t$ , y  $g$  el error asociado [32-33].

Una vez obtenido el modelo matemático respectivo, a través del PLS se puede predecir los parámetros de interés (concentraciones de analitos) en una muestra incógnita. Dicha muestra producirá un vector de respuestas  $r_{desc}$ , el cual es operado matemáticamente en la ecuación 3(a) para obtener un vector de  $t_{desc}$ , con el cual se puede conocer el vector  $u_{desc}$ , haciendo uso de la ecuación 4, el cual es finalmente utilizado para conocer la matriz de

concentraciones de la muestra incógnita  $c_{desc}$ , utilizando la ecuación 3(b). En definitiva, el modelo estará conformado por una serie de matrices y vectores ordenados por el programa, que operan matricialmente con los datos de respuestas o señales de la muestra incógnita.

La consecuencia de esto es que la información inicial contenida a lo largo de  $n$  variables (por ejemplo, valores de absorbancias de un barrido espectral completo), se ve condensada en unas pocas nuevas variables ortogonales entre sí, con lo cual queda resaltada solamente la información útil con los primeros componentes PLS y la información redundante queda confinada en los últimos (definida por la matriz de errores).

Si se selecciona un número elevado de componentes PLS, el modelo se ajustará adecuadamente pero con el costo de tener incorporado en él gran cantidad de información irrelevante (sobreajuste), con lo cual las matrices de error se hacen pequeñas al utilizarse la información relevante e irrelevante. Por el contrario, si el número de componentes PLS seleccionado es muy pequeño, se corre el riesgo de dejar de lado información vital del sistema en estudio (subajuste) y las matrices de error del modelo se tornan grandes [27, 33].

En la figura 6 se representa el funcionamiento del PLS en términos generales para hallar los componentes PLS.

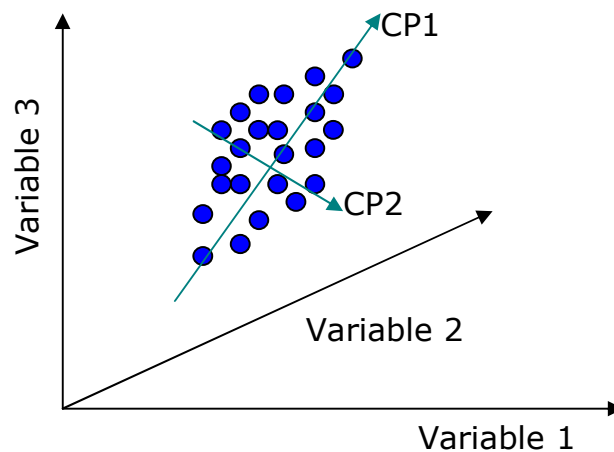


Figura 6: Dirección de los componentes PLS a partir de una nube de puntos tridimensional.



En el gráfico se observa claramente como opera el PLS para obtener un modelo a partir de una nube de puntos tridimensional. Se puede observar que el primer componente principal (CP1) tiene la dirección hacia la máxima elongación de la nube de puntos en las tres dimensiones del ejemplo (variables respuesta originales), definidas por la matriz de covarianzas del sistema. El segundo componente principal (CP2) tiene la dirección de la segunda mayor elongación de la nube en las tres dimensiones, ortogonal al CP1. Cada componente principal que subsecuentemente surja en  $n$  dimensiones, será ortogonal a los anteriores, por lo que se generará un nuevo sistema de ejes cartesianos que se orientará hacia donde exista la mayor elongación de la nube de puntos y por ende, mayor información. Por otra parte, se produce una sustancial reducción de variables ya que, como se aprecia en el gráfico, dos componentes PLS modelan a las tres variables originales y esto se hace más sensible en espacios  $n$  dimensionales con  $n$  variables, con una reducción a unos pocos componentes PLS [33].

Una de las mayores ventajas de este método estadístico, es la de tener en cuenta interferencias que no hayan sido previstas durante la confección del modelo ya que evalúa en forma independiente los errores de la matriz de respuesta por un lado y los de la matriz de concentraciones por el otro, lo que le da una mayor versatilidad debido a que es más factible su aplicación a sistemas reales. El PLS se ha aplicado y se aplica a un amplio rango de muestras para determinar diversos analitos de interés en ellas [28].

El valor  $r^2$  del modelo PLS es un índice muy importante que definirá la calidad del ajuste obtenido por el mismo. El modelo PLS es obtenido a partir de un determinado número de calibradores o patrones, los cuales contendrán en cantidades conocidas y variables de los distintos analitos de interés que se esperan hallar en la muestra real. Los puntos discrepantes o outliers son patrones o variables atípicas. Si son resultados de medidas erróneas deben ser quitados del modelo, o éste no será el correcto. Pero por otro lado, pueden ser valiosos si representan un fenómeno importante desconocido y, en esos casos, deben conservarse; el eliminarlos podría implicar un modelo incorrecto. La decisión final corre por cuenta exclusiva del analista. El problema de identificar puntos discrepantes puede resultar difícil, aunque en términos generales, el patrón en cuestión aparecerá muy separado del resto, con valores excesivamente altos o bajos [31].

Existen diferentes herramientas de evaluación del modelo obtenido; una de ellas es el porcentaje de varianza explicada del modelo. El porcentaje de varianza explicada es la cantidad de varianza que define el modelo, para un dado número de factores, relativo a la varianza total del sistema. Este diagnóstico sirve para evaluar problemas con los datos, tales como errores significativos en los valores de concentración de referencia o desviaciones en la ley de Lambert-Beer, entre los espectros y las concentraciones.

El porcentaje de varianza explicada se calcula a partir de la raíz cuadrada del error medio de la calibración, RMSEC (de *Root Mean Square Error Calibration*) y el factor  $r^2$ , que es el factor de regresión del modelo. El RMSEC debería disminuir a medida que aumenta el número de componentes PLS utilizados para el modelo. Sin embargo, si el número de dichos componentes es demasiado elevado, puede incluir en ellos información irrelevante asociada con los ruidos del sistema [31, 33].

Otro parámetro de evaluación del modelo son los errores de predicción, que resultan medidas útiles para seleccionar el número óptimo de factores a incluir en el modelo.

Esto es debido a que los modelos son a menudo usados para predecir la concentración en futuras muestras desconocidas. La estadística utilizada para cuantificar el error en la predicción es la raíz cuadrada del error medio de la predicción, RMSEP (Root Mean Square Error Prediction) que se observa en la ecuación 5.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{\text{nmuestras}} (c_i - \hat{c}_i)^2}{n \text{ muestras}}}$$

Ecuación 5

Donde  $c_i$  es la concentración observada de la  $i$ -ésima muestra predicha,  $\hat{c}_i$  es la concentración predicha para esa muestra y  $n$  es el número de muestras predichas [31].

Hay dos formas de generar un conjunto de validación para estimar los errores de predicción: la validación interna (por ejemplo, validación cruzada o crossvalidación) o la validación externa (producir predicciones a partir de un conjunto separado de validación). La validación interna cruzada suele ser el método mas usado por su sencillez.

Cuando se utiliza la validación cruzada, la serie de datos de calibración original se divide en dos subconjuntos: calibración y predicción. Por ejemplo, la serie de datos original se divide a la mitad, usando la primera mitad de los datos para construir un modelo de calibración para predecir la segunda mitad. Los roles de los subconjuntos de datos son cambiados y se construye un nuevo modelo en donde la segunda mitad es usada para predecir la primera. De esta manera, cada una de las muestras en los datos es predicha una vez.

Otro tipo de validación cruzada mas común es el dejar *uno afuera*, donde los datos se dividen en subconjuntos conteniendo  $n-1$  muestras y 1 muestra. Las  $n-1$  muestras son usadas para construir el modelo y la muestra afuera es usada para la predicción. El proceso se repite hasta que cada muestra es dejada afuera una vez [26, 31, 34].

En la validación externa, se utilizan patrones de calibración distintos a los utilizados para la confección del modelo. Estos patrones se ingresan al modelo como si fueran muestras a analizar y se determinan con ellos la capacidad predictiva del modelo realizado, evaluando las diferencias de concentración que surgen entre la predicción del modelo y la concentración conocida de los analitos en los patrones de validación. Con ello es posible calcular el error asociado a fin de considerarlo para la estimación de las concentraciones en las muestras reales.

La última etapa en la metodología PLS consiste en la predicción, en donde se cuantificarán las concentraciones de los analitos de interés en las diversas muestras incógnitas, a través de un modelo optimizado y validado.

Matemáticamente, la predicción consiste en conocer las matrices P, Q, E, F y G mientras que con las matrices T y U se calcula el vector b, que surgen a partir del modelo con matrices R y C conocidas y conformadas por los patrones de calibración.

A partir de una muestra de concentración desconocida para las especies de interés, se obtendrá un vector  $r_{desc}$ , con el cual, a partir de la ecuación  $r = t p + e$  (definida ahora en términos vectoriales para describir una sola muestra) se puede calcular el vector  $t_{desc}$ . Como el vector b y g ya están dados por el modelo, con la expresión  $u = b t + g$ , con  $t_{desc}$  se calcula  $u_{desc}$ . Finalmente en la ecuación  $c = u q + f$  (vectorial) y conocidos los miembros de la misma, es posible conocer el vector  $c_{desc}$ , que resulta ser un vector fila cuyos componentes corresponden a las concentraciones de los analitos de interés previstos en el modelo [32].

## 1.4.9 – METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR NIRS

Básicamente, el análisis por NIRS se lleva a cabo en 3 fases diferentes [35]:

- 1) Recolección de datos.
- 2) Calibración.
- 3) Predicción.

### 1.4.9.1 - Recolección de Datos.

En la fase de recolección de datos es fundamental la correcta elección de las condiciones experimentales; esto involucra la selección correcta de las bandas de longitud de onda, intensidad de señal, modos de señal (transmitancia, transflectancia o reflectancia difusa) y pretratamiento de muestra [35]. Si bien en general, el procedimiento a seguir es el indicado anteriormente, las condiciones experimentales con las que se trabaja pueden ser muy diferentes incluso aunque dos analistas quieran determinar un mismo componente.

### 1.4.9.2 - Calibración

La calibración es el proceso que permite hallar una relación matemática, entre los datos espectrales y el contenido del o los analitos o componentes de interés. Se debe realizar la calibración del instrumento de NIR para la medición de cada componente específico de cada materia prima individual. La calibración se realiza en una serie de etapas, las cuales incluyen la determinación analítica del componente de interés y las operaciones matemáticas (pre-procesamiento y procesamiento de datos espectrales) sobre los espectros recogidos.

La fase de pre-procesamiento (o filtrado) de datos se refiere al tratamiento de los mismos con una variedad de técnicas digitales que redistribuye la información incluida en el espectro de una manera más sencilla para la ulterior aplicación del análisis matemático-estadístico o quimiométrico. Esto incluye el promedio de la señal, corrección de respuesta del instrumento, cálculo de derivada, etc.

Así, el preprocesamiento de datos y la posterior utilización del método quimiométrico, también presentan una serie de variantes interesantes con las cuales el analista puede “ensayar” hasta encontrar la elección mas adecuada a su objetivo. La cuantificación de un componente depende estrictamente de la relación matemática entre los espectros y la determinación realizada a través de un método de referencia, la misma no puede ser derivada únicamente del procesamiento de información espectral [7].

Las ecuaciones de regresión del modelo adoptan la forma de la ecuación 6 [26]:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + e$$

Ecuación 6

Donde Y representa el parámetro químico o característica (en nuestro caso, % de ácido oleico),  $b_0$  es la ordenada al origen,  $b_1$  a  $b_n$  los coeficientes de regresión,  $x_1$  a  $x_n$  los datos de absorbancia o transmitancia (procesados o no) a las longitudes de onda correspondientes y e es la matriz de los residuales (errores asociados al modelo, ruido instrumental, errores operacionales, etc.) [26- 27].

La calibración de la instrumentación NIR es específica con relación al hardware, la materia prima y los componentes de interés. Este es el aspecto de mayor cuidado de la metodología y su aplicación inadecuada ha provocado que la misma no sea completamente aceptada en diversas situaciones.

Existen varios factores de importancia en el desarrollo de una correcta calibración. Dentro de los aspectos de mayor importancia y probablemente de mayor dificultad, es la recolección de un adecuado conjunto de muestras que representen las fuentes de variación conocidas en la población de interés. Debido a que el desarrollo de una calibración se basa principalmente en el resultado del método de referencia de laboratorio, es fundamental que se utilice un laboratorio de buena reputación para la determinación del componente de interés. Además, todas las muestras de calibración se deben analizar al menos dos veces (por duplicado), comenzando la duplicación en el paso de sub-muestreo inicial en el laboratorio. Idealmente, esta duplicación debería ser “ciega” y desconocida para la persona que realiza el análisis.

La calibración es un proceso continuo; una vez que se ha desarrollado una ecuación apropiada para traducir los datos del espectro a un componente determinado en laboratorio, el resultado del espectro se debe monitorear en forma continua, con relación a su aplicabilidad en la población de muestras que se reciben y con relación a los cambios en la instrumentación [7]

En el presente trabajo se empleó como modelo de calibración, una herramienta multivariada conocida como regresión por cuadrados mínimos parciales (PLS1) utilizando para ello el programa estadístico Unscrambler.

Como se ha dicho anteriormente, un paso muy importante en el proceso de calibración con NIR, es la validación. La validación es un medio para determinar la capacidad de la calibración existente para predecir el constituyente de interés. Estas muestras no deben formar parte del conjunto de muestras utilizadas para desarrollar la ecuación de calibración, pero por el contrario deben ser un conjunto de muestras derivado en forma separada, el cual refleje las variaciones de interés [7].

#### 1.4.9.3 - Predicción

La predicción es el proceso que involucra el análisis de muestras desconocidas empleando un modelo multivariado confeccionado y validado adecuadamente. Esto significa que el modelo obtenido en la etapa de calibración, es empleado en la predicción para determinar la concentración del o los analitos de interés en muestras desconocidas. Para ello es recomendable evaluar la capacidad predictiva del modelo propuesto mediante una validación externa con métodos de referencia aceptados.

#### 1.4.10 – INSTRUMENTAL

Los instrumentos para realizar mediciones de absorción infrarroja requieren básicamente de una fuente de radiación infrarroja continua y de un transductor, o detector, sensible en el infrarrojo [23].

Las fuentes de infrarrojo consisten en un sólido que se calienta eléctricamente a una temperatura comprendida entre 1500 y 2200 K. Como resultado se obtiene una radiación continua que se aproxima a la del cuerpo negro.

Existen diferentes tipos de fuentes, entre ellas, el Emisor de Nernst, la fuente global, la fuente de filamento incandescente, el arco de mercurio, la lámpara de tungsteno, etc.

Diversos equipos para medir reflectancia se encuentran comercializados; algunos de esos equipos emplean varios filtros de interferencia que proporcionan bandas de radiación estrechas, otros están equipados con monocromadores de red [23]; sin embargo, los monocromadores tradicionales (usando redes de difracción) demandan cuidados en la manipulación, y las calibraciones son frecuentes [35]. Su desempeño se degrada fácilmente en ambientes agresivos debido a problemas de vibraciones o polvos; asimismo son lentos en el barrido de señales y la reproducibilidad y estabilidad son cuestionables a causa del gran número de partes móviles. Por otro lado, el filtro sintonizable acústico-óptico (AOTF de *Acusto-Optic Tunable Filter*) es un filtro con diseño de estado sólido, sin partes móviles, motivo por el cual es inmune a cambios en la orientación, golpes mecánicos y vibraciones.

El AOTF actúa como un filtro espectral sintonizable electrónicamente. Es un sistema electrónico-óptico, sin partes móviles consistente en un cristal, donde ondas acústicas (vibraciones), con determinadas radiofrecuencias (RF) son utilizadas para separar solo las longitudes de onda seleccionadas provenientes de un fuente de luz. La longitud de onda seleccionada es función de la frecuencia de RF aplicada al cristal; de esta manera variando la frecuencia, puede variarse la longitud de onda. Los modelos mas comunes de AOTF empleados en el área NIR, usan un cristal de dióxido de telurio ( $\text{TeO}_2$ ). Las ondas ópticas y acústicas se propagan en ángulos diferentes dentro del cristal.

Un transductor se pega por uno de los lados del cristal, y emite las vibraciones (ondas acústicas) cuando la RF es aplicada; la frecuencia de vibraciones es igual a la frecuencia de RF aplicada. Cuando estas señales acústicas pasan por el cristal, generan una compresión y relajación alternadamente, provocando variaciones en el índice de refracción del mismo. Las variaciones del índice de refracción actúan como una red de difracción, pero a diferencia de las redes clásicas, el AOTF solo difracta una única y específica longitud de onda, actuando mas como un filtro que como una red. Esto es una consecuencia de que la difracción ocurre en el volumen entero del cristal y no solamente en la superficie del plano [35].

La longitud de onda que es difractada está determinada por la siguiente condición (ecuación 7) [35]:

$$\lambda_m = \delta_n^G \cdot v_a / \Phi_a$$

Ecuación 7

Donde:

$\delta_n$  es la birrefringencia del cristal.

$v_a$  es la velocidad de las señales acústicas

$\Phi_a$  es la frecuencia de las señales acústicas

$G$  parámetro complejo dependiente del diseño del AOFT

Así, la longitud de onda puede seleccionarse simplemente variando la frecuencia de RF aplicada. Como se puede apreciar en la figura 7, la luz difractada es liberada en dos haces (+) y (-), polarizados ortogonalmente. Para emplear AOTF como un filtro sintonizable, un “beam stop” (conocido también como freno de radiación) se usa para bloquear la luz no difractada.

### PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO DE AOTF-NIR

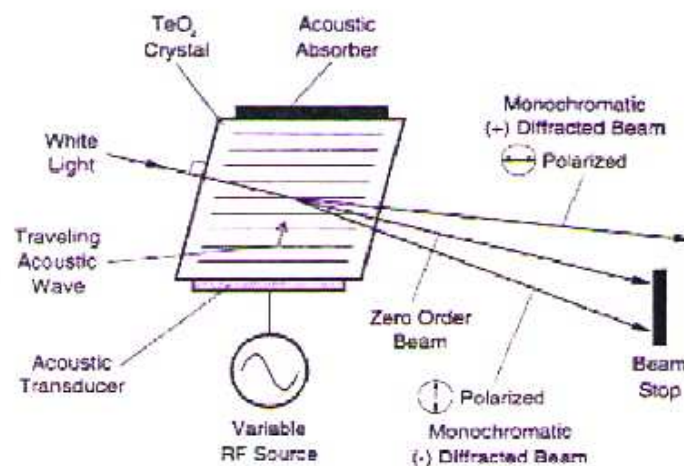


Figura 7. Representación esquemática del filtro sintonizable acústico-óptico (AOFT).

El ancho de banda de luz seleccionada depende del sistema y de la longitud de onda de trabajo, y puede ser tan reducida como 1 nm; la repetitibilidad de longitudes de onda es menor a 0,01 nm. La eficiencia de transmisión es alta (superior al 98 %), con intensidad dividida entre los haces (+) y (-). Otra característica única del AOTF es su velocidad de barrido espectral, permite ajustar de manera rápida y precisa la intensidad de la luz filtrada variando la frecuencia de RF (superior a 4000 longitudes de onda por segundo), la cual se genera con precisión digital [35].



## CAPÍTULO 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 - OBJETIVOS

La comercialización de girasol y oleaginosas en general, requiere de la realización de un control de calidad en donde se verifica el cumplimiento de ciertos parámetros preestablecidos (tales como el contenido de materia grasa, acidez libre, el contenido de cuerpos extraños y características organolépticas). Dichos parámetros deben adecuarse a estándares prefijados, a partir de los cuales se le atribuye el valor final al producto. El ácido oleico resulta ser el ácido graso más valioso y más importante y es la especie química que le otorga mayor valor agregado al aceite de girasol. La determinación de esta especie genera una demora de tiempo en el cual la carga debe necesariamente quedar en espera hasta obtener el resultado.

Es este sentido, resulta de gran importancia económica la utilización de nuevas metodologías analíticas que permitan un mayor ahorro de tiempo en tales determinaciones a los fines de mejorar el flujo de cargamentos en los sitios de embarque.

- ❖ El presente trabajo tiene como objetivo principal explorar el uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para cuantificar el contenido de ácido oleico en diferentes variedades de semillas de girasol.
- ❖ Elaborar una metodología de trabajo que permita estimar de manera confiable, rápida y sencilla, el porcentaje de ácido oleico.
- ❖ Equiparar la velocidad de obtención de datos con los tiempos que impone el acopio de oleaginosas en plantas que procesan girasol alto oleico y tradicional.
- ❖ Validar dicha metodología frente a otro método de análisis instrumental, tal como la cromatografía gaseosa; permitiendo comparar los resultados analíticos obtenidos con métodos oficiales de análisis.
- ❖ Mejorar la relación costo/beneficio en la cadena de comercialización del girasol, aumentando notoriamente la velocidad de análisis, sin sacrificar la calidad analítica de los resultados.

## 2.2 - HIPÓTESIS

- ❖ La espectroscopía infrarroja es una técnica que permite realizar mediciones cualitativas de cualquier sustancia química orgánica que forme parte de un material. Esto incluye sustancias que responden mas bien a una definición que a una entidad química definida, como por ej. el extracto etéreo (que es una mezcla compleja de varios lípidos - fosfolípidos, acilgliceroles, ceras, vitaminas liposolubles, etc.), proteína bruta (que incluye proteínas propiamente dichas, aminoácidos, compuestos heterocíclicos nitrogenados, etc.), pérdida por calentamiento (que incluye la humedad, compuestos volátiles varios, y ganancia de peso generada por la oxidación principalmente de los lípidos), fibra (donde se incluyen pentosanos, celulosa, lignina, hemicelulosa), etc.
- ❖ Se puede mejorar la exactitud y la precisión de las predicciones, manteniendo constante el camino óptico de la muestra. Esto se logra con una molienda fina del material, evitando de esta forma la heterogeneidad de la muestra, ya que los granos enteros presentan superficies irregulares y huecos a lo largo del camino del haz infrarrojo.
- ❖ La espectroscopia infrarroja puede ser, por consiguiente, un método adecuado para cuantificar ácido oleico en semillas de girasol, superando en costo y velocidad a la cromatografía de gases, que es actualmente el método oficial.

## **CAPÍTULO 3. MATERIALES E INSTRUMENTOS**

### **3.1 - MATERIALES DE LABORATORIO**

- Micro jeringa de 10 µL para cromatografía de gases marca Hamilton
- Matraz aforado de 10 mL marca IVA
- Pipetas de 1 y 10 mL marca IVA
- Cuarteador.
- Cartulina y espátula para limpiar semillas.
- Pincel.
- Propipeta marca Ependhorf
- Vaso de precipitado de 250 mL marca IVA

### **3.2 – REACTIVOS**

- n-Hexano grado cromatográfico (Merck).
- Hidróxido de potasio en pellets p.a. (Cicarelli).
- Metanol absoluto p.a. (Cicarelli).
- Nitrógeno de calidad cromatográfica. (Air Liquid)
- Hidrógeno de calidad cromatográfica. (Air Liquid)
- Aire de calidad cromatográfica. (Air liquid)
- Set de ácidos grasos marca Supelco 37 Component FAME Mix (10000 ug/ml en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Referencia: 47885 - U

### **3.3 - INSTRUMENTAL DE LABORATORIO**

- Prensa hidráulica marca Hydraulic Jack (2 ton de capacidad) con los siguientes accesorios:
  - Marco metálico.
  - Contenedor de muestra con pico vertedor.
  - Émbolo.

- Cartucho filtrante modelo CP 23174-7-30455.
- Balanza con precisión 0,01 g, marca Ohaus.
- Molinillo DALVO modelo MCI.
- Tamiz patrón para separar granos quebrados de soja-girasol GAMA.
- Tamiz con apertura de malla de 2 mm.

### 3.4 – INSTRUMENTAL ANALÍTICO

#### 3.4.1 – ESPECTRÓMETRO DE INFRARROJO CERCANO (NIS)

Equipo NIRS de la serie Luminar de Brimrose con filtro acústico-óptico sintonizable – Luminar AOTF NIR - (sistema FreeSpace). Laboratorio de Control de Calidad. Empresa Aceitera de la localidad de Catrillo – Gente de La Pampa S.A.

##### 3.4.1.1 – Parámetros Instrumentales

Se utilizó el espectrómetro en modo reflectancia y se indicaron en el software del instrumento las siguientes condiciones:

- $\lambda_{inicial} = 1100 \text{ nm}$
- $\lambda_{final} = 2200 \text{ nm}$
- *incremento de  $\lambda = 2 \text{ nm}$*
- *modo de medición: transmitancia*
- *ganancia = 2*
- *n° de espectros promediados por medición = 500*

Los datos espectrales se obtuvieron sobre el "bulk" de semillas en copa rotatoria.

### 3.4.2 – CROMATÓGRAFO DE GASES

Cromatógrafo de gases marca Varian modelo CG 3900 con detector de ionización de llama. Laboratorio de Control de Calidad. Empresa Aceitera de la localidad de Catriló – Gente de La Pampa S.A.

#### 3.4.2.1 – Parámetros Instrumentales

- *Temperatura del detector:* 225 °C
- *Temperatura del inyector:* 275 °C
- *Programa de temperatura del horno:* 150°C por 4 min, rampa de temperatura de 3 °C/min hasta 190 °C, y luego rampa de 1°C/min hasta los 200 °C; temperatura final de 200 °C por 3 min
- *Tiempo total de corrida:* 30,33 min.
- *Flujo del gas carrier (N<sub>2</sub>):* 1,5 mL/min
- *Columna:* columna capilar *factorFOUR* de Varian (de bajo sangrado) VF-23ms (fase estacionaria de cianopropil altamente modificado de 0,25 µm de espesor) de 30 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno, 0,39 mm de diámetro externo.
- *Presión de columna:* constante (21,56 psi)
- *Split:* relación 1:20
- *Volumen de inyección:* 1 µL

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 – MUESTREO

Se utilizaron 150 muestras de semillas de girasol (*Helianthus annuus*), provenientes de distintas regiones de Argentina:

- **Provincia de La Pampa:** Catrilo, Colonia Barón, Anguil, Realicó, Riglos, Bajo de las Palomas, Macachín, Lonquimay, Eduardo Castex, La Gloria, Santa Rosa, General Pico, Uriburu, Guaminí, Relmo, Trenel, Villa Mirasol, Cereales, Santa Ana, Colonia Inés y Carlota;
- **Provincia de Buenos Aires:** Pellegrini, Trenque Lauquen, De Bary, Pehuajó, Villegas, Tres Lomas, Casbas, Salliqueló
- **Provincia del Chaco**
- **Provincia de San Luis**
- **Provincia de Córdoba**
- **Provincia de Santa Fé**

Además se incluyeron diferentes cosechas desde el año 2005 al 2008.

### 4.2 – PRETRATAMIENTO DE SEMILLAS

A cada muestra individual de aproximadamente 90 g cada una, se la limpió utilizando un tamiz patrón para separar cuerpos extraños y posteriormente se realizó un cuarteo.

A una porción se le midió la reflectancia sin tratamiento de muestra, obteniéndose así los espectros de las semillas enteras y limpias, en el rango espectral indicado en la sección 3.4.1.1. Se realizó la medición de cada muestra en el NIRS, por triplicado, de manera de aumentar aún más la información espectral, dado que la semilla de girasol no es un material homogéneo en el sentido de que puede presentar variaciones de composición en sus caras.

A una segunda porción de la muestra cuarteada, se le realizó una molienda, para lo cual se utilizó un molinillo; luego fue tamizada en tamiz de malla de 2 mm, de manera de asegurar homogeneidad de molienda en la serie de muestras y establecer así, un tamaño de partícula uniforme.

A esta porción se le midió la reflectancia (por triplicado) de cada una de las muestras de girasol molido en las mismas condiciones experimentales que con semilla entera (sección 3.4.1.1).

Una tercera porción del cuarteo (de alrededor de 20 g) se prensó en frío en un dispositivo especial desarrollado en la empresa Gente de La Pampa S.A. El aceite obtenido se preparó según norma IRAM 5652 para aceites y grasas animales y vegetales, y se realizó la determinación del contenido de ácido oleico por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama.

La cuarta porción del cuarteo fue empleada para realizar una extracción por solventes para la obtención de aceite. Sin embargo, el tiempo de extracción es muy elevado, de aproximadamente 1,5 hs, generando una gran demora en la obtención del resultado por cromatografía gaseosa. En virtud de la gran cantidad de muestras a analizar y la demanda de tiempo que implica, la extracción con solventes fue utilizada como método extractivo previo a la cromatografía gaseosa solamente en un número limitado de muestras. Para los ensayos cromatográficos se utiliza una dilución 1:20 de aceite en hexano.

### **4.3 –CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO OLEICO POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA**

#### **4.3.1. PROCEDIMIENTO DE ESTERIFICACIÓN**

Se utilizó para ello la Norma IRAM 5652: Método para preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos con 4 o más átomos de carbono, a través de la trans-esterificación de los glicéridos por reacción con una solución metanólica de hidróxido de potasio.

Se pesó aproximadamente 0,5 g de la muestra de ensayo en un matraz de 10 mL de capacidad. Se adicionó 0,5 mL de solución metanólica de hidróxido de potasio 2 N, y luego se llevó a volumen con hexano normal. Se mezcló el contenido por agitación hasta que la solución se volvió clara. Para asegurar una reacción completa se calentó unos 10 segundos la solución a baño maría; la solución se enturbió como resultado de la separación de glicerol, y después de agitar, nuevamente se tornó clara. La sedimentación del glicerol tiene lugar rápidamente. La capa superior contiene los ésteres metílicos.

#### 4.3.2 - ANÁLISIS INSTRUMENTAL CUANTITATIVO

Se realizaron dos cromatogramas para cada una de las 150 muestras replicadas, los cuales fueron empleados posteriormente para obtener el modelo PLS1, a través de los datos de concentración de ácido oleico obtenidos. La caracterización de ácidos grasos de cada una de las muestras de semillas se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en 3.4.2.1. Los ácidos grasos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención relativos respecto de un estándar comercial mix Supelco que contiene 37 ésteres metílicos de ácidos grasos. En la Figura 8 se puede apreciar un cromatograma obtenido para semilla de tipo tradicional con sus ésteres correspondientes. El tiempo de retención para el ácido oleico fue de 12,99 minutos, obteniéndose picos bien resueltos en todos los casos.

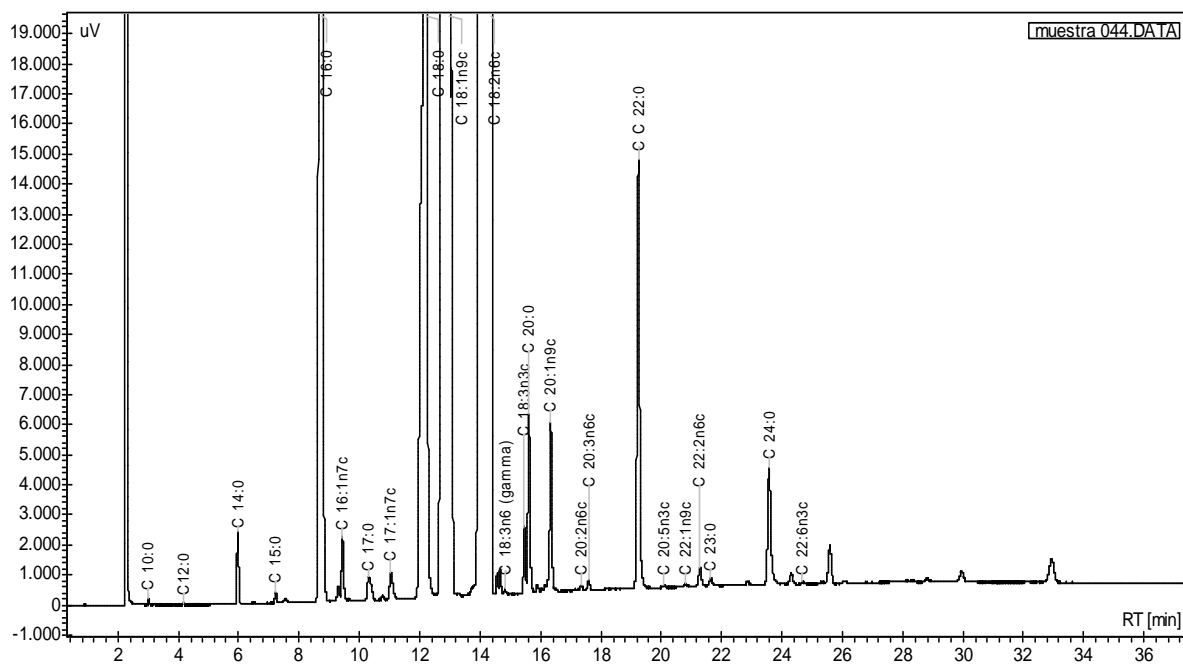


Figura 8. Cromatograma de aceite de girasol tradicional.

En el cromatograma se observan los distintos ácidos grasos identificados a través de la nomenclatura abreviada que surge del número de átomos de carbono seguido de dos puntos y el número de dobles ligaduras, seguido a su vez por la indicación de la familia a la que pertenece. Por ejemplo, para el ácido oleico resultará ser 18:1n9. Donde n9 quiere significar su pertenencia a la familia de los omega-9.



Las dobles ligaduras de los ácidos grasos polietilénicos están separadas entre sí por un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-) y tienen normalmente estructura *cis*. De esta manera conociendo la familia a la que pertenecen pueden ubicarse todas las dobles ligaduras. La configuración estérica *cis* o *trans* se indica al final de la nomenclatura, por medio de la inicial de la misma. Así, por ejemplo, el ácido linolénico indicado como C18:3n3c, posee 18 átomos de carbono, 3 dobles enlaces y pertenece a la familia omega-3. Por último la configuración de todos los enlaces dobles es *cis*.

#### **4.4 – CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO OLEICO A TRAVÉS DEL NIRS**

##### **4.4.1 - CALIBRACIÓN**

Para la etapa de calibración del equipo NIRS se utilizaron el total de 150 muestras de semillas de girasol. En una primera etapa se analizaron muestras de semillas de girasol enteras y libres de cuerpos extraños. Posteriormente, otra fracción cuarteada de la misma muestra fue molida y tamizada y se le determinaron los correspondientes espectros NIRS.

Los datos espectrales fueron procesados a través de la aplicación de la inversa del logaritmo de los valores de reflectancia (R) obtenidos para cada longitud de onda. De esta manera se transformaron los valores de reflectancia en absorbancia:  $A = \log 1/R$ . Posteriormente se realizó un procesamiento de datos a través del cálculo de la primera derivada de los valores de absorbancia, a los fines de suavizar la señal original. La información se importó al programa Unscrambler [36], elaborándose una curva de calibración utilizando los datos espectrales de la primera derivada de la absorbancia, junto con las concentraciones de ácido oleico obtenidas por cromatografía gaseosa. Con ellos se utilizó el método de regresión de los mínimos cuadrados parciales (PLS1) y se obtuvo el modelo para la predicción de resultados en muestras incógnitas.

Dado que el patrón empleado de ácidos grasos se encuentra en estado líquido, diferirá significativamente de las muestras sólidas, debido a los efectos de matriz de la muestra, por lo que no puede ser empleado en forma directa para la construcción del modelo PLS1.

El instrumento IR mide el espectro infrarrojo de cualquier sustancia sólida, pero debe existir una relación matemática que vincule la matriz de datos espectrales o de respuestas con la matriz de concentraciones de ácido oleico. Para ello, fue necesario incorporar al modelo de calibración una serie de datos espectrales provenientes de un grupo de muestras de concentración conocida que abarquen el rango de concentraciones que se pueden encontrar en condiciones reales. En estas muestras de referencia se cuantificó el contenido de ácido oleico empleando cromatografía gaseosa como método oficial de análisis. En términos estadísticos, es deseable ingresar un mínimo de 30 muestras para obtener un modelo de calibración adecuado, pero a medida que aumenta el número de muestras utilizadas en la calibración, mejor será la capacidad de predicción del modelo obtenido, dado que poseerá una cantidad mayor de valores de referencia. Por ello el modelo PLS1 final utilizado fue obtenido a partir de un total de 150 muestras cuantificadas.

#### 4.4.2 - VALIDACIÓN INTERNA DEL MODELO

Para obtener el modelo PLS a partir de los datos espectrales NIRS, se empleó la validación cruzada, la que consiste dejar fuera del modelo un patrón por cada iteración de cálculo. Cuando todos los patrones se han dejado afuera una vez, se obtiene el error total del modelo y permite evaluar a priori sus futuras cualidades predictivas.

#### **4.5 – RESULTADOS NIRS OBTENIDOS CON SEMILLA ENTERA Y LIMPIA**

En la figura 9 se observan los espectros IR obtenidos para el total de 150 semillas enteras de girasol, mostradas por el programa Prospect (c) Brimrose Corp. (SNAP32! 2.03).

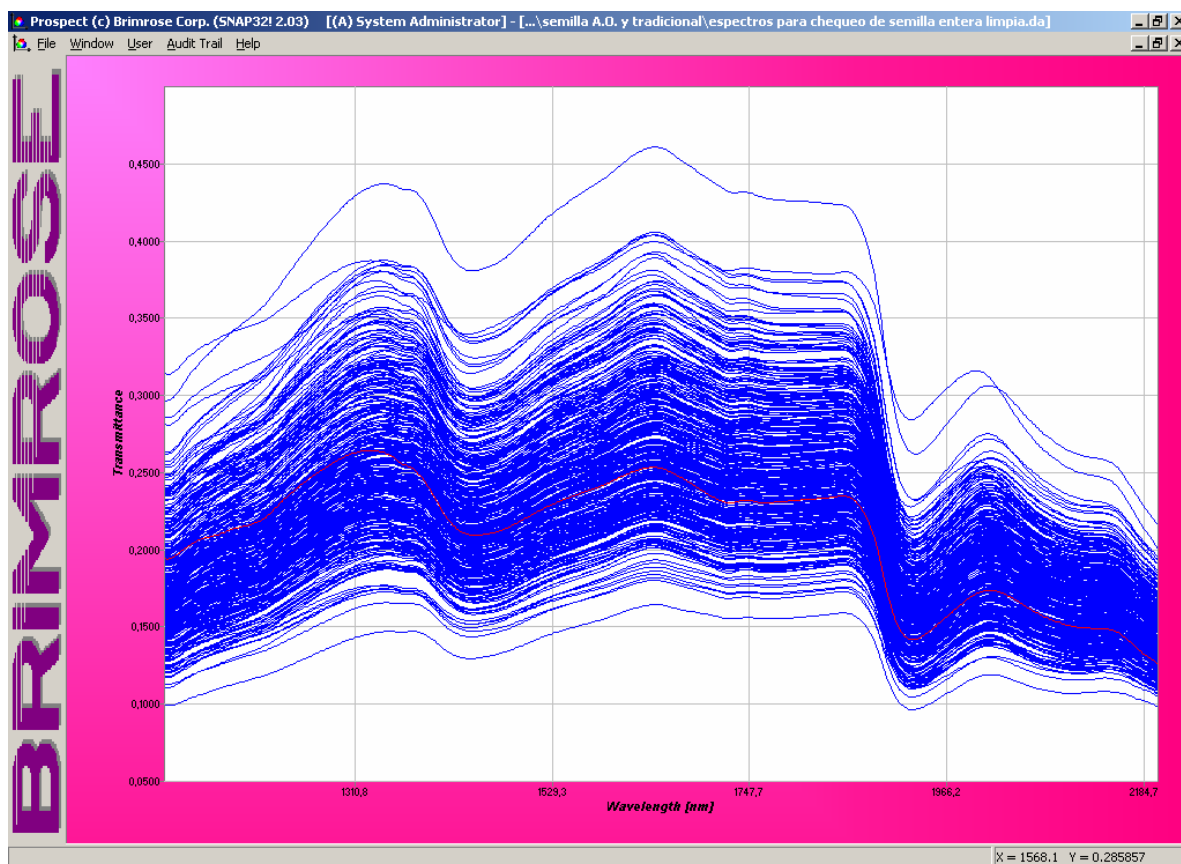


Figura 9. Espectros infrarrojos de semilla entera de girasol.

Los espectros fueron obtenidos a partir de una matriz de calibración de 150 semillas, a las que se les determinó el contenido de ácido oleico por cromatografía gaseosa. En la Tabla 10 se muestra la matriz de calibración, con los valores de concentraciones de referencia.

| Nº de muestra | CG                          | Nº de muestra | CG                          | Nº de muestra | CG                          |
|---------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|
|               | % oleico                    |               | % oleico                    |               | % oleico                    |
|               | $\bar{x} \pm t s / n^{1/2}$ |               | $\bar{x} \pm t s / n^{1/2}$ |               | $\bar{x} \pm t s / n^{1/2}$ |
| 1             | 81,05 ± 0,51                | 51            | 21,42 ± 0,11                | 101           | 78,91 ± 0,13                |
| 2             | 88,06 ± 0,13                | 52            | 50,24 ± 0,74                | 102           | 86,58 ± 0,38                |
| 3             | 80,95 ± 0,20                | 53            | 82,26 ± 0,57                | 103           | 89,71 ± 1,02                |
| 4             | 82,57 ± 2,16                | 54            | 88,29 ± 0,64                | 104           | 78,08 ± 0,57                |
| 5             | 47,05 ± 0,44                | 55            | 35,87 ± 0,55                | 105           | 68,99 ± ?                   |
| 6             | 85,13 ± 0,70                | 56            | 33,59 ± 0,13                | 106           | 85,91 ± 0,06                |
| 7             | 84,80 ± 1,91                | 57            | 85,26 ± 0,32                | 107           | 83,41 ± 0,00                |
| 8             | 29,34 ± 0,19                | 58            | 85,15 ± 0,13                | 108           | 81,46 ± 0,13                |
| 9             | 32,76 ± 0,19                | 59            | 39,87 ± 0,25                | 109           | 60,36 ± 0,38                |
| 10            | 34,39 ± 1,33                | 60            | 35,58 ± 0,22                | 110           | 55,68 ± 0,51                |
| 11            | 23,84 ± 0,32                | 61            | 77,61 ± 0,25                | 111           | 86,03 ± 0,06                |
| 12            | 87,18 ± 0,00                | 62            | 85,69 ± 0,19                | 112           | 85,27 ± 0,44                |
| 13            | 83,63 ± 3,11                | 63            | 85,57 ± ?                   | 113           | 65,15 ± 1,27                |
| 14            | 31,38 ± 0,13                | 64            | 89,22 ± 1,53                | 114           | 47,37 ± 0,90                |
| 15            | 33,40 ± 0,32                | 65            | 88,46 ± 1,08                | 115           | 29,01 ± 0,32                |
| 16            | 25,21 ± 0,19                | 66            | 71,49 ± 0,21                | 116           | 63,54 ± 0,25                |
| 17            | 85,75 ± 0,64                | 67            | 75,09 ± 0,70                | 117           | 27,23 ± 0,38                |
| 18            | 79,48 ± 0,95                | 68            | 86,86 ± 0,19                | 118           | 73,36 ± 0,38                |
| 19            | 88,07 ± 1,27                | 69            | 21,33 ± 0,38                | 119           | 80,89 ± 0,32                |
| 20            | 84,56 ± 0,57                | 70            | 26,16 ± 0,25                | 120           | 28,87 ± 0,51                |
| 21            | 83,25 ± 0,35                | 71            | 83,45 ± 0,38                | 121           | 76,24 ± 0,38                |
| 22            | 87,31 ± 0,04                | 72            | 84,06 ± 0,44                | 122           | 69,04 ± 0,06                |
| 23            | 40,83 ± 0,64                | 73            | 39,83 ± 1,53                | 123           | 27,46 ± 0,32                |
| 24            | 43,70 ± 0,19                | 74            | 24,20 ± 0,32                | 124           | 82,18 ± 0,70                |
| 25            | 30,44 ± 0,00                | 75            | 25,92 ± 0,44                | 125           | 78,20 ± 1,27                |
| 26            | 83,07 ± 0,00                | 76            | 18,06 ± ?                   | 126           | 80,23 ± 0,19                |
| 27            | 85,20 ± 0,12                | 77            | 19,28 ± 0,12                | 127           | 90,08 ± 0,13                |
| 28            | 32,79 ± 1,14                | 78            | 24,83 ± 0,64                | 128           | 26,99 ± 1,33                |
| 29            | 83,59 ± 0,38                | 79            | 81,52 ± 0,57                | 129           | 81,07 ± 0,70                |
| 30            | 24,70 ± 0,20                | 80            | 29,16 ± 0,57                | 130           | 78,84 ± 0,51                |
| 31            | 28,10 ± 0,32                | 81            | 33,20 ± 0,19                | 131           | 23,32 ± 0,99                |
| 32            | 30,45 ± 1,08                | 82            | 24,34 ± 0,32                | 132           | 24,18 ± 0,27                |
| 33            | 84,20 ± 0,97                | 83            | 27,75 ± 0,13                | 133           | 74,64 ± 0,54                |
| 34            | 81,96 ± 0,95                | 84            | 28,13 ± 0,64                | 134           | 79,65 ± 0,09                |
| 35            | 85,21 ± 0,76                | 85            | 27,18 ± 0,13                | 135           | 89,92 ± 0,54                |
| 36            | 62,54 ± 1,59                | 86            | 31,71 ± 0,32                | 136           | 28,32 ± 0,09                |
| 37            | 25,03 ± 0,38                | 87            | 80,47 ± 0,31                | 137           | 82,12 ± 0,54                |
| 38            | 81,32 ± 1,65                | 88            | 88,38 ± 0,76                | 138           | 24,63 ± 0,09                |
| 39            | 23,78 ± 0,49                | 89            | 26,29 ± 1,33                | 139           | 86,85 ± 0,00                |
| 40            | 67,82 ± 0,25                | 90            | 85,17 ± 0,00                | 140           | 81,84 ± ?                   |
| 41            | 34,49 ± 0,06                | 91            | 78,41 ± 0,17                | 141           | 81,80 ± 0,25                |
| 42            | 27,46 ± 0,44                | 92            | 83,04 ± 0,83                | 142           | 73,95 ± 0,64                |
| 43            | 23,35 ± 0,19                | 93            | 76,46 ± 1,08                | 143           | 26,59 ± 2,92                |
| 44            | 24,17 ± 1,08                | 94            | 80,43 ± 2,42                | 144           | 75,68 ± 0,44                |
| 45            | 43,30 ± 0,13                | 95            | 81,30 ± 0,70                | 145           | 84,08 ± 0,19                |
| 46            | 24,87 ± 0,51                | 96            | 78,38 ± 1,02                | 146           | 81,20 ± 0,00                |
| 47            | 83,46 ± 0,52                | 97            | 82,46 ± 0,83                | 147           | 83,06 ± 0,00                |
| 48            | 86,93 ± 0,25                | 98            | 27,74 ± 0,25                | 148           | 25,16 ± 0,44                |
| 49            | 83,30 ± 0,89                | 99            | 23,92 ± 0,64                | 149           | 86,12 ± 0,13                |
| 50            | 41,52 ± 1,02                | 100           | 78,74 ± 0,19                | 150           | 82,50 ± 0,00                |

Tabla 10. Matriz de concentraciones de los 150 patrones de calibración con medidas replicadas utilizados para la confección del modelo NIRS-PLS.

En la Figura 10 se observa el gráfico de concentraciones observadas (concentraciones nominales) y predichas obtenidas por el modelo PLS1 para las 150 muestras de semillas enteras.

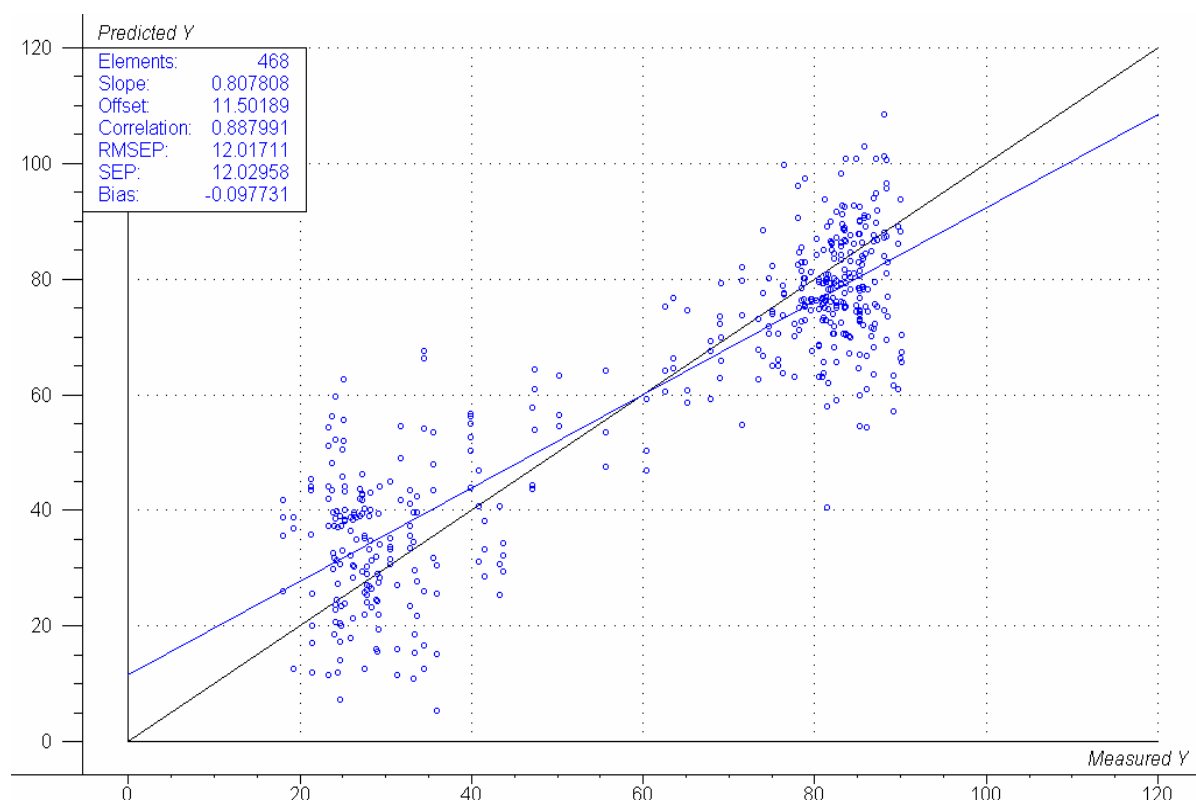


Figura 10. Concentraciones observadas (CG) y predichas por el modelo PLS-NIRS para semilla entera y limpia.

Como se puede apreciar, en la figura 10 se observa una gran dispersión de los puntos y una baja nivel de correlación, de 0,8879, como así también una pendiente de 0,8078, cuyo valor ideal debería ser igual a 1. Los valores calculados de coeficiente de correlación y pendiente, sumado a la dispersión de puntos en la figura 10, permiten deducir un pobre grado de linealidad. A priori, se observa que el modelo PLS1 propuesto para semilla entera no se encuadra a un modelo para análisis de ácido oleico, debido a que la dispersión de puntos de la curva produciría importantes errores aleatorios en la etapa de predicción de muestras reales.

Además, obsérvese que la Raíz Cuadrada del Error Medio de Predicción (RMSEP) es relativamente grande (12,02); este dato permite evaluar el modelo PLS y estimar un grado de predicción deficiente.

Otro diagnóstico que permite evaluar el modelo es el gráfico del porcentaje de varianza explicada. Al observar la figura 11 (% varianza explicada vs PC), se ve que el número de componentes principales (PC) utilizados (>12) por el modelo PLS1 para explicar aproximadamente el 80 % de la varianza en los resultados, es muy elevado. Además, se utilizan 20 componentes para explicar solamente el 81 % de la varianza. Esto es debido al grado de heterogeneidad en el tamaño de los aquenios, en la muestra sin moler, y a la diversidad de espacios intersticiales que entre ellos se produce, lo cual genera claramente un modelo inadecuado a los fines cuantitativos.

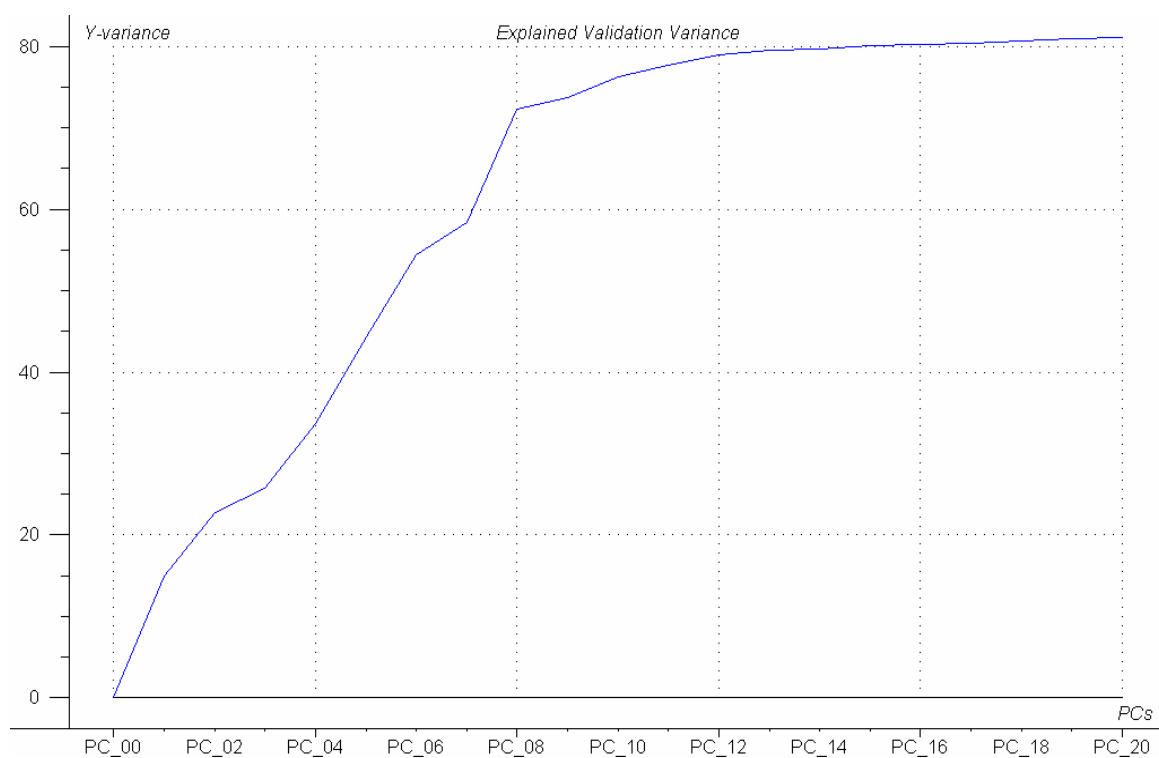


Figura 11. Porcentaje de varianza explicada vs nº de componentes PLS, para semilla entera.

#### 4.5.1. PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MÉTODOS POR EL MÉTODO DE LA PENDIENTE.

Esta prueba nos permite determinar la presencia o ausencia de errores sistemáticos. En este tipo de cálculos, donde se usa la recta de regresión de  $y$  (predicción-NIRS) sobre  $x$  (medición-CG), para comparar métodos analíticos, se supone que todos los errores caen sobre  $y$ . Si bien esta afirmación nunca es realmente válida, puede aproximarse utilizando un número razonable de puntos (evitando  $n$  pequeños), representando el método más preciso en el eje  $x$  y cubriendo el rango de concentraciones de interés (con puntos experimentales) de una manera aproximadamente uniforme. De esta manera el método conduce a resultados sorprendentemente fiables [26,37].

Por medio del método de Regresión Lineal de mínimos cuadrados [26,37] se determinaron los siguientes parámetros de la recta:  $y = bx + a$ .

Pendiente ( $b$ ) = 0,8259

Ordenada al origen ( $a$ ) = 10,6171

Desviación típica de la pendiente ( $s_b$ ) = 0,0243

Desviación típica de la ordenada al origen ( $s_a$ ) = 1,6021

Desviación típica estimada (error estándar) = 7,7403

Coefficiente de correlación ( $r$ ) = 0,9415

En la figura 12 se observa la relación que existe entre las concentraciones predichas por NIRS-PLS1 (semilla entera) y medidas por CG.

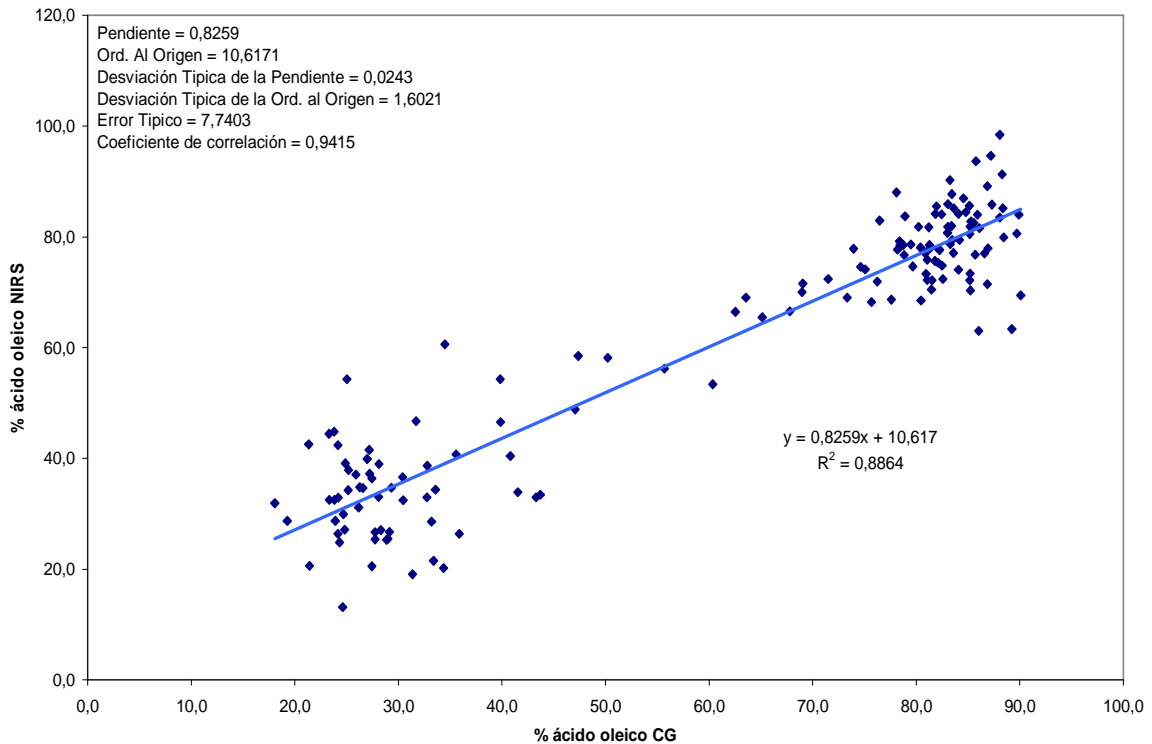


Figura 12. Concentraciones de ácido oleico determinadas por CG vs predicciones NIRS-PLS1 empleando 12 Componentes Principales.

#### 4.5.1.1 – Test Individual de la Pendiente y Ordenada al Origen

**Test de la pendiente:**

$$IC = b \pm t_{(n-2)} s_b$$

$$b = 0,8259 \pm 0,0476$$

$$t_{calc} = 7,165 \quad ; \quad t_{tab} = 1,960$$

$t_{calc} > t_{tab}$ . Al nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) existe un error sistemático respecto a la pendiente.

**Test de la ordenada al origen:**

$$IC = a \pm t_{(n-2)} s_a$$

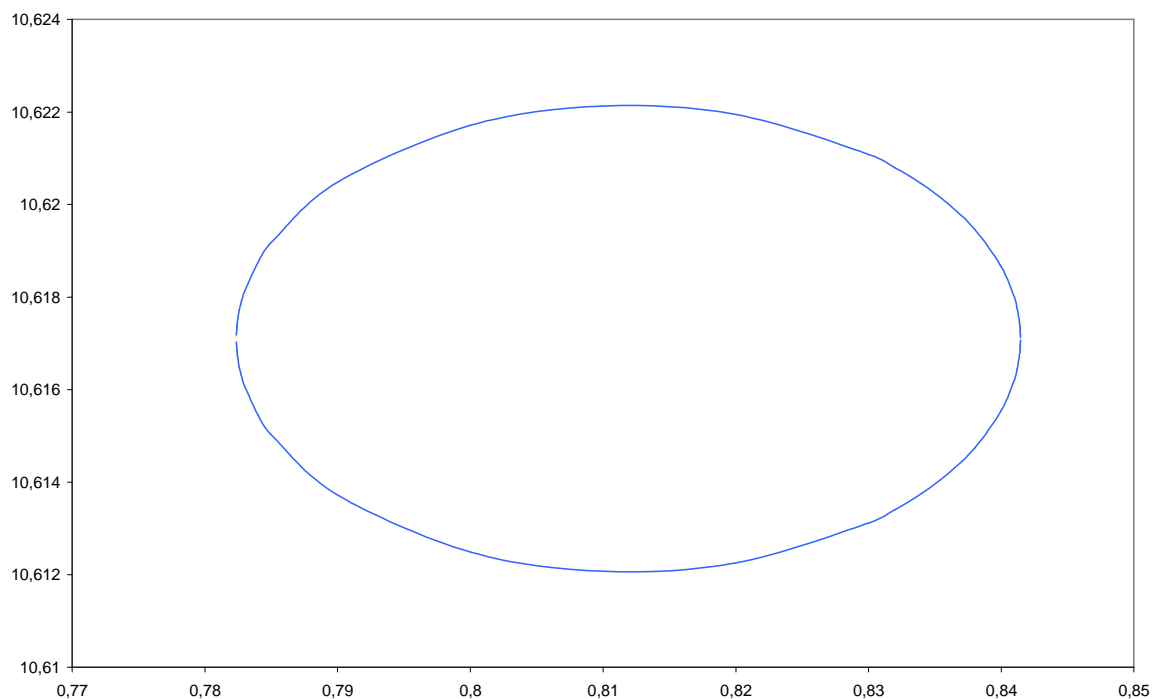
$$a = 10,6171 \pm 3,1401$$

$$t_{calc} = 6,627 \quad ; \quad t_{tab} = 1,960$$

$t_{calc} > t_{tab}$ . Al nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) existe un error sistemático respecto a la ordenada al origen.



#### 4.5.1.2 – Test Conjunto de la Pendiente y Ordenada al Origen



Se ha detectado error sistemático, ya que las coordenadas 0 de ordenada al origen y 1 de pendiente, se hallan por fuera del intervalo de unión de la elipse de confianza, obtenido a través de programa QUIMIO [26].

#### 4.6 – RESULTADOS OBTENIDOS CON SEMILLA MOLIDA Y TAMIZADA

En la Figura 13 se pueden observar los espectros correspondientes a las 150 muestras de girasol molidas y tamizadas. Se observan importantes diferencias espectrales en relación a los espectros de semillas enteras mostrados en la figura 9.

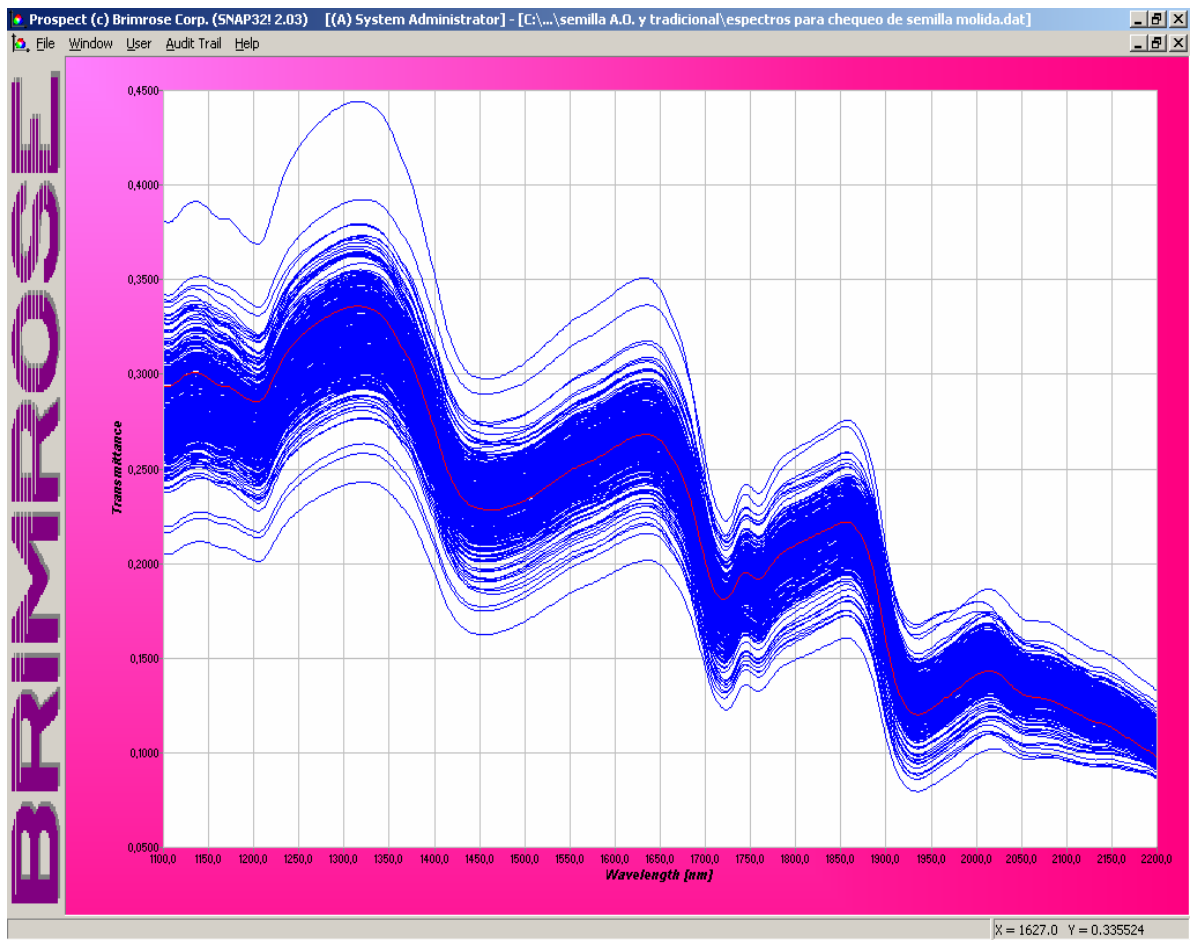


Figura 13. Espectros infrarrojos de semilla molida de girasol.

La matriz de concentraciones de ácido oleico obtenidos por CG mostrada en la tabla 10, fue utilizada para obtener el modelo NIRS-PLS, correspondiente a 150 muestras molidas y tamizadas.

Con los datos espectrales y la matriz de concentraciones, se obtuvo un modelo NIRS-PLS1, cuya gráfica de concentración observada vs predicha se observa en la Figura 14.

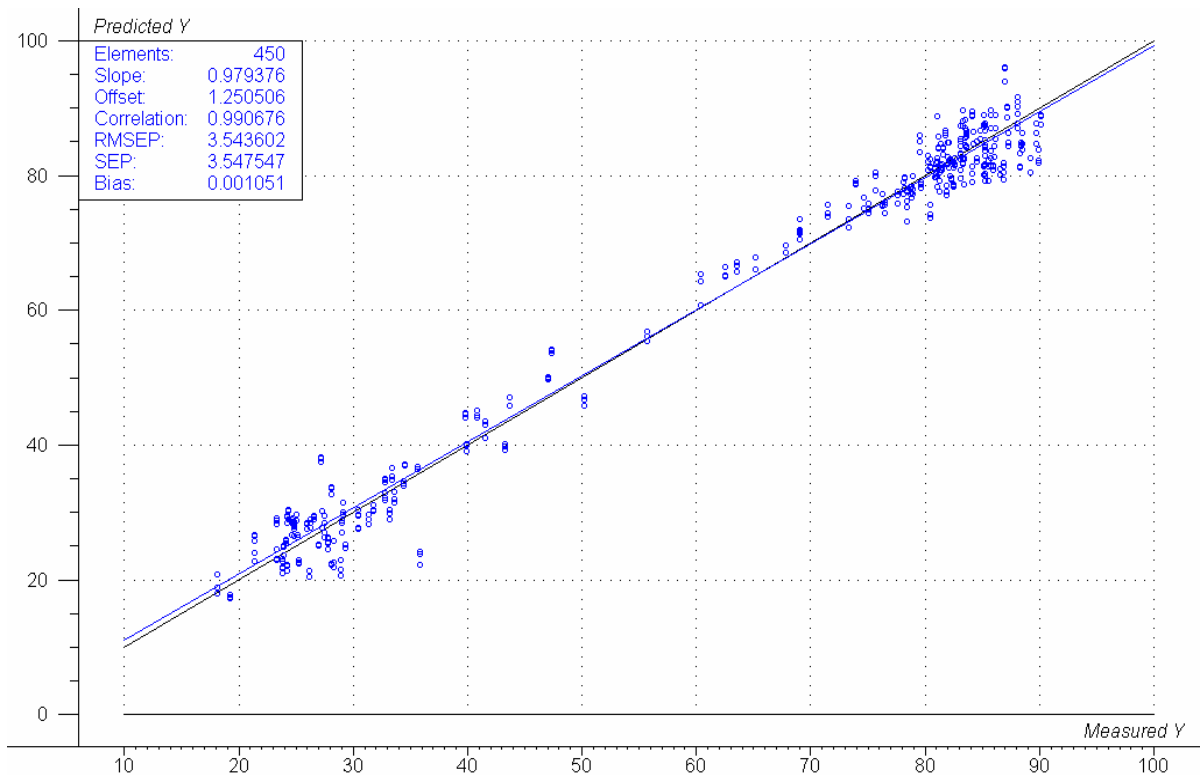


Figura 14. Concentraciones observadas (CG) y predichas (NIRS) por el método PLS1 para semilla molida y tamizada.

Se observa un valor de pendiente de 0,9793 muy cercana a 1, que es el valor ideal dado que la gráfica compara los valores obtenidos por el método de referencia y los obtenidos por NIRS. El coeficiente de correlación 0,9906 muestra un adecuado ajuste lineal. Los valores de pendiente y coeficiente de correlación cercanos a 1, indican a priori un buen ajuste del modelo y una buena relación lineal que existe entre los datos obtenidos por ambos métodos. Además, se observa un valor RMSEP bajo, de 3,54.

En el gráfico del porcentaje de varianza residual vs PC (figura 15), se observa que el 98 % de la información inicial es explicada con solo 3 componentes principales, lo que significa que el modelo está utilizando un alto porcentaje de información de los datos originales a partir de la componente 3. En otras palabras, existe solo un 2% de varianza no explicada con 3 componentes; por ello el modelo final propuesto fue seleccionado con 3 PC.

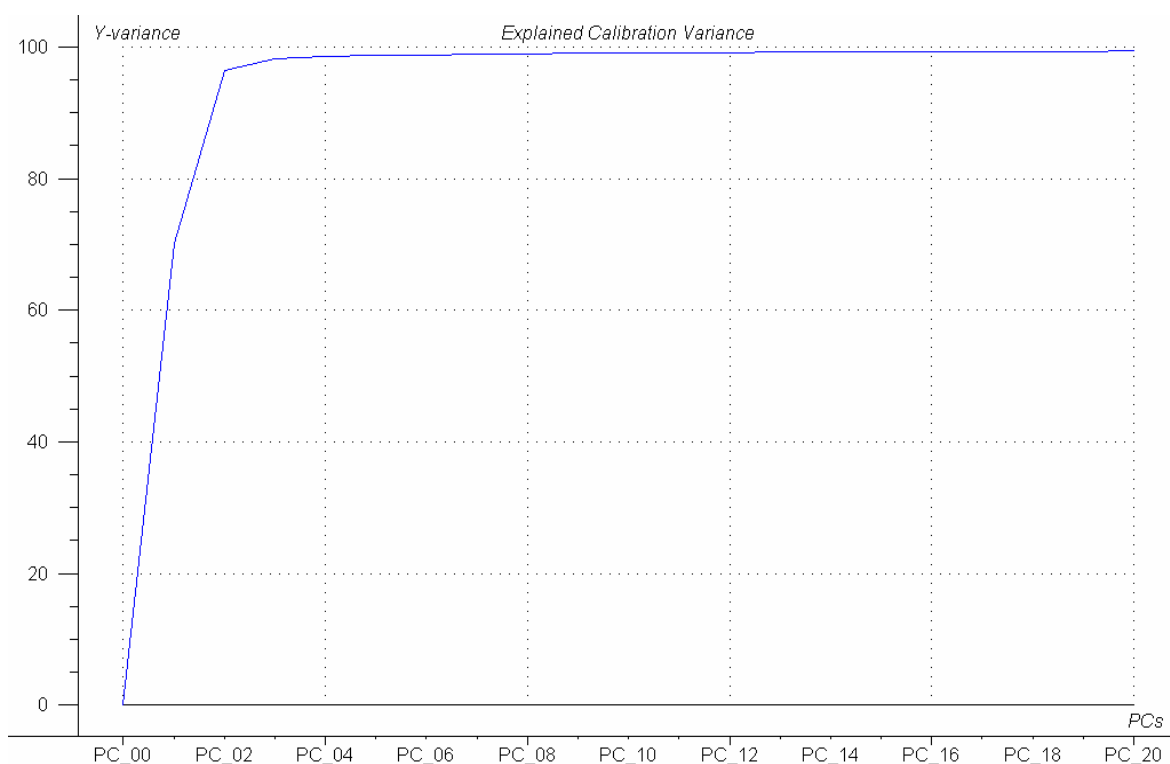


Figura 15. Porcentaje de varianza explicada vs n° de componentes PLS, para semilla molida.

#### 4.6.1 - PRUEBA DE COMPARACIÓN POR EL MÉTODO DE LA PENDIENTE.

Por medio del método de regresión lineal de mínimos cuadrados [26,37] se determinaron los siguientes parámetros de la recta:  $y = bx + a$ :

Pendiente (b) = 0,9822

Ordenada al origen (a) = 1,0847

Desviación típica de la pendiente ( $s_b$ ) = 0,0106

Desviación típica de la ordenada al origen ( $s_a$ ) = 0,6972

Desviación típica estimada (error estándar) = 3,3682

Coefficiente de correlación (r) = 0,9915

En la figura 16 se observa la relación lineal que existe entre las concentraciones predichas por NIRS-PLS1 (semilla molida) y medidas por CG.

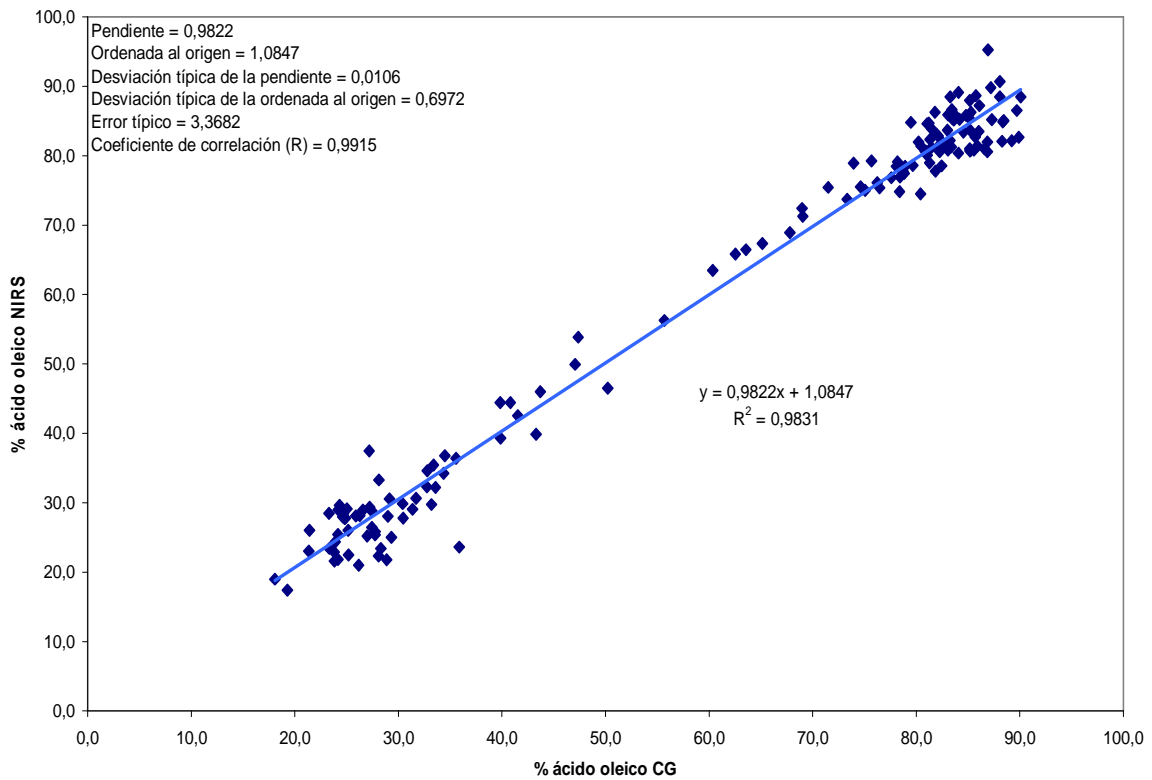


Figura 16. Concentraciones de ácido oleico determinadas por CG vs predicciones NIRS-PLS1 (PC\_3).

#### 4.6.1.1 – Test Individual de la Pendiente y Ordenada al Origen

**Test de la pendiente:**

$$IC = b \pm t_{(n-2)} s_b$$

$$b = 0,9822 \pm 0,0208$$

$$t_{calc} = 1,679 \quad ; \quad t_{tab} = 1,960$$

$t_{calc} < t_{tab}$ . No existe error sistemático para el nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0,05$ ).

**Test de la ordenada al origen:**

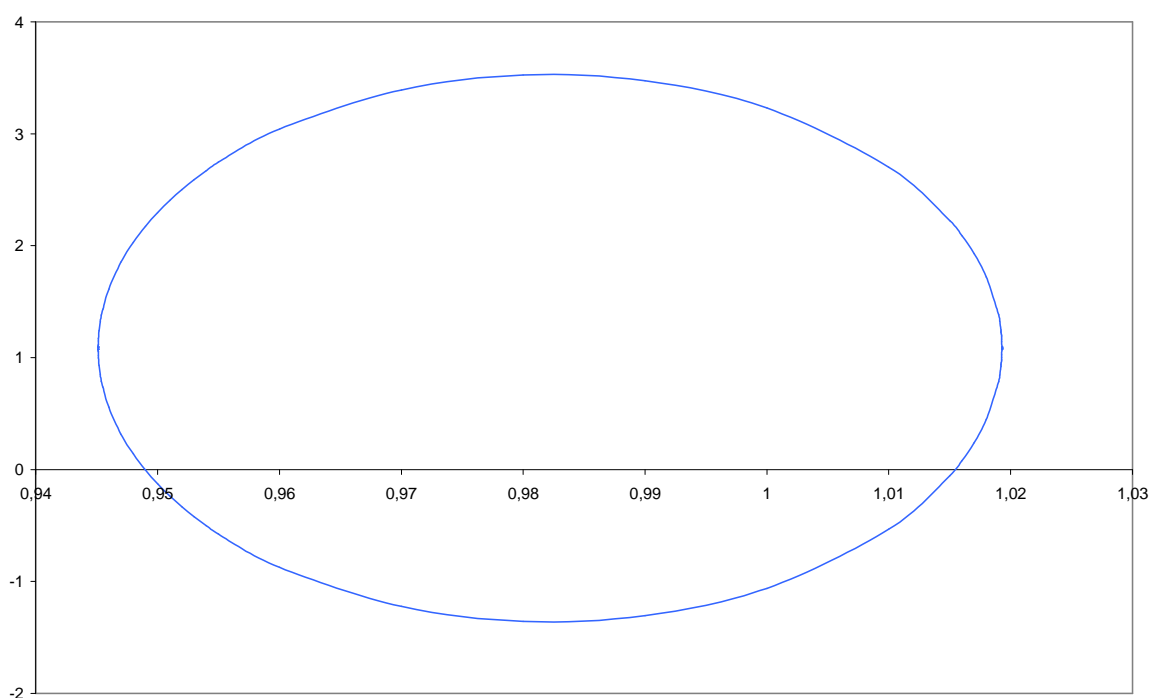
$$IC = a \pm t_{(n-2)} s_a$$

$$a = 1,0847 \pm 1,3665$$

$$t_{calc} = 1,556 \quad ; \quad t_{tab} = 1,960$$

$t_{calc} < t_{tab}$ . No existe error sistemático para el nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4.6.1.2 – Test Conjunto de la Pendiente y Ordenada al Origen



Se ha determinado que no existe error sistemático, ya que las coordenadas 0 de ordenada al origen y 1 de pendiente, se hallan dentro del intervalo de unión de la elipse de confianza, obtenido a través de programa QUIMIO [26].

#### 4.6.2 – LA PRUEBA $F$ PARA LA COMPARACIÓN DE VARIANZAS

En este caso se desea comparar los errores aleatorios de los conjuntos de datos obtenidos por ambos métodos. Esta prueba comprobará si los métodos CG y NIRS difieren en su precisión [37].

$$F = s^2_1 / s^2_2$$

$$S^2_1 \text{ (CG)} = 680,89 ; S^2_2 \text{ (NIRS)} = 668,14$$

$$F_{\text{calc}} = 1,019$$

El F tabulado ( $F_{\text{tab}}$ ) tiende a 1,00 dado que el número de análisis  $n$  tiende a infinito ( $n_1 = n_2 = 150$ ). Sin embargo, la diferencia entre  $F_{\text{calc}}$  y  $F_{\text{tab}}$ , es tan pequeña que puede afirmarse que no existen diferencias significativas entre las varianzas.

#### **4.7 – VALIDACIÓN EXTERNA DE RESULTADOS CON MUESTRAS DESCONOCIDAS**

##### **4.7.1 - VALIDACIÓN DE RESULTADOS DEL MODELO NIRS-PLS PARA SEMILLA ENTERA.**

Dado que el modelo PLS1 obtenido para semilla entera no arrojó resultados positivos, no se lo validó externamente debido a que constituía un método con muy baja exactitud y precisión.

##### **4.7.2 – VALIDACIÓN DE RESULTADOS DEL MODELO NIRS-PLS PARA SEMILLA MOLIDA Y TAMIZADA**

Se analizaron por triplicado, 11 muestras de girasol bajo la forma molida y tamizada, y utilizando la curva de calibrado indicada en la figura 13. Se utilizó una prueba t de dos colas [37]. Los datos se observan en la tabla 11.

| Muestra                        | NIRS (media $\pm$ IC) | CG (media $\pm$ IC) | Diferencia | % de error relativo |
|--------------------------------|-----------------------|---------------------|------------|---------------------|
| 1                              | 81,4 $\pm$ 4,1        | 81,68 $\pm$ 0,25    | -0,33      | -0,4                |
| 2                              | 84,5 $\pm$ 5,2        | 88,85 $\pm$ 0,06    | -4,38      | -4,9                |
| 3                              | 84,6 $\pm$ 3,7        | 84,94 $\pm$ 0,06    | -0,39      | -0,5                |
| 4                              | 78,6 $\pm$ 4,9        | 80,17 $\pm$ 0,57    | -1,54      | -1,9                |
| 5                              | 85,9 $\pm$ 3,0        | 81,36 $\pm$ 0,19    | 4,52       | 5,6                 |
| 6                              | 75,9 $\pm$ 2,3        | 76,54 $\pm$ 0,19    | -0,62      | -0,8                |
| 7                              | 76,2 $\pm$ 3,8        | 75,95 $\pm$ 0,06    | 0,21       | 0,3                 |
| 8                              | 29,4 $\pm$ 1,7        | 28,72 $\pm$ 0,57    | 0,65       | 2,3                 |
| 9                              | 31,4 $\pm$ 1,3        | 32,47 $\pm$ 0,13    | -1,08      | -3,3                |
| 10                             | 35,4 $\pm$ 2,2        | 29,80 $\pm$ 0,00    | 5,56       | 18,7                |
| 11                             | 18,9 $\pm$ 0,7        | 22,10 $\pm$ 0,13    | -3,16      | -14,3               |
| Media de diferencias           |                       |                     | -0,05      |                     |
| Desvíó estándar de diferencias |                       |                     | 2,92       |                     |

Tabla 11: datos comparativos entre CG y NIRS (con semilla molida y tamizada).

$$t_{calc} = 0,06; t_{(0,05; 10)} = 2,228$$

“*t calculado* < *t tabla*, por tanto no existen diferencias significativas entre las medias de las muestras. No hay evidencia de error sistemático. No se encuentran diferencias significativas entre ambos métodos. En otras palabras, la media de las diferencias no difiere significativamente de cero. Esto indica que la validación externa del modelo, con muestras diferentes a las empleadas en la calibración, ha resultado exitosa. Por otra parte, se observa que los errores absolutos porcentuales son relativamente bajos, con un mínimo de 0,3 y un máximo del 18 %.

Estos resultados se condicen respecto a aquellos obtenidos por el modelo, ya que para semilla molida y tamizada, tampoco se hallaron indicios de error sistemático en el mismo.

Es importante observar que los mayores porcentajes de error se producen con semillas de tipo tradicional, donde el porcentaje de ácido oleico es relativamente bajo, y por esta razón, pequeñas diferencias originan errores relativos porcentuales grandes, dado que este tipo de muestras se hallan en la región inferior de la curva de calibración, que es la región que posee mayor incertidumbre, delimitadas por las respectivas hipérbolas de confianza.



## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

### 5.1 - DEL TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

El análisis realizado en este trabajo, indica que la determinación del porcentaje de ácido oleico con semilla entera y limpia por medio del método NIRS, produce una reducción en la precisión y exactitud del análisis. Ello se ve reflejado no solo en los resultados obtenidos en la comparación de los mismos frente al método CG y su respectivo análisis estadístico, sino también en la gran dispersión de puntos obtenida en las gráficas de calibración de concentración observada vs predicha. La causa aparente de estas diferencias, se puede hallar en la falta de homogeneidad que presenta la muestra cuando se realiza el barrido espectral NIRS, dado que se generan intersticios en el volumen de material por la forma que presentan los granos. Otro motivo importante de estas diferencias, quizás resida en el principio teórico de medición que utiliza el instrumento, es decir, como se ha dicho en la sección 1.4.7, en el proceso de reflectancia, los rayos no son simplemente reflejados de la superficie externa, sino que realmente penetran la muestra, pero ésta “penetración” de los rayos infrarrojos es de unos pocos mm, dependiendo de la potencia de la fuente de radiación. Entonces, frente a este hecho y a la diferente composición química que existe entre el pericarpio (cáscara) y la semilla (pepa), es de esperar que la lectura de absorbancia infrarroja tenga una gran influencia debida al pericarpio, con una menor incidencia sobre la pepa (dependiendo del espesor de la cáscara). Estos factores combinados pueden generar una lectura del espectro infrarrojo sesgada. Estos errores pudieron ser eliminados con un adecuado tratamiento de molienda y tamizado. Con este tratamiento, se pudo observar una curva de calibración de concentración de ácido oleico observada vs predicha con un muy buen ajuste, obtenida a partir de muestras molidas y tamizadas (figura 14). Este estudio indica que la determinación del porcentaje de ácido oleico con semilla molida y tamizada por medio del empleo de metodología NIRS – PLS1, posee mayor exactitud y precisión que utilizando semilla entera.

## **5.2 - DE LA IMPORTANCIA DEL MÉTODO PROPUESTO**

El método oficial para determinación del contenido de ácido oleico en girasol, a través de cromatografía gaseosa, es el más preciso y es uno de los actuales métodos de referencia. Sin embargo, insume un tiempo de análisis y un costo elevado (de instrumental, reactivos, gases y mantenimiento). Además requiere un grado de adiestramiento que es posible de adquirir solamente con una capacitación centrada en el análisis específico y una gran práctica en el manejo del instrumento. En contrapartida el uso del NIRS con semilla molida y tamizada provee resultados rápidos, sencillos, económicos y de buena calidad analítica. Además la precisión y exactitud del método NIRS son estadísticamente similares al método CG.

El tiempo promedio de un análisis del porcentaje de ácido oleico en girasol, por CG es de unos 30 minutos (siempre que se obtenga un cromatograma bien resuelto en la primera corrida cromatográfica), sin tomar en cuenta el tiempo de estabilización del equipo, que es de aproximadamente 2 hs. Por otra parte, el mismo análisis por NIRS, insumiría unos 20 segundos. Ambos métodos requieren de una preparación previa de la muestra para poder ser analizada: en el caso de la cromatografía este tiempo es de alrededor de 30 minutos para una limpieza adecuada, un prensado en frío y la preparación de los ésteres metílicos sobre el aceite obtenido; en el método NIRS se necesitan unos 15 minutos para limpiar, moler y tamizar. En definitiva, se ha logrado disminuir el tiempo de análisis en aproximadamente un 75 % del tiempo que se necesitaría por medio del método oficial (siempre que se cuente con la posibilidad de obtener el aceite por medio de un prensado en frío, que es la forma más rápida), siendo el único costo de análisis a cubrir el de la energía eléctrica, y el único consumible una lámpara que tiene un tiempo estimado de duración de 1 a 2 años.

## **5.3 - DE LAS APLICACIONES DEL MÉTODO**

La metodología NIRS con tratamiento de datos multivariado, es una herramienta sumamente interesante y poderosa que reduce tiempo y costo de análisis.

Es por ello que esta nueva combinación es recomendable para ser utilizada en laboratorios de control de calidad y de rutina, para la cuantificación de ácido oleico en semillas de girasol. Esta nueva aplicación analítica puede ser recomendable en la industria

aceitera y en los puntos de comercialización, en donde se realiza la cuantificación del ácido oleico para definir el precio final del producto.

Por otra parte, el método NIRS podría ser una herramienta potencial para determinar los porcentajes de ácido esteárico, palmítico y linoleico, pudiendo de esta manera agilizar la clasificación de los nuevos materiales en lo que respecta al mercado del girasol, esto es, los girasoles alto esteárico, alto palmítico y alto linoleico respectivamente. Entonces, se podría en teoría, obtener modelos de calibración para cuantificar estos cuatro ácidos grasos presentes en el aceite de girasol, y obtener información semejante a la obtenida con una corrida cromatográfica, es decir, mediante un perfil de ácidos grasos.

En virtud de lo expuesto, el método presentado en el presente trabajo, puede ser de utilidad para análisis rápidos de control de calidad para la cuantificación de ácido oleico en semillas de girasol.

## CAPÍTULO 6. REFERENCIAS

- [1] Feoli C., Quiroz F., Quillehauquy V. - Red nacional de evaluación de cultivares comerciales de girasol, información Medio y Alto Oleico ciclos 20005-2006/2006-2007 - Septiembre de 2007 - ASAGIR (*Asociación Argentina de Girasol*) - Cuadernillo N° 12 – Pág. 4-5.
- [2] Ziller S. y Col. – Grasas y Aceites Alimentarios (Parte 3) - *Libro 15° aniversario de A&G (Aceites & Grasas), Recopilación de artículos técnicos, Ediciones 42 a 60 – 2000/2005* – 2ª Edición – Noviembre de 2005 - Editorial: Asociación Argentina de Grasas y Aceites -tomo V - pág 96 a 103.
- [3] Hamilton R. J., Perkins E. G. – Química de los Aceites y Grasas usados para frituras *Libro 15° aniversario de A&G (Aceites & Grasas), Recopilación de artículos técnicos, Ediciones 42 a 60 – 2000/2005* – 2ª Edición - Noviembre de 2005 - Editorial: Asociación Argentina de Grasas y Aceites - tomo V - pág. 551 a 560.
- [4] Valenzuela A. – Efectos biológicos y nutricionales de los ácidos grasos trans ¿Cuánto es mito y cuánto es realidad? - *Libro 10° aniversario de A&G (Aceites & Grasas), Recopilación de artículos técnicos, Ediciones 1 a 41 – 1990/2000* – 1ª Edición – Septiembre de 2001 - Editorial: Asociación Argentina de Grasas y Aceites - tomo III - pág 95 a 101.
- [5] Tavella M., Perego L., Peterson G., Espeche M., Marteau S. – Acidos Grasos Trans: Conceptos e Importancias Clínicas. – [www.nutrinfo.com.ar](http://www.nutrinfo.com.ar)
- [6] Jewett B. – Aspectos nutricionales de ácidos grasos monoinsaturados versus poliinsaturados – *Libro 15° aniversario de A&G (Aceites & Grasas), Recopilación de artículos técnicos, Ediciones 42 a 60 – 2000/2005* – 2ª Edición - Noviembre de 2005 - Editorial: Asociación Argentina de Grasas y Aceites - tomo V - pág. 44 a 47.
- [7] Cornelius S. G. – Aplicaciones de la reflectancia infrarroja cercana (NIR) - *Libro 10° aniversario de A&G (Aceites & Grasas), Recopilación de artículos técnicos, Ediciones 1 a 41 – 1990/2000* – 1ª Edición – Septiembre de 2001 - Editorial: Asociación Argentina de Grasas y Aceites - tomo III - pág 290 a 293.

- [8] Cozzolino D., Fassio A., Fernández E. – Septiembre de 2002 - Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz – [www.scielo](http://www.scielo) – Agricultura técnica.
- [9] Merrien A. – Conociendo el Girasol - Marzo 1998 - *A&G, Aceites y Grasas* – N° 30 – pág 75 a 80.
- [10] Melgarejo M. – Girasol en Argentina - Marzo 1998 - *A&G, Aceites y Grasas* – N° 30 – pág. 49 a 52.
- [11] Autino H., Wnuk F., Vacca P. – Historial, presente y futuro de una oleaginosa atractiva: El Girasol - Septiembre 1993 - *A&G, Aceites y Grasas* – N° 12 – pág. 21 a 30.
- [12] Veldstra J. & Klere - Principios Básicos y Prácticas Modernas - AOCS / Conferencia Mundial sobre nuevas tecnologías en la industria de grasas y aceites comestibles – Extraído de: Aceite de Girasol - Septiembre 1993 - *A&G, Aceites y Grasas* – N° 12 – pág. 32-38.
- [13] Ziller S. y Col. - Grasas y aceites alimenticios (parte 1) - *Libro 15° aniversario de A&G (Aceites & Grasas), Recopilación de artículos técnicos, Ediciones 42 a 60 – 2000/2005* – 2ª Edición - Noviembre de 2005 - Editorial: Asociación Argentina de Grasas y Aceites - tomo V - pág. 81-86.
- [14] Carelli A. A., Forbito P. R., Bodnariuk P., Grapiste G. H. – Analisis cuantitativo de ceras en aceite de girasol - Marzo 1998 - *A&G, Aceites y Grasas* – N° 30 – pág. 103 a 111.
- [15] Aguirrezábal L. - De la siembra a la cosecha ¿Cómo producir aceites de girasol con distinta composición?. Módulo 3. Hacia un mayor valor agregado: Calidades mejoradas de aceites y granos. Nuevos productos - 4º congreso Argentino de Girasol – Septiembre de 2007 – 1ª Edición - Editorial: ASAGIR - pág 115 – 125.
- [16] Fitch Haumann B. – Aceite de girasol modificado. La clave para el futuro (Reseña cronológica de sus inicios y producciones a nivel mundial y en EE.UU.) - Marzo 1998 - *A&G, Aceites y Grasas* – N° 30 – pág 81 a 92.
- [17] Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (IRAM) – Proyecto 1 de emergencia de Norma IRAM 5529:2005. Aceites vegetales comestibles: Aceite de girasol. Corresponde a la revisión de la norma IRAM 5529:2001.

- [18] Melgarejo M. - Una calidad de aceite para cada uso. Aceite de girasol poliinsaturado, Alto oleico, Medio oleico y Alto esteárico. Módulo 3. Hacia un mayor valor agregado: Calidades mejoradas de aceites y granos. Nuevos productos - 4º congreso Argentino de Girasol – Septiembre de 2007 – 1ª Edición - Editorial: ASAGIR - pág 101 a 108.
- [19] Franco D. – Junio de 2008 - Dirección Nacional de Alimentos – Dirección de Industria Alimentaria - [www.alimentosargentinos.com.ar](http://www.alimentosargentinos.com.ar) - Sector oleaginosas.
- [20] Skoog, D. A., Leary, J. – Análisis Instrumental 4ª edición – 1994 – Editorial: McGraw – Hill / Interamericana de España, S.A.U. – España.
- [21] Day, R. A., Underwood A. L. – Química Analítica Cuantitativa – 5ª Edición – 1989 – Prentice –Hall Hispanoamericana S.A. – México.
- [22] Kolthoff I. M., Sandell E. B., Meehan E. J., Stanley Bruckenstein – Análisis Químico Cuantitativo – 4ª Edición – 1969 – Editorial: Nigar, S.R.L. – Nueva Cork.
- [23] Pickering W. F. – 1ª Edición - Química analítica moderna – 1976 - Editorial Reverté S. A. – Barcelona.
- [24] Loudon, M. G. Organic Chemistry. 3º Edition – 1995 –The Benjamin/Cummings Publishing Company – New York.
- [25] Tokkie Groenewald - Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) – La técnica de análisis rápidos del futuro.
- [26] Cela R. – Quimiometría Práctica – 1994 – Publicaciones Universidad de Santiago de Compostela – España.
- [27] Massart D., Vandeginste B., Buydens L., De Jong S., Lewy P., Smeyers-Verbeke J. – Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A and B – 1997 – Elsevier – Alemania.
- [28] Camiña J., Ferreira R., Luco J., Marchevsky E. – Journal of Analytical Chemistry 56 (1) 26 – 2001.
- [29] Martents H., Naes T. – Multivariate Calibration – 1989 – John Wiley and Sons – Nueva York.
- [30] Otto M. – Chemometrics – 1999 – Wiley-VCH – Alemania.
- [31] Beebe K., Pell R., Seasholtz M. – Chemometrics, a Practical Guide – 1998 – John Wiley and Sons - Nueva York.

- [32] Beebe K., Kowalsky B. – Analytical Chemistry 59 (17) 1007 – 1987.
- [33] Esbensen K., Schönkopf S., Midgaard T. – The Unscrambler. Multivariate Analysis in Practice. CAMO-AS – 1997 – Trodheim.
- [34] Kramer R. – Chemometric Techniques for Cuantitative Analysis – 1998 – Marcel Dekker – New York.
- [35] Soluciones infrarrojo cercano (NIR) para control de calidad y control on-line de proceso. Boletín informativo elaborado por Corporación de BRIMROSE de América.
- [36] The Unscrambler® Versión 9.6, Copyright © 1986-2006 CAMO SoftwareAS - SNAP 32! Software User`r Manual – CAMO´s Unscrambler processing library. Luminar AOFT NIR Spectrometer. Copyright © 1994-2007, Brimrose Corporation of America.
- [37] Miller J. C., Miller J. N. – Estadística para química analítica – 4º Edición – 2002 – Editorial: PEARSON – Prentice Hall – Pearson Educación S.A. Madrid.