

Análisis de aceituna intacta mediante espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS): una herramienta de utilidad en programas de mejora de olivo

Por L. León^{1*}, L. Rallo¹ y A. Garrido²

¹Departamento de Agronomía. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal s/n. 14080. Córdoba. E-mail: ag2lemol@uco.es

²Departamento de Producción Animal. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal s/n. 14080. Córdoba.

RESUMEN

Análisis de aceituna intacta mediante espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS): una herramienta de utilidad en programas de mejora de olivo.

El objetivo de este trabajo es evaluar el potencial de la tecnología NIRS para el análisis del contenido de aceite, humedad y composición de ácidos grasos en aceituna intacta. A un total de 287 muestras de aceituna, cada una de una planta procedente de un programa de mejora de olivo, se les determinó sus datos espectroscópicos mediante reflectancia (400-1700 nm). A partir de los datos espectroscópicos originales, primera y segunda derivadas se obtuvieron diferentes ecuaciones de calibración (con el 70% de las muestras) mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) establecidas entre los datos espectroscópicos y los datos de laboratorio de referencia. Las mejores ecuaciones obtenidas fueron validadas (con el 30% de las muestras) mostrando valores de r^2 de 0.88% para la humedad, 0.83% para contenido graso, 0.77% para contenido de ácido oleico y 0.81% para contenido de ácido linoleico. Por tanto, la tecnología NIRS puede ser de utilidad para preseleccionar genotipos por su contenido de aceite y ácido oleico con suficiente precisión y fiabilidad, sin destrucción de muestra, de forma instantánea y sin utilización ni producción de residuos químicos.

PALABRAS-CLAVE: Ácidos grasos – Contenido graso – Humedad – Mejora vegetal – NIRS – *Olea europaea L.*

SUMMARY

Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) analysis of intact olive fruit: an useful tool in olive breeding programs.

The objective of this study was to evaluate the potential use of Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) for the analysis of oil content, moisture and fatty acids composition in intact olive fruit. A total of 287 samples, each from a single plant from an olive breeding program, were scanned by NIRS between 400 and 1700 nm. Partial least squares (PLS) regression was used to create calibration models (with 70% of samples) relating laboratory reference values to spectral data (original, first and second derivative spectral data). The best equations obtained were validated (with 30% of samples) showing values of r^2 of 0.88% for the moisture, 0.83% for oil content, 0.77% for oleic acid content and 0.81% for linoleic acid content. Therefore a reliable and accurate preselection can be made by using NIRS for both oil content and oleic acid content, with a nondestructive analysis, in a few seconds and without use neither production of chemical reagents.

KEY-WORDS: Fat content – Fatty acids – Moisture – NIRS – *Olea europaea L.* – Plant breeding.

1. INTRODUCCIÓN

La estructura varietal del olivo en España, y en general en los principales países donde se cultiva, se caracteriza por un elevado número de variedades, normalmente muy antiguas y confinadas en torno a su presunta área de origen (Barranco y Rallo, 2000). Sin embargo, a pesar de su importancia especialmente en los países de la cuenca del Mediterráneo, no se han realizado trabajos de mejora genética que hayan modificado sensiblemente la estructura varietal del olivo. De las distintas posibilidades que ofrece la mejora genética, la mayoría de los trabajos actuales están basados en los métodos clásicos de mejora por cruzamiento y selección en las descendencias. En este contexto, en España se inició en 1991 un proyecto para la obtención de nuevas variedades de olivo para aceite por cruzamientos intraespecíficos (Rallo, 1995).

La evaluación de las progenies en estos programas requiere procedimientos analíticos para la determinación cuantitativa y cualitativa de los principales componentes químicos de las aceitunas. Entre las nuevas técnicas analíticas, la tecnología NIRS, basada en la absorción en el infrarrojo cercano, parece poseer un gran potencial para la determinación cualitativa y cuantitativa de los principales componentes químicos de los alimentos. La tecnología NIRS ofrece la posibilidad de disponer de un análisis rápido con bajo coste por muestra. Reúne además otras características de gran importancia tales como precisión, versatilidad, fácil manejo y el ser una técnica no contaminante.

Ligada inicialmente al desarrollo de aplicaciones en cereales y forrajes, se ha empleado desde finales de los años 80 y sobre todo en los 90 para el análisis de todo tipo de productos agroalimentarios, entre ellos aceites vegetales (Sato et al., 1991; Chen y Chen, 1995; Wesley et al., 1995) y semillas oleagino-

sas (Panford y de Man, 1990; Pazdernik et al., 1997; Pérez-Vich et al., 1998; Velasco y Becker, 1998).

En el sector del aceite de oliva, la tecnología NIRS también se ha aplicado al análisis del contenido graso y humedad del orujo, subproducto generado en la obtención de aceite, para controlar el grado de agotamiento del mismo en los sistemas de extracción de dos fases (García et al., 1996; Hermoso et al., 1999). Más recientemente, Jiménez et al. (2000) han aplicado la tecnología NIRS para la determinación del contenido graso y humedad en aceituna, a partir de muestras molidas que proporcionaban un granulado fino y homogéneo. Este es el único trabajo relativo al análisis de aceitunas que se ha encontrado en la literatura científica NIRS consultada.

La potencialidad del análisis NIRS hacen del mismo un posible instrumento de gran utilidad en programas de mejora genética, siendo ésta una de las aplicaciones que ha tenido la tecnología NIRS en agricultura (Batten, 1998). La información científica disponible señala que la precisión de los modelos predictivos NIRS depende en gran medida de las características del conjunto de muestras usadas para generar la relación matemática entre los datos espectroscópicos y los valores de referencia. Dichas características hacen referencia entre otras al número, intervalo de variación y representatividad de las muestras en la población futura sobre la que aplicar la tecnología. En este sentido, los genotipos de las progenies de los cruzamientos suelen representar un muestreo de amplio intervalo de variabilidad, por lo que constituyen un conjunto particularmente apropiado para la necesaria calibración. Recíprocamente, una vez establecidas las ecuaciones de calibración y la capacidad predictiva del método para los diferentes componentes estudiados, las características reseñadas del NIRS, en particular su carácter no destructivo y versatilidad para determinar los componentes del producto, aconsejan su uso para la evaluación de un elevado número de muestras, lo que suele ser un requerimiento característico de los programas de mejora genética.

El objetivo de este trabajo es evaluar el potencial de la tecnología NIRS para su incorporación al análisis de aceitunas intactas y obtener las ecuaciones de calibración NIRS para el análisis de algunas características de interés.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Muestras de aceitunas y métodos de análisis de referencia

Para la realización de este trabajo se han utilizado muestras de aceitunas recogidas en plantas de semilla procedentes de cruzamientos recíprocos entre las variedades 'Arbequina', 'Frantoio' y 'Picual', variedades productivas en sus respectivas áreas de

origen (Cataluña, Toscana y Jaén) y pertenecientes al grupo de mayor rendimiento graso (Rallo, 1995). En total se recogieron 287 muestras, cada una procedente de un genotipo.

Los frutos así recogidos se deshuesaron y se secó la pulpa en estufa a 105°C durante 42 horas, tiempo que se considera suficiente para asegurar la deshidratación de cualquier tipo de aceituna, triturada o entera (del Río y Romero, 1999). Así se determinó la humedad de la pulpa y el porcentaje de aceite en pulpa seca mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Para determinar la composición de ácidos grasos se utilizó el procedimiento desarrollado por Garcés y Mancha (1993). Dicho método permite realizar, a partir de muestras de pulpa de aproximadamente 50 mg, la digestión de tejido fresco, transmetilación de los lípidos y extracción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en una sola etapa. Se prepararon 10 muestras por genotipo que posteriormente se analizaron por cromatografía gaseosa.

2.2. Análisis espectroscópico NIR

Todas las muestras se analizaron usando un instrumento DA-7000 Diode Array VIS/NIR Spectrophotometer (Pertten Instruments). El DA-7000 es un espectrofotómetro de matrices de diodos de canal paralelo que utiliza dos matrices para cubrir simultáneamente las longitudes de onda de 400 a 950 y de 950 a 1700 nm, proporcionando por tanto medidas simultáneas NIR/VIS en el infrarrojo cercano (NIR) y en el visible (VIS). Utiliza detectores de silicio para la región visible (400-950 nm) e InGaAs (Indio-Galio-Arsénico) para la región NIR (950-1700 nm), con una resolución espectral de 5 nm, por lo que en total registra 261 valores de reflectancia. Aproximadamente 500 g de aceitunas de cada genotipo se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su utilización.

2.3. Métodos quimiométricos utilizados

Las calibraciones NIRS se desarrollaron utilizando el programa quimiométrico NIRCAL, software recomendado para el tratamiento quimiométrico de datos obtenidos con el equipo PERTEN DA-7000. Para desarrollar las ecuaciones de calibración se utilizó la regresión PLS (Partial Least Squares), que reduce los datos espectrales a una serie de variables fundamentales (términos de regresión o factores PLS) que tienen en cuenta tanto los valores espectrales como los valores de referencia. Dado que el software NIRCAL no permite validación cruzada, el colectivo de muestras se dividió en dos grupos, uno de calibración (al que se destinaron el 70% de las muestras) y otro de validación (con el 30% restante). No se ha utilizado ningún método de detección e interpretación de datos aberrantes (outliers) y, por tan-

to, no se ha descartado ninguna de las muestras analizadas. Diferentes aspectos metodológicos se han considerado en el desarrollo de los modelos quimiométricos NIRS, en particular aquellos que hacen referencia al uso de diferentes regiones espectrales y utilización de diferentes métodos de pretratamiento del dato espectral previo a la calibración. Asimismo, se han utilizado diferentes estadísticos para la evaluación de la precisión de las ecuaciones obtenidas. Entre ellos se han utilizado el coeficiente de determinación para calibración (R^2) y validación (r^2) y el error típico de calibración (ETC) y predicción (ETP) (Shenk y Westerhaus, 1995). Asimismo se han utilizado otros estadísticos de gran utilidad para evaluar ecuaciones de calibración y que han sido descritos en la literatura NIRS (Williams y Sobering, 1996), como la relación entre el rango de los datos de referencia del colectivo de validación y el error típico de predicción (RER) y la relación entre la desviación típica de los datos de referencia del colectivo de validación y el error típico de predicción (RPD).

3. RESULTADOS

3.1. Contenido de humedad y aceite en pulpa

En 224 de las 287 muestras en las que se recogió su espectro se disponían de los datos de referencia para contenido de humedad y aceite en pulpa. El colectivo de calibración (con el 70% de las muestras) y el colectivo de validación (con el 30% restante) fueron muy similares en cuanto a la media, rango de variación y desviación típica para las distintas características evaluadas (Figura 1). El programa de mejora produce genotipos con amplios intervalos de variación y distribuciones normales para las características evaluadas como cabría esperar para características cuantitativas en poblaciones segregantes.

Se ha procedido a optimizar los resultados de las calibraciones mediante el uso de diferentes regiones espectrales y diferentes pretratamientos del dato espectral. Los mejores resultados se obtuvieron seleccionando el rango de longitudes de onda entre 900-1500 nm (el equipo Perten recoge información

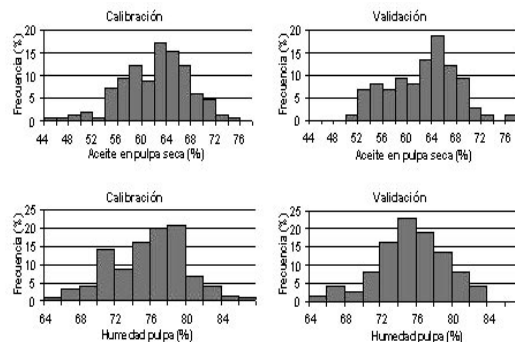


Figura 1

Histogramas de variabilidad para contenido de humedad y aceite en pulpa en los colectivos de calibración y de validación.

entre 400-1700 nm) y aplicando la primera derivada. Ningún otro de los pretratamientos ensayados, como normalización o corrección del efecto scatter, mejoraron sustancialmente los resultados.

En la Tabla I se muestran los resultados de calibración y validación óptimos obtenidos para el contenido de humedad y de aceite en pulpa seca, con valores de R^2 y r^2 en torno a 0.9 que indican una excelente precisión de las calibraciones (Shenk y Westerhaus, 1995) y valores de RER mayores de 10 y valores de RPD superiores o próximos a 3 (Williams y Sobering, 1996).

La representación gráfica de los resultados obtenidos en cada uno de los genotipos del colectivo de validación para la humedad de la pulpa y el contenido de aceite en pulpa seca (Figura 2) muestra como sólo en algunos casos puntuales se obtuvieron diferencias importantes entre los datos de referencia (REF) y los valores predichos (NIRS). Los valores medios fueron también muy similares (62.8^{REF} vs 62.7^{NIRS} para el contenido de aceite en pulpa seca y 75.2^{REF} vs 75.4^{NIRS} para la humedad en pulpa).

3.2. Composición ácida

Las 287 muestras analizadas se dividieron aleatoriamente para el colectivo de calibración (el 70%) y para el colectivo de validación (el 30% restante), re-

Tabla I
Estadísticos en calibración y validación para los componentes del rendimiento graso

| Característica | Calibración | | Validación | | | |
|-----------------------|-------------|------|------------|------|------|-----|
| | R^2 | ETC | r^2 | ETP | RER | RPD |
| Humedad pulpa (%) | 0.94 | 0.96 | 0.88 | 1.33 | 17.2 | 3.1 |
| Aceite pulpa seca (%) | 0.92 | 1.67 | 0.83 | 2.20 | 15.4 | 2.5 |

R^2 , r^2 = Coeficiente de determinación en calibración y validación.
ETC, ETP = Error típico en calibración y predicción.

RER, RPD = relación entre el rango o la desviación típica de los datos de referencia del colectivo de validación y el error típico de predicción.

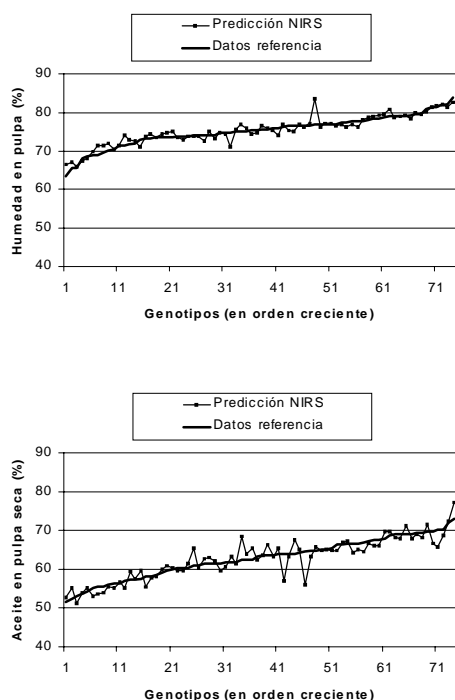


Figura 2

Valores predichos (NIRS) y valores de referencia para la humedad de la pulpa y el contenido de aceite en pulpa seca para cada uno de los genotipos del colectivo de validación.

sultando ambos colectivos muy similares para los distintos ácidos grasos evaluados. Los mayores rangos de variación se tienen para el ácido oleico y linoleico, siendo menores para el resto de ácidos grasos analizados (Figura 3). Al igual que para la humedad o el contenido de aceite de la pulpa, el programa de mejora proporciona genotipos con amplios intervalos de variación en su composición ácida, por lo que son muy adecuados para las calibraciones NIRS.

Los mejores resultados para los pretratamientos ensayados, también se obtuvieron seleccionando el rango de longitudes de onda entre 900-1500 nm y aplicando la segunda derivada. Al igual que para los componentes del rendimiento graso, ningún otro de los pretratamientos probados mejoró los resultados.

En la Tabla II se resumen los principales resultados obtenidos en la calibración óptima para la composición de ácidos grasos. Las ecuaciones de mayor precisión se obtienen para el ácido oleico y linoleico con valores de R^2 y r^2 mayores o muy próximos a 0.8 y valores de RER mayores o muy próximos a 10. En este caso los valores de RPD (relación entre la desviación típica de los datos de referencia del colectivo de predicción y el error típico de predicción) no alcanzaron el valor mínimo de 3 señalado como óptimo en la bibliografía (Williams y Sobering, 1996), si bien es de señalar que este límite fue establecido fundamentalmente para productos bajos en humedad, analizados en forma molida y con objetivos diferentes a los deseados en nuestro caso. Para el resto de ácidos grasos, las ecuaciones obtenidas fueron adecuadas para el ácido palmítico (el otro ácido graso mayoritario en aceite de oliva) con valores de r^2 de 0.58 y de baja precisión para los ácidos palmitoleico y esteárico.

La representación gráfica de los resultados obtenidos en el colectivo de validación para los ácidos oleico y linoleico (Figura 4) indica que las mayores diferencias entre los datos de referencia (REF) y los valores predichos (NIRS) se observan para valores bajos de ácido oleico y altos de linoleico. Dichos valores corresponden a las mismas muestras (genotipos) dada la alta correlación existente entre dichos ácidos grasos. No obstante, los valores medios fueron prácticamente idénticos en ambos colectivos (65.58^{REF} vs 65.56^{NIRS} para el contenido de ácido oleico y 12.00 en ambos colectivos para el contenido de ácido linoleico).

Tabla II
Estadísticos de calibración y validación para los ácidos grasos analizados

| Característica | Calibración | | Validación | | | |
|----------------------|-------------|------|------------|------|------|-----|
| | R^2 | ETC | r^2 | ETP | RER | RPD |
| Palmítico (C16:0) | 0.72 | 1.28 | 0.58 | 1.75 | 7.2 | 1.4 |
| Palmitoleico (C16:1) | 0.52 | 0.83 | 0.19 | 1.04 | 7.0 | 1.1 |
| Esteárico (C18:0) | 0.17 | 0.68 | 0.02 | 0.68 | 10.2 | 1.1 |
| Oleico (C18:1) | 0.88 | 3.04 | 0.77 | 4.40 | 9.4 | 2.1 |
| Linoleico (C18:2) | 0.90 | 1.96 | 0.81 | 2.73 | 10.2 | 2.4 |

R^2 , r^2 = Coeficiente de determinación en calibración y validación.

ETC, ETP = Error típico en calibración y predicción.

RER, RPD = relación entre el rango o la desviación típica de los datos de referencia del colectivo de validación y el error típico de predicción.

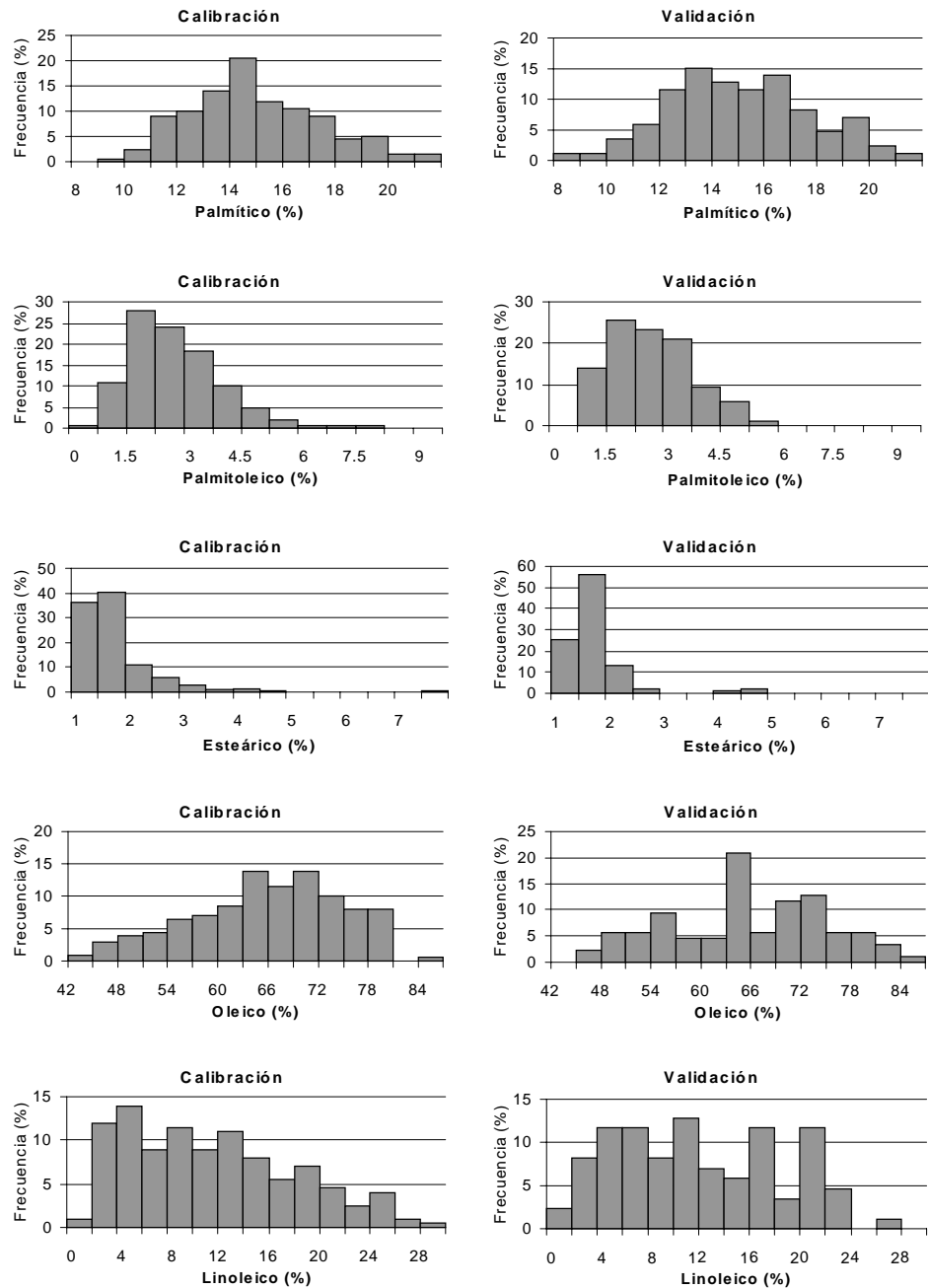


Figura 3

Histogramas de variabilidad para los diferentes ácidos grasos analizados en los colectivos de calibración y de validación.

4. DISCUSIÓN

En trabajos de mejora es imprescindible analizar cientos de muestras, siendo por tanto deseable el disponer de procedimientos analíticos rápidos y poco costosos para la determinación de los principales componentes químicos. Ello nos ha llevado al estudio de la posibilidad de utilizar la tecnología NIRS para el análisis de aceitunas intactas. En trabajos previos se había aplicado la tecnología NIRS

para el análisis de orujo (García et al., 1996; Hermoso et al., 1999) y aceitunas (Jiménez et al., 2000). En dichos trabajos, no obstante, el modo de presentación de las muestras fue triturada tal como se aplica tradicionalmente el análisis NIRS en productos agroalimentarios. En nuestro caso se ha querido reducir aún más el tiempo necesario evitando las fases previas de preparación de muestra por lo que se ha realizado este estudio con aceituna intacta. Otra diferencia importante con dichos trabajos es que en

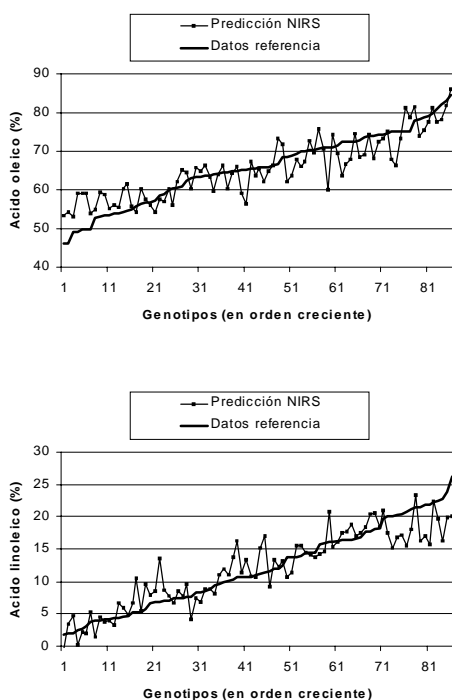


Figura 4
Valores predichos (NIRS) y valores de referencia para los ácidos oleico y linoleico para cada uno de los genotipos del colectivo de validación.

éstos se utilizaron equipos de filtros que utilizan un limitado número de longitudes de onda y que, por tanto, sólo son adecuados para determinar características básicas como la humedad o la grasa total para una aplicación concreta. En este trabajo se ha utilizado un equipo de espectro continuo (400-1700 nm) que proporciona información de un mayor número de longitudes de onda, lo que permite determinar compuestos más específicos como los diferentes ácidos grasos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican una alta precisión en las calibraciones para humedad y contenido de aceite en pulpa seca, con resultados muy similares a los obtenidos en orujo (García-Mesa et al., 1996) y aceituna triturada (Jiménez et al., 2000). Las pequeñas diferencias con los resultados obtenidos en dichos trabajos no parecen justificar la necesidad de molienda previa de la muestra.

También en otras especies vegetales se han obtenido resultados similares. En semillas oleaginosas, Panford et al. (1990) obtuvieron valores del coeficiente de determinación de 0.94-0.99 para el contenido graso de nueve tipos diferentes de semillas oleaginosas (algodón, cacahuete, colza, cártamo, lino, soja, girasol, sésamo y palma) a partir de muestras molidas. Para el contenido de aceite se han obtenido valores similares del coeficiente de determinación y error típico de predicción en semi-

llas intactas de colza (Reinhardt et al., 1996), si bien los valores de RER eran inferiores. También en colza, Velasco et al. (1999) han obtenido valores similares para contenido de aceite a partir del análisis de sólo una semilla utilizando un adaptador especial. En ambos casos se utilizó material proveniente de trabajos de mejora genética para desarrollar las calibraciones, aprovechando los amplios intervalos de variabilidad que se generan en las características objeto de análisis. En muestras de semillas intactas de girasol (Pérez-Vich et al., 1998) se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.83, error típico de 2.07 y RER de 13.4 para el contenido de aceite utilizando validación cruzada. Los resultados fueron notablemente mejores con semillas sin cáscara y mejor aún con harinas. En cacahuete, se han obtenido valores similares para la determinación del contenido de aceite a partir de fruto intacto (Misra et al., 2000).

En cuanto a la composición en ácidos grasos, los resultados obtenidos indican una alta precisión en las calibraciones para la composición de los ácidos oleico y linoleico y adecuada para el palmítico. Para los ácidos palmítico y esteárico se obtuvo baja precisión, probablemente debido al menor rango de variabilidad disponible para estos ácidos grasos, la inadecuada cobertura de dicho rango (Figura 3) y los mayores errores del método de referencia para estos ácidos grasos. La experiencia en desarrollo de calibraciones NIRS en diferentes productos agroalimentarios y en particular en grasas y aceites (Garriido et al., en prensa) indica que la precisión y exactitud de las ecuaciones obtenidas para los ácidos palmítico, palmítico y esteárico serían perfectamente mejorables con una estrategia orientada a la obtención de una distribución más homogénea en la cobertura del rango, tratando de equilibrar el número de muestras existentes por cada 0.5-1% del rango. Este tipo de distribución, frente a la natural obtenida en los colectivos utilizados en nuestro trabajo, sin duda incrementará la precisión y exactitud de los modelos predictivos.

En distintos trabajos en semillas oleaginosas se han obtenido valores similares del coeficiente de determinación, error típico de predicción y RER para la mayoría de ácidos grasos. En semillas intactas de colza, Reinhardt et al. (1996) obtuvieron un coeficiente de determinación de 0.80 y error típico de predicción de 2.03 para el ácido oleico. Velasco y Becker (1998) obtuvieron mejores resultados con coeficientes de determinación de 0.99 y 0.97, y errores típicos de predicción de 3.21 y 1.69 para los ácidos oleico y linoleico respectivamente. Para otros ácidos grasos analizados, como palmítico y esteárico, con menor variabilidad en el conjunto de calibración se obtuvieron peores resultados. En girasol Pérez-Vich et al. (1998) obtuvieron coeficientes de determinación en torno a 0.80 y errores estándar de predicción muy altos (hasta 8.75 para oleico), aun-

que los resultados mejoraron sustancialmente trabajando con semillas sin cáscara y harinas. Peores resultados se obtuvieron con semillas de soja (Pazdernik et al., 1997), con coeficientes de determinación de apenas 0.4-0.5 para oleico y linoleico. En todos los casos los mejores resultados se obtuvieron para aquellos ácidos grasos con mayor variabilidad, principalmente oleico y linoleico. También para el contenido en ácido linolénico o erúxico se obtuvieron buenos resultados en aquellas especies ricas en estos ácidos grasos, como colza o soja.

Resultados más precisos se han obtenido en calibraciones desarrolladas para los principales ácidos grasos a partir de aceites, especialmente por los valores mucho más bajos del error típico de predicción y más altos del RER, como se ha puesto de manifiesto en trabajos con mezclas de distintos aceites (Chen y Chen, 1995) o girasol (Pérez-Vich et al., 1998). No obstante, los resultados son lógicamente poco comparables ya que en estos casos se trata de analizar una matriz mucho más simple constituida prácticamente por ácidos grasos y sin interferencias de otros constituyentes (principalmente agua) como en el caso de la aceituna entera.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican por tanto que la tecnología NIRS puede ser de gran utilidad para reducir el coste y tiempo requerido para evaluar el elevado número de genotipos que genera el programa de mejora de olivo, consiguiéndose la suficiente precisión para seleccionar genotipos en base al rendimiento graso y contenido de ácido oleico, dos de los objetivos más importantes en dicho programa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento al Centro de Investigación y Formación Agraria "Venta del Llano" de Mengíbar (Jaén) donde se realizaron los análisis de composición acídica por cromatografía de gases.

BIBLIOGRAFÍA

Barranco, D.; Rallo, L. (2000). Olive cultivars in Spain. *HortTechnology* **10**, 107-110.

Batten, G.D. (1998). An appreciation of the contribution of NIR to agriculture. *J. Near Infrared Spectrosc.* **6**, 105-114.

Chen, Y.S y Chen, A.O (1995). Quality analysis and purity examination of edible vegetable oils by near infrared transmittance spectroscopy en *Leaping ahead with. Near Infrared Spectroscopy*, p. 316-323. Batten, G.D. et al., (Eds.). Royal Australian Chemical Institute.

Garcés, R., Mancha, M. (1993). On step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from Fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* **211**, 139-143.

García, J.A.; Hermoso, M.; Cáceres, P. (1996). Determinación del contenido graso y humedad en orujos de dos fases mediante infrarrojo cercano. *Grasas y Aceites* **47**, 317-322.

Garrido, A.; Pérez, M.D.; García-Olmo, J. (En prensa). Applications in Fats and Oils Analysis en *Near Infrared*

Spectroscopy in Agriculture, Chapter 19. Roberts et al. (Eds.). Monograph. Crop Science Society of America. Madison. USA.

Hermoso, M.; Uceda, M.; García-Ortiz, A.; Jiménez, A.; Beltrán, G. (1999). Preliminary results of NIR "on-line" measure of oil content and humidity in olive cakes from the two phases decanter. *Acta Hort.* **474**, 717-719.

Jiménez, A.; Izquierdo, E.; Rodríguez, F.; Dueñas, J.I.; Tortosa, C. (2000). Determinación de grasa y humedad en aceitunas mediante medidas de reflectancia en infrarrojo cercano. *Grasas y Aceites* **51**, 311-315.

Panford, J.A.; De Man, J.M. (1990). Determination of oil content of seed by NIR: Influence of fatty acid composition on wavelength selection. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 473-482.

Pazdernik, D.L.; Killam, A.S.; Orf, J.H. (1997). Analysis of amino and fatty acid composition in soybean seed, using Near Infrared Spectroscopy. *Agron. J.* **89**, 679-685.

Pérez-Vich, B.; Velasco, L.; Fernández-Martínez, J.M. (1998). Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the análisis of intact sedes, husked sedes, meal and oil by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**, 547-555.

Rallo, L., (1995). Selección y mejora genética del olivo en España. *Olivae* **59**, 46-53.

Reinhardt, T.C.; Paul, C.; Röbbelen, G. (1996). Quantitative analysis of fatty acids in intact rapeseed by NIRS en *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*, p. 323-327. Davies, A.M.C.; Williams, P.C. (Eds.). NIR Publications. Chichester. UK.

Río, C. del; Romero, A.M. (1999). Whole, unmilled olives can be used to determine their oil content by Nuclear Magnetic Resonance. *HortTechnology* **9**, 675-680.

Sato, T., Kawano, S. y Iwamoto, M. (1991). Near infrared spectral patterns of fatty acid analysis from fats and oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 827-833.

Shenk, J. S.; Westerhaus, M. O. (1995). Analysis of Agricultural and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Monograph. NIRSystems, Inc., 12101 Tech Road, Silver Spring, MD 20904.

Velasco, L.; Pérez-Vich, B.; Fernández-Martínez, J.M. (1998). A rapid and simple approach to identify different sunflower oil types by means of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**, 1883-1888.

Velasco, L.; Becker, H. (1998). Estimating the fatty acid composition of the oil in intact-seed rapeseed (*Brassica napus* L.) by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Euphytica* **101**, 221-230.

Velasco, L.; Möllers, C.; Becker, C. (1999). Estimation of seed weight, oil content and fatty acid composition in intact single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Euphytica* **106**, 79-85.

Wesley, I.J.; Barnes, P.J.; McGill, A.E.J. (1995). Measurements of adulteration of olive oils by near red infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72**, 289-292.

Williams, P.C.; Sobering, D. (1996). How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations en *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*, p. 185-188. Davies, A.M.C.; Williams, P.C. (Eds.). NIR Publications. Chichester. UK.