



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE TOCOFEROLES Y TOCOTRIENOS EN CEREALES Y FRUTOS SECOS

Alumno/a: Alba María Díaz Rodríguez

Junio, 2021



UNIVERSIDAD
DE JAÉN



Facultad de
Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE TOCOFEROLES Y TOCOTRIENOS EN CEREALES Y FRUTOS SECOS

Alumno/a: Alba María Díaz Rodríguez

Jaén, Junio, 2021

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. OBJETIVOS	2
3. INTRODUCCIÓN	2
3.1. Vitamina E, tocoferoles y tocotrienoles	2
3.2. Beneficios de la ingesta de tocoferoles y tocotrienoles	4
3.3. Fuentes de tocoferoles y tocotrienoles en alimentos	6
3.4. Importancia de cereales y frutos secos	9
4. BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA	10
5. MÉTODOS DE ANÁLISIS	15
5.1. Tratamiento de muestra para la determinación de tocoferoles en cereales y frutos secos	15
5.1.1. <i>Saponificación previa a la extracción de tocoferoles y tocotrienoles</i>	16
5.1.2. <i>Extracción sin saponificación previa</i>	20
5.2. Técnicas analíticas para la determinación de tocoferoles en cereales y frutos secos	24
5.2.1. <i>Técnicas espectroscópicas</i>	25
5.2.2. <i>Cromatografía líquida de alta resolución</i>	28
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38

1. RESUMEN

Actualmente existen varias normas para la determinación de tocoferoles en matrices alimentarias. Sin embargo, no todas estas normas son aplicables a todo tipo de alimentos. Este trabajo bibliográfico se centra en la evaluación crítica de las metodologías analíticas disponibles que permitan conocer, de forma eficaz y precisa, el perfil y la cantidad de tocoferoles y tocotrienoles en cereales y frutos secos, que suelen presentar un alto contenido en estos antioxidantes. En este trabajo se comparan tanto los métodos normalizados como otros disponibles en la bibliografía científica. El trabajo se dividirá en dos discusiones importantes: la comparación de los métodos de extracción de los analitos, y las técnicas instrumentales para su determinación, ya que los tocoferoles son compuestos que presentan dificultades en su determinación por ser fácilmente degradables. El método más común de preparación de muestra es la saponificación mientras que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica más adecuada para la determinación.

ABSTRACT

Currently, there are some standard methods for the determination of tocopherols in food matrices. However, not all these standards apply to all types of food. This bibliographic work focuses on the critical evaluation of the available analytical methodologies for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals and nuts. They usually have a high content of these antioxidants. In this work, both the standardized methods and others available in the scientific bibliography are compared. The discussion is arranged into two main aspects: the comparison of the extraction methods and the analytical techniques for their determination. The tocopherols are compounds that have difficulties in their determination because they degrade quickly. The most characteristic conclusions in this work are: the best procedure for the extraction is saponification, and the most appropriate technique is the high-performance liquid chromatography (HPLC).

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es evaluar de manera crítica los diversos métodos de análisis de tocoferoles y tocotrienoles en cereales y frutos secos. Por un lado, se discutirá la aplicación a los alimentos de interés de los métodos normalizados y, por otro lado, se compararán con los métodos de análisis disponibles en la bibliografía, desarrollados específicamente para cereales y frutos secos.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Vitamina E, tocoferoles y tocotrienoles

La palabra tocoferol es la síntesis de las palabras griegas “tokos” que significa nacimiento, “phero” que significa tener o llevar y “ol” que refiere a las propiedades alcohólicas (Miyazawa *et al.*, 2011). Durante una experimentación con ratas, se observó que en algunos casos se veía interrumpida la fase de embarazo y se pensó que ello era debido a la falta o insuficiencia de vitaminas, concretamente, a una vitamina que existe en verduras de hoja verde y algunas grasas naturales (Evans y Bishop, 1922), se le designó el nombre de tocoferol por el efecto que mostraba y vitamina E por el orden de nomenclatura. No fue hasta 1936 que se consiguió aislar este producto activo. La estructura de la vitamina E se trata de una cabeza de cromano con dos anillos, uno fenólico y otro heterocíclico, unidos a una cadena hidrófoba derivada de isoprenoides (Primo Yúfera, 1998).

Los tocotrienoles, como los tocoferoles, son compuestos liposolubles y tienen en común con los tocoferoles algunas semejanzas: comparten una estructura parecida (cabeza de cromanol con dos anillos y cadenas laterales R1 y R2), siendo distinguibles entre sí por la cadena derivada de isoprenoides (una cadena lateral saturada de 16 carbonos, con tres esqueletos de isopreno), que es insaturada en el caso de los tocotrienoles y saturada en tocoferoles (Figura 3.1) (Theriault *et al.*, 1999).

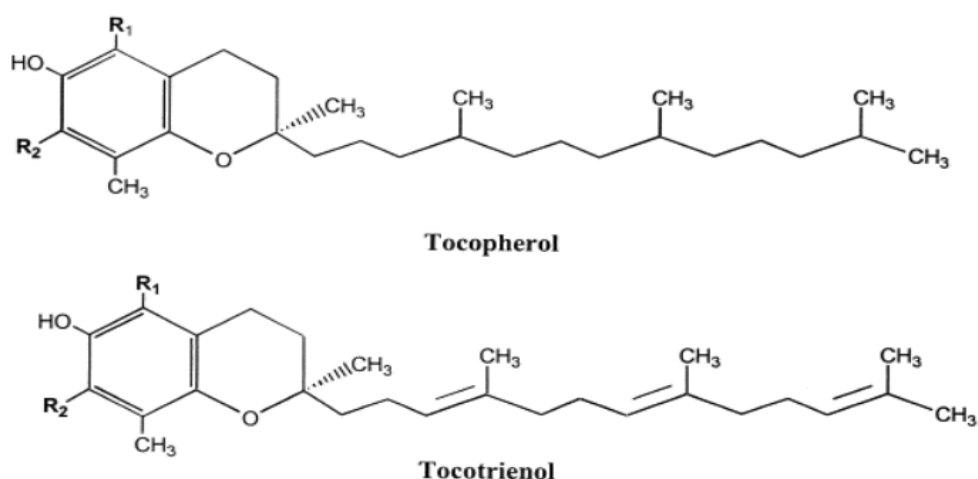


Figura 3.1. Estructura de tocoferoles y tocotrienoles.

Como se puede observar en la Figura 3.1, las diferencias entre los isómeros de los tocoferoles están en los metilos sustituyentes del anillo de cromano (R_1 y R_2). Las estructuras de los diferentes tipos de tocoferoles y tocotrienoles difieren según las cadenas laterales R_1 y R_2 . En la Tabla 3.1, se muestran los homólogos de tocoferol y tocotrienol:

Tabla 3.1. Homólogos de tocoferol y tocotrienol.

	R_1	R_2
α -tocoferol / tocotrienol	CH_3	CH_3
β -tocoferol / tocotrienol	CH_3	H
γ -tocoferol / tocotrienol	H	CH_3
δ -tocoferol / tocotrienol	H	H

Existen cuatro estructuras que pueden ser consideradas como tocoferoles y cuatro como tocotrienoles: α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol y α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol y δ -tocotrienol. En la molécula del α -tocoferol hay tres centros de asimetría, y el α -tocoferol natural (2R, 4'R y 8'R) se designa como D- α -tocoferol. Es el isómero más abundante y, a pesar de que todos los isómeros son absorbidos por los seres vivos mediante la

alimentación, sólo el α -tocoferol cumple los requisitos para ser definido realmente como una vitamina, ya que es el único que demuestra proteger al organismo contra la probable enfermedad producida por su ausencia; no se ha estudiado la capacidad para prevenir dicha falta de vitamina de los demás tocoferoles, y por tanto no pueden considerarse vitaminas propiamente dichas. Además, es importante destacar también que el uso del atributo “isómeros” también es incorrecto debido a que solo las formas β - y γ - son isómeros, los tocoferoles α - y δ - no pueden llamarse isómeros y no son isómeros con las formas β - y γ - (Azzi, 2018).

A pesar de ser el más importante el α -tocoferol, los demás también tienen una naturaleza antioxidante parecida, debida en su mayor parte al grupo fenólico en el anillo de cromanol, más que en su cadena lateral (Niki *et al.*, 1985; Burton e Ingold, 1989). Tanto los tocoferoles como los tocotrienoles son compuestos distinguibles de entre otros debido a su gran poder antioxidante.

3.2. Beneficios de la ingesta de tocoferoles y tocotrienoles

El déficit de cualquier vitamina puede hacer que en nuestro organismo se desarrollen enfermedades, esto define la avitaminosis. De momento, no se ha descrito ningún efecto importante negativo por la falta de vitamina E en personas. Sin embargo, se sabe que podría ser causante de llegar a producir distrofias musculares en algunos animales, conjuntamente con ataxia, una enfermedad caracterizada por la falta de control muscular y coordinación de movimientos (Azzi, 2018). La falta de vitamina E en los neonatos puede asociarse a algunas patologías como retinopatías y otras enfermedades. Se pone de manifiesto el efecto beneficioso que tiene la vitamina E sobre algunas enfermedades, como la aterosclerosis y algunos tipos de cáncer (Primo Yúfera, 1998).

Es por ello que los tocoferoles se consideran como factores nutritivos esenciales que realizan distintas funciones fisiológicas, importantes a pesar de no ser tan bien conocidas como en el caso de otras vitaminas. La vitamina E es

absorbida y transportada mediante las grasas, es almacenada en el tejido adiposo, se metaboliza por oxidación y es excretada, con lo cual su riesgo por toxicidad en el caso de ingerir dosis altas es muy pequeño. La cantidad mínima recomendada es aproximadamente 10-20 mg/día; sin embargo, no se sabe con absoluta precisión debido a la ausencia de sintomatología de avitaminosis específica (Primo Yúfera, 1998).

El α -tocoferol es la forma más abundante y biológicamente activa de vitamina E, tratándose de uno de los antioxidantes naturales con alta eficiencia y baja toxicidad (Müller *et al.*, 2010), desempeñando un papel importante ante la mejora de la respuesta inmunitaria, ayudando a prevenir algunas enfermedades. Una de sus principales propiedades es su actividad antioxidante, entendida ésta como la resistencia que presenta dicho compuesto contra los radicales libres, lo que dificulta que se de una reacción de oxidación. Esto se debe a que tiene la capacidad de atraer radicales peróxido que peroxidan los ácidos insaturados de las membranas celulares y son producidos mediante el metabolismo oxidativo en las células. Dicha actividad captadora de los tocoferoles protege la membrana de las importantes variaciones producidas por la peroxidación (Primo Yúfera, 1998). Igualmente, los tocoferoles tienen efecto antiinflamatorio (Singh y Jialal, 2004) y producen una buena respuesta inmunitaria frente a enfermedades respiratorias (Wu y Meydani, 2014). La ingesta de antioxidantes para hacer frente a los radicales libres en nuestro organismo es muy importante y podemos enriquecer algunos alimentos para beneficiarnos de sus propiedades, como por ejemplo utilizar dichas propiedades antioxidantes para retrasar la vida útil de un producto alimenticio, de hecho, el α -tocoferol es utilizado ampliamente en el retraso de la oxidación de lípidos en aceites, aprovechando su carácter lipófilo. Dadas sus propiedades beneficiosas es posible encontrar suplementos alimenticios de α -tocoferol, normalmente en forma de acetato de α -tocoferol.

Con respecto a las demás formas de tocoferol: al estudiar el β -tocoferol se ha visto que tiene propiedades similares al α -tocoferol, sin embargo se ha demostrado que es 10 veces menos activo que el α -tocoferol con respecto a la inhibición de algunas proteínas (Martin-Nizard *et al.*, 1998), el γ -tocoferol tiene

propiedades antiinflamatorias, reduciendo los eicosanoides proinflamatorios y la respuesta inflamatoria en ratas (Jiang y Ames, 2003) y también la acción antiinflamatoria en lesiones pulmonares (Wagner *et al.*, 2014). Además, actúa inhibiendo el desarrollo de células cancerígenas en próstata (Gysin *et al.*, 2002) y mama (Yu *et al.*, 2008). El δ -tocoferol, al igual que el γ -tocoferol, puede inhibir el desarrollo de cáncer próstata (Wang *et al.*, 2016) y de mama (Smolarek *et al.*, 2012), pero además puede prevenir otros diversos problemas oncológicos como cáncer de pulmón (Li *et al.*, 2011) y de colon (Guan *et al.*, 2012). Además, disminuye la acumulación de lípidos en algunos trastornos por almacenamiento, como el colesterol (Xu *et al.*, 2015).

Los tocotrienoles, por su parte, además del efecto antioxidante semejante a los tocoferoles, tienen otras propiedades funcionales aparte de las antioxidantes: pueden reducir los niveles de colesterol (Qureshi *et al.*, 1991) y reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, debido a su propiedad antitrombótica (Theriault *et al.*, 1999). También se ha visto que, como los demás compuestos de la familia de los tocoferoles, tienen una gran importancia en el campo de la oncología. Entre ellos, se puede destacar que también tienen la capacidad de prevenir, inhibiendo el desarrollo de células cancerígenas, cáncer de hígado, mama, colon, próstata y melanomas (Nghah *et al.*, 1991., Nesaretnam *et al.*, 1992, Yu *et al.*, 1999., Eitsuka *et al.*, 2006., Srivastava y Gupta, 2006., He *et al.*, 1997).

3.3. Fuentes de tocoferoles y tocotrienoles en alimentos

Los tocoferoles se encuentran en alimentos de origen vegetal. Son sintetizados en plástidos de plantas a partir de precursores de la ruta del shikimato y del fosfato de metileritritol (Miyazawa *et al.*, 2011) como se indica en la Figura 3.2.

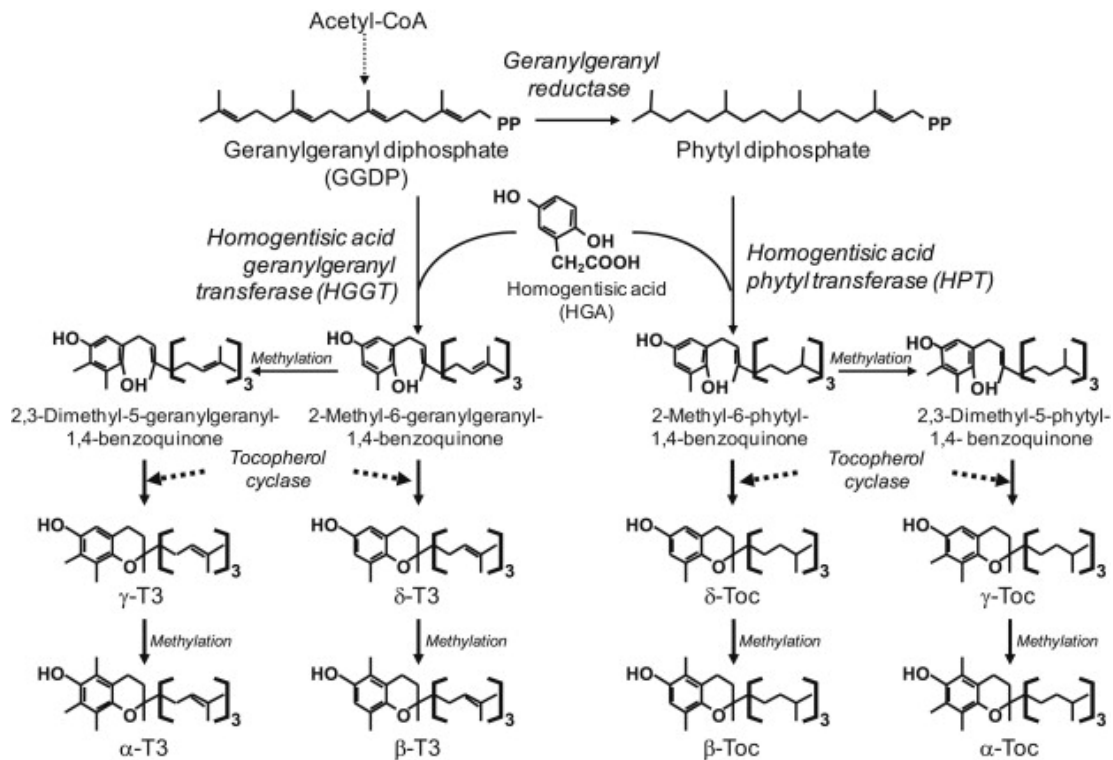


Figura 3.2. Ruta biosintética de los tocoferoles y tocotrienoles
(Miyazawa *et al.*, 2011).

Una de las fuentes más abundantes de los tocoferoles se trata de los aceites vegetales, diversos tipos de cereales, granos y semillas, así como en la fracción lipídica de muchas hortalizas verdes. Con respecto a los tocotrienoles, estos se encuentran presentes en granos de cereales, sobre todo salvado de arroz, vegetales verdes y algunos aceites vegetales (Sookwong *et al.*, 2010). En la tabla 3.2 se puede verificar que los alimentos que mayor contenido total de los diversos tocoferoles y tocotrienoles tienen son los cereales, granos y semillas, destacando también las verduras y frutas.

Tabla 3.2. Distribución de tocotrienol y tocoferol en fuentes alimentarias (mg/kg) (Miyazawa *et al.*, 2011).

	Tocotrienol (T3)				Tocoferol (Toc)			
	α -	β -	γ -	δ -	α -	β -	γ -	δ -
Cereales	0,61	1,22	1,11	0,11	4,78	1,36	6,52	1,07
Patatas	0,07	-	-	-	7,32	0,59	-	-
Granos	1,60	0,71	0,08	0,69	3,88	1,14	48,45	19,40
Semillas	0,76	0,10	0,38	0,20	42,38	1,21	91,28	2,08
Verduras	0,20	-	0,0	-	10,20	0,23	5,94	0,05
Frutas	0,19	-	0,03	0,03	6,16	0,07	1,21	-
Algas	0,09	0,03	-	-	10,44	0,11	-	-
Mariscos	0,54	-	-	-	13,65	0,17	2,25	0,04
Carnes	0,28	-	0,03	-	6,83	-	0,54	-
Huevos	-	-	-	-	18,11	-	1,67	-

En el caso de los aceites refinados, en el proceso de refinación, se pierde gran cantidad de tocoferoles. Aunque en el proceso de desodorización, en el condensado conseguido, es posible la recuperación del α -tocoferol en grandes cantidades (Primo Yúfera, 1998). En las experiencias o investigaciones que se relacionan con el estudio de los tocoferoles hay que tener cuidado con la exposición a luz ultravioleta (UV) puesto que se destruye con facilidad. Esta memoria se centra en la determinación de la cantidad de tocoferoles y tocotrienoles en cereales y frutos secos, debido a que se consideran bastante abundantes en dicho grupo de alimentos. En la tabla 3.3 se muestra el contenido en vitamina E de algunos cereales.

Tabla 3.3. Contenido aproximado de vitamina E en los granos enteros de cereales en mg/kg
(Primo Yúfera, 1998).

Cereal	Contenido de Vitamina E (tocoferoles)
Arroz descascarillado	13,1
Avena	6,6
Cebada	6,8
Centeno	17,4
Maíz	3,0
Trigo	4,3

3.4. Importancia de cereales y frutos secos

La mayoría de cereales proviene de la evolución de formas silvestres de las gramíneas. Se trata de un grupo de alimentos que se consideran básicos. De hecho, el pan puede proveer el 50% de las necesidades de carbohidratos, 33,33% de proteínas y hasta un 60% de vitaminas del grupo B, además de contribuir al aporte de minerales y oligoelementos (Belitz y Grosch, 1997). Los cereales principales consumidos en Europa son: trigo, arroz, centeno, maíz, avena y cebada. Debido a que se trata de una fuente considerable de nutrientes, los cereales se consideran un componente esencial en la dieta diaria europea. Son capaces de ejercer una actividad protectora frente a diversas enfermedades, como pueden ser las enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y diabetes tipo 2 (Vallejo, 2011). Además, diversos estudios han demostrado que la ingesta de cereales integrales podría tener la capacidad de proteger contra la obesidad, debido a su estructura, cantidad de fibra y de magnesio, conjuntamente con sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Fardet, 2010).

En cuanto a los frutos secos, se trata de alimentos cuya composición química es muy variada, lo que confiere propiedades muy interesantes como alimento. Fundamentalmente compuestos de lípidos (50%), donde destacan un perfil y

contenido de ácidos grasos muy variable, compuestos nitrogenados (20%) y agua (<10%) además de vitaminas y minerales (Belitz y Grosch, 1997) donde destacan sobre todo tocoferoles, fitosteroles y fitoestrógenos. Los diversos artículos que centran su estudio en determinar los efectos protectores han destacado que los frutos secos son alimentos que pueden relacionarse con la disminución del riesgo de padecer determinadas enfermedades, como pueden ser: accidentes cardiovasculares, problemas de colesterol y, en el caso de las nueces, accidentes cerebrovasculares (Nus *et al.*, 2004).

Según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en España, en el año 2018 se obtuvieron valores de hasta 4.278 millones de euros por la producción en el sector de los cereales. En España se cultivan 6 millones de hectáreas de cereales de media y se trata del sector en la agricultura que tiene mayor base territorial y se encuentra distribuido en todo el territorio. No obstante, España es un país importador de cereales, ya que la producción nacional no llega a cubrir las necesidades internas. Si hablamos de la Unión Europea, los datos de producción ascienden a 288,68 Mt de cereales y una superficie de 55.157.000 ha en la campaña de 2018/2019. Con respecto a los frutos secos, su producción ocupó hasta una superficie de 788.408 ha en España en 2020 (un 74 % de la superficie de frutales no cítricos), de la cual la gran parte estaba destinada a la producción de almendra (90%). La producción de frutos secos se trata de un sector en el que España y Europa son importadores debido a la demanda creciente, ya que cada vez se vincula más el consumo de estos alimentos con dietas saludables, según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Página Web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021).

4. BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

Para elaborar este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica en diferentes bases de datos y fuentes de contenido de carácter científico e investigación. Entre otras bases de datos, se ha utilizado generalmente Web Of Science y Scopus, aparte de alguna búsqueda específica en Google Scholar.

Se realizaron varias búsquedas para iniciar una primera toma de contacto con el tema a tratar y saber de cuánta información se disponía. Las búsquedas quedan representadas en la tabla 4.1.

Así, para la base de datos Scopus, la búsqueda de las palabras clave “vitamin E” y “tocopherols”, dió un resultado de 75.975 referencias para la primera y 89.864 para la segunda. Como desde un principio se tenía la idea de centrar el trabajo en la determinación de tocoferoles en un determinado grupo de alimentos, sean estos, sobre todo cereales y además, frutos secos, al ser de los alimentos que más contenido suponen tener este compuesto, se hizo una tercera búsqueda para acotar, esta vez, “tocopherols in cereals”, dando esta vez 570 documentos. Para enfocarse en frutos secos se decidió realizar dos búsquedas usando la traducción de frutos secos como “nuts” (616 resultados), y como “dried fruits” (111 resultados), ya que nuts también se puede traducir como nueces. Finalmente, para hacer un estudio de los métodos y técnicas usadas, se buscó “determination tocopherols in cereals” (47 resultados), “determination tocopherols in nuts” (26 resultados), y “determination tocopherols in dried fruits” (7 resultados). También se realizaron las mismas búsquedas para la base de datos Web Of Science, obteniendo un número de resultados más o menos similar (ver tabla 4.1).

Tabla 4.1. Número de resultados de las búsquedas en bases de datos.

Búsqueda	Scopus	Web Of Science
Vitamin E	75.975	72.410
tocopherols	89.864	40.022
tocopherols in cereals	570	305
tocopherols in nuts	616	434
tocopherols in dried fruits	111	202
determination tocopherols in cereals	47	42
determination tocopherols in nuts	26	27
determination tocopherols in dried fruits	7	14

Cabe destacar la diferencia de resultados que se puede apreciar entre las bases de datos cuando se realiza la búsqueda “tocopherols”, sin embargo, las demás búsquedas se asemeja mucho la cantidad de resultados tanto en una base de datos como en otra. Finalmente, tras contrastar estas dos bases de datos principales, se decidió centrarse más en la base de datos de Scopus, puesto que resultaba más intuitiva y un poco más fácil de guiarse que en WOS.

De todas las entradas se filtraron las que eran accesibles y aquellas que fueron consideradas más representativas, ya que muchas de ellas no eran posible su visualización, otras eran estudios relacionados del mismo autor o que resultaban algo repetitivas en cuanto a métodos usados. Para poder hacerse una idea de la cantidad de métodos que existen para la determinación de tocoferoles en cereales y frutos secos, se decidió reunir algunas de las fuentes filtradas para poder ver cuáles de estos métodos son los más usados. Para ello, en la tabla 4.2 se hace una recopilación de métodos de análisis de tocoferoles y tocotrienoles en cereales y frutos secos, detallando las técnicas de preparación de muestra y de análisis.

Tabla 4.2. Selección de los métodos de análisis de tocoferoles en cereales y frutos secos más representativos.

Analito(s)	Alimento	Preparación de la muestra	Técnica de análisis	Referencia
α -tocoferol	Frutos secos, leche y una muestra miscelánea de avena y clavo	Saponificación	Espectroscopía UV-Vis	Kumar y Kamboj, 2021
α -, γ -, δ -tocoferol y acetato de α -tocoferol	Semillas de soja y maíz	Congelación, trituración y homogeneización	Espectroscopía UV-Vis	Prieto <i>et al.</i> , 1999
Nutrientes de clases múltiples (α -tocoferol)	Frutas, verduras y cereales	Extracción en fase sólida (SPE)	Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC)	Arvapally <i>et al.</i> , 2021

α -, β -, γ - y δ -tocoferol, α -tocotrienol, (β + γ)-tocotrienol y δ -tocotrienol	Cereales y frutos secos	MWCNT (Multiwall Carbon Nanotubes) y extracción en fase sólida	Cromatografía de gases (CG)	Lu <i>et al.</i> , 2019
α -tocoferol	Trigo, arroz, arroz negro, granos de centeno, mijo y trigo sarraceno	Saponificación y Microextracción líquido-líquido dispersivo líquido-iónico	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Xie <i>et al.</i> , 2016
α -, γ , δ -tocoferol	Frutos secos y semillas	Saponificación y Extracción con una membrana de silicona no reforzada	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Delgado-Zamarreño <i>et al.</i> , 2001
α -, (β + γ), δ -tocoferol	Almendras, semillas de girasol, avellanas y nueces	Saponificación y Extracción líquida presurizada	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Delgado-Zamarreño <i>et al.</i> , 2004
α -, γ -, δ -tocoferol, α -, γ -, y δ -tocotrienol	Trigo y centeno	Extracción líquida presurizada	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Bustamante-Rangeli <i>et al.</i> , 2007
α -, β -, γ - δ -tocoferol, α -, β -, γ - y δ -tocotrienol	Harina de centeno	Saponificación y Extracción con n-hexano: acetato de etilo (8:2)	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Ryynänen <i>et al.</i> , 2004
α -, β -, γ - δ -tocoferol, α -, β -, γ - y δ -tocotrienol	Maíz, avena, trigo, espelta, triticale y cebada	Saponificación y extracción con con n- hexano / acetato de etilo (9:1), Extracción sin saponificación con n- hexano / acetato de etilo (9:1), Extracción con metanol	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Panfili <i>et al.</i> , 2003
α -, γ - y δ -tocoferol	Brotes de malta	Extracción con fluidos	Cromatografía líquida de alta	Carlucci <i>et al.</i> , 2001

		supercríticos (SFE)	resolución (HPLC)	
α -, γ - y δ -tocoferol	40 productos alimenticios (algunos frutos secos)	Saponificación y Extracción con hexano	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Hogarty <i>et al.</i> , 1989

Por otra parte, se procede a realizar otra búsqueda de métodos normalizados de análisis desarrollados por organizaciones internacionales como ISO (Organización Internacional de Normalización). Para ello, se utilizó el portal AENORMás para obtener una relación de normas aplicables a métodos de determinación de tocoferoles. Así pues, se encontraron solamente 13 informes, de los cuales sólo se encuentran vigentes 6, y 2 en tramitación. Las normas que se encuentran anuladas, no quedan anuladas por sí mismas, sino que se trata de antiguas versiones que se encuentran actualizadas por versiones más recientes, pero la norma sigue siendo la misma, es el caso de las normas UNE-EN ISO 9936:2006, UNE-EN ISO 9936:2007/A1:2011, UNE-EN ISO 9936:2007/AC:2008 y UNE-EN ISO 9936:2007 que quedan anuladas por la norma UNE-EN ISO 9936:2016 y la norma UNE-EN 12822:2000 que queda anulada por la norma UNE-EN 12822:2014. Esta información se recoge en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Normas aplicables a métodos de determinación de tocoferoles.

Norma	Título	Estado
UNE-EN ISO 9936:2016	Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación de los contenidos de tocoferol y tocotrienol mediante cromatografía líquida de alta resolución.	Vigente
UNE-EN 12822:2014	Productos alimenticios. Determinación de vitamina E mediante cromatografía líquida de alta resolución. Medición de los tocoferoles alfa-, beta-, gamma- y delta.	Vigente
UNE 84714:2009	Materias primas cosméticas. Tocoferol y acetato de tocoferilo. Determinación de la riqueza por cromatografía en fase gaseosa.	Vigente
UNE 84711:2008	Materias primas cosméticas. Tocoferol.	Vigente
UNE-EN ISO	Alimentos para animales. Determinación del	Vigente

6867:2001	contenido de vitamina E. Método por cromatografía líquida de alta resolución.	
UNE 55073:1981	Materias grasas. Determinación de tocoferoles en grasas comestibles.	Vigente
PNE 84714	Materias primas cosméticas. Tocoferol y acetato de tocoferilo. Determinación de la riqueza por cromatografía en fase gaseosa.	Tramitación
PNE 84711	Materias primas cosméticas. Tocoferol.	Tramitación

De las 6 normas vigentes en relación a tocoferoles para el consumo sólo se pueden encontrar 3 que son aplicables a productos alimenticios de uso humano y 1 aplicable a alimentos de consumo animal: (i) la norma ISO 9936:2016 para la determinación de tocoferoles y tocotrienoles en aceites y grasas de origen animal y vegetal; (ii) la norma UNE-EN 12822:2014, para la determinación de tocoferoles en muestras como lo son margarina, leche en polvo y avena en polvo, (iii) la norma UNE 55073:1981 para la determinación de tocoferoles en grasas comestibles, en especial aceites de oliva vírgenes y (iv) UNE-EN ISO 6867:2001 para la determinación del contenido en vitamina E en alimentos para animales.

Cabe destacar que la mayoría de las normas realizan una determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (normas UNE-EN 12822:2014, UNE-EN ISO 6867:2001 y UNE-EN ISO 9936:2016), mientras que la norma más antigua UNE 55073:1981 utiliza cromatografía en capa fina de gel de sílice.

5. MÉTODOS DE ANÁLISIS

5.1. Tratamiento de muestra para la determinación de tocoferoles en cereales y frutos secos

Esta etapa varía muchísimo según el tipo de muestra que se quiera analizar y el método utilizado para la determinación. Así pues, no será igual de eficaz un tratamiento u otro según para qué determinada experiencia. De forma general,

para determinar tocoferoles y tocotrienoles en alimentos, es necesario realizar una saponificación para la degradación de la matriz alimentaria y después una extracción de los analitos de la fracción insaponificable. En algunos tipos de alimentos, por ejemplo, aceites, es posible inyectar la muestra directamente en el sistema cromatográfico tras una simple dilución. Sin embargo, para cierto tipo de muestras, como cereales y frutos secos, debido a que tanto los tocoferoles como los tocotrienoles están relacionados en las membranas tilacoidales de dichos alimentos, sería necesario el proceso de saponificación antes de una extracción con disolvente, ya que puede haber ésteres de ácidos grasos con tocoferoles y al realizar dicha saponificación, se liberarían los tocoferoles en la fracción insaponificable. Aún así, se busca reemplazar y/o optimizar el proceso de saponificación de la muestra debido a la inestabilidad de estos analitos en condiciones alcalinas, ya que dicho proceso de saponificación puede contribuir a la pérdida de los mismos.

5.1.1. Saponificación previa a la extracción de tocoferoles y tocotrienoles

La saponificación es la hidrólisis de los enlaces éster en las grasas y aceites promovida generalmente por una base. La palabra saponificación se deriva del latín *saponis*, que significa jabón, ya que uno de los productos obtenidos es el jabón. Dicho jabón se trata de una sal de sodio o de potasio de un ácido graso. En la actualidad, el jabón se prepara hirviendo grasa animal o aceite vegetal con una disolución de hidróxido de sodio o de potasio. (Wade, 2012). En la figura 5.1 se muestra un esquema de la reacción de saponificación.

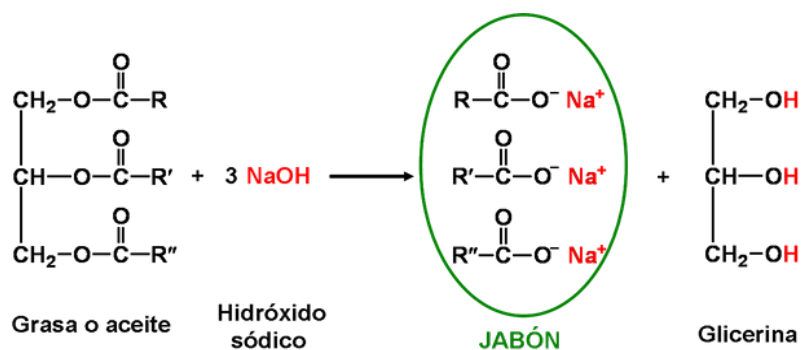


Figura 5.1. Proceso de la saponificación.

Como anteriormente se ha mencionado, existen cuatro normas UNE en vigor que establecen procedimientos normalizados para la determinación de tocoferoles en alimentos. De estas cuatro normas, las que podrían ser aplicables al tipo de muestra de interés (cereales y frutos secos) serían las normas UNE 12822:2014 y la norma UNE-EN ISO 6867:2001, ya que las otras dos normas están destinadas para aceites y/o grasas animales. No obstante, todas estas normas siguen procedimientos muy similares, con diferencias mínimas con respecto al pretratamiento de la muestra y a los disolventes usados en la extracción. En la figura 5.2 se muestra de manera esquemática las diferencias y semejanzas de los diversos métodos.

Los aspectos que sí parecen comunes sea cual sea la norma usada son: (i) la necesidad de homogeneizar la muestra, (ii) la necesidad de proteger la muestra de la luz UV, usando materiales color ámbar o cubriendo la instrumentación con papel de aluminio, y evitar exposición prolongada a altas temperaturas, (iii) el empleo de una etapa de saponificación previa a la extracción para el análisis de muestras de alimentos en las que los tocoferoles y tocotrienoles se encuentran en forma de ésteres de tocoferol o tocotrienol, (iv) se trabaja bajo atmósfera inerte de nitrógeno para evitar la oxidación, y (v) el disolvente utilizado para la extracción se elimina mediante rotavapor a una temperatura no superior a 40 °C y se realiza una destilación azeotrópica con etanol absoluto para eliminar trazas de agua.

Con respecto a las diferencias entre las distintas normas, además de las muestras a las que son aplicables, se analizan distintos analitos. Así, de las dos normas más apropiadas para el análisis de cereales y frutos secos, la norma UNE 12822:2014 está indicada para la determinación de α -, β -, γ -, y δ -tocoferol, mientras que la norma UNE-EN ISO 6867:2001 sólo está indicada para la determinación de DL- α -tocoferol. Las otras dos normas, desarrolladas para aceites y grasas, determinan α -, β -, γ -, y δ -tocoferol y α -, β -, γ -, y δ -tocotrienol (norma ISO 9936:2016), y α -, γ -, y δ -tocoferol (norma UNE 55073:1981), respectivamente. La homogeneización de la muestra es similar en todos los casos, con la diferencia de que es necesario secar la muestra en

casos de muestras húmedas y triturar o moler en casos de muestras sólidas. La saponificación es prácticamente el mismo procedimiento en todas las normas, las únicas variaciones que podemos observar son: (i) el tipo de antioxidante usado, pudiendo ser ácido ascórbico, pirogalol o butilhidroxitolueno (BHT), siendo el más usado el pirogalol (UNE-ISO 9936:2016 y UNE 55073:1981); (ii) Saponificación a reflujo, con temperaturas de entre 80 y 100 °C, siendo lo más común, (UNE 12822:2014, UNE-EN ISO 6867:2001 y UNE 55073:81) o saponificación en frío a una temperatura de 26 °C (ISO 9936:2016); (iii) tiempos de saponificación (15-40 min UNE 12822:2014, 30 min UNE-EN ISO 6867:2001, 10 min mínimo ISO 9936:2016 y 3 min mínimo para UNE 55073:1981). Para extraer el analito cada norma utiliza un disolvente orgánico adecuado para dicho trabajo, de la misma forma que ocurre con el disolvente usado para la dilución final antes de la determinación cromatográfica, como se puede observar en la figura 5.2.

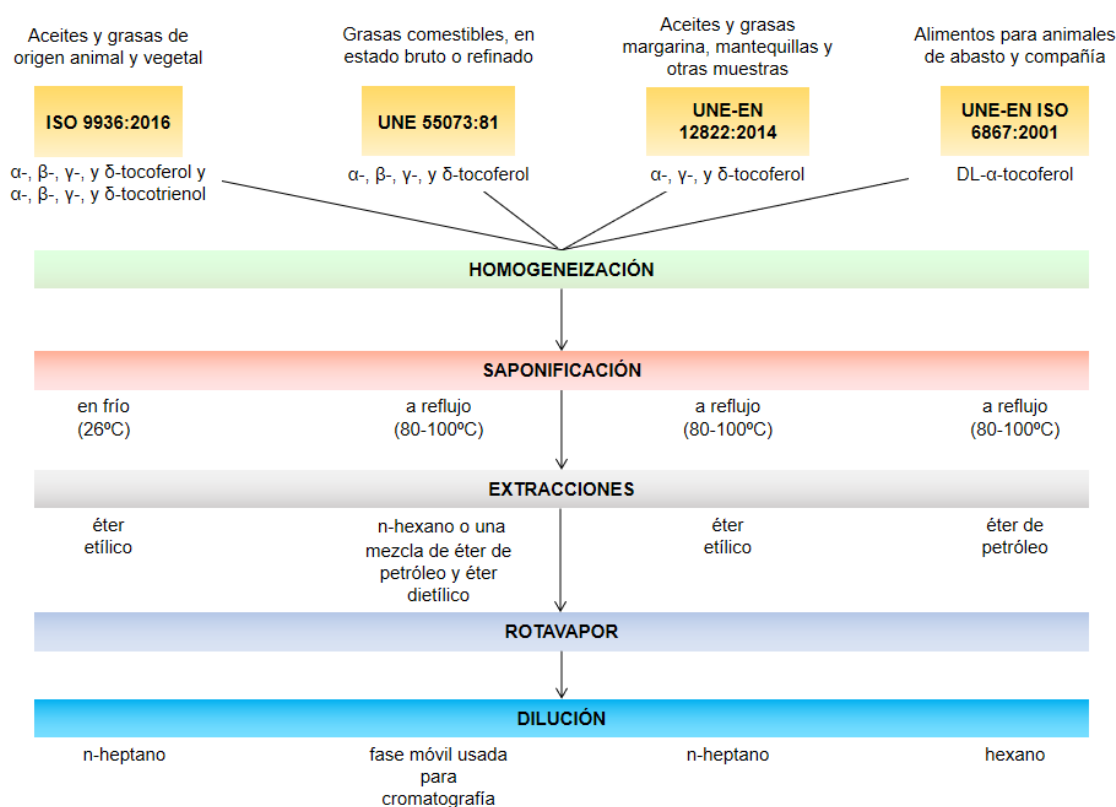


Figura 5.2. Preparación de muestra para las diferentes normas.

Como puede observarse en la tabla 4.2, la saponificación es un procedimiento habitual encontrado en bibliografía para la determinación de tocoferoles en

alimentos. La mayoría de los artículos que se han estudiado para realizar este trabajo utilizan la saponificación en el tratamiento de los cereales y frutos secos y siguen el mismo o un procedimiento muy similar al descrito por las anteriores normas, con diferencias entre ellas en el antioxidante usado, el tiempo y la temperatura de saponificación. El antioxidante mayormente utilizado para el proceso de saponificación en los artículos revisados es el ácido ascórbico, salvo en artículos como el de Kumar y Kamboj (2021), y Panfili *et al.* (2003), que utilizan glicerol y pirogalol, respectivamente. El tiempo de extracción varía, encontrándose procesos que se llevan a cabo durante varias horas (Delgado Zamarreño *et al.*, 2004, 2007; Kumar y Kamboj, 2021), e incluso durante toda la noche (Hogarty *et al.*, 1989). Otros, sin embargo, como Ryyänen *et al.*, (2004) (25 min), Panfili *et al.*, (2003) (45 minutos) y Xie *et al.*, (2016) (30 minutos), utilizan tiempos inferiores a la hora. Con respecto a la temperatura, la mayoría proponen temperaturas altas, de ebullición o próximas, en el rango de los 70-100 °C, a excepción de Delgado Zamarreño *et al.* (2004, 2007), que proponen una saponificación en frío y trabajan a temperatura ambiente.

Se podría interpretar, que al ser la única norma de determinación de tocotrienoles, la norma ISO 9936:2016, que incluye procedimiento con saponificación en frío, este podría ser un aspecto clave para la determinación de estos analitos. Sin embargo, en artículos como Panfili *et al.* (2003) y Ryyänen *et al.* (2004) también se determinan estos compuestos y se lleva a cabo una saponificación a reflujo, con temperaturas de ebullición o cercanas (70 °C y 100 °C respectivamente), con lo que no se considera un requisito para la determinación de tocotrienoles.

A pesar de resultar un proceso destructivo, no se niega que la saponificación sea un proceso económico y eficaz. No obstante, se buscan formas de mejorar el método. Algunos factores a tener en cuenta, que determinan el éxito de la saponificación, son: la adición de un antioxidante, trabajar bajo una luz tenue y atmósfera de nitrógeno. Se puede afirmar que la saponificación es un método muy eficaz si se controlan las condiciones para evitar la degradación de analito. Como se demuestra en el estudio de Ryyänen *et al.*, (2004), optimizando diversos factores del proceso de saponificación se puede mejorar dicho

proceso, incluyendo el tiempo de saponificación, la temperatura y la cantidad de hidróxido potásico usado. Se comprobó finalmente que la temperatura no es un factor tan determinante puesto que apenas ejercía un efecto significativo.

Tras el proceso de saponificación, la separación de los tocoferoles y tocotrienoles de la fracción insaponificable de la muestra se realiza generalmente mediante extracción líquido-líquido (LLE). Se trata de un método eficaz para extraer vitaminas liposolubles (Barba *et al.*, 2011), aunque tiene algunas desventajas, como la utilización de gran cantidad de disolventes orgánicos y es un proceso lento. La aproximación más utilizada para la mejora de esta técnica es la miniaturización de la misma, para reducir el consumo de disolvente. Por ejemplo, uno de los métodos para la determinación de α -tocoferol en granos de cereales propone realizar tras una saponificación una microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) para la extracción y preconcentración. De esta manera se pretende aumentar los porcentajes de recuperación, además de reducir el tiempo de extracción y abaratar aún más los costes. Otra de las ventajas es que se consigue disminuir la cantidad de disolvente utilizado, a pesar de que se consume un disolvente clorado relativamente tóxico (Xie *et al.*, 2016).

5.1.2. Extracción sin saponificación previa

En la bibliografía se puede encontrar la utilización de diversos métodos de extracción directa de tocoferoles y tocotrienoles de alimentos, utilizando técnicas como extracción Soxhlet (Carlucci *et al.*, 2001, Delgado-Zamarreño *et al.*, 2004), extracción líquido-líquido (LLE) (Levêques *et al.*, 2019), extracción en fase sólida (SPE) (Arvapally *et al.*, 2021), extracción con líquidos presurizados (PLE) (Bustamante-Rangel *et al.*, 2007) o extracción con fluidos supercríticos (SFE) (Carlucci *et al.*, 2001). Los disolventes orgánicos producen la alteración de las estructuras a las que se encuentran unidas los tocoferoles y tocotrienoles, haciéndolos más solubles. Los principales disolventes que se pueden utilizar para extracción son n-hexano y acetato de etilo en n-hexano, así como acetona.

El uso de LLE con pequeños volúmenes de disolvente (inferiores a 1 mL) permitió conseguir buenas recuperaciones de α - y γ -tocoferol presentes en leche materna (Levêques *et al.*, 2019). La SPE, por su parte, ofreció buenas recuperaciones de tocoferol en frutas, verduras y cereales. No obstante, al aplicar dicho método a muestras reales, no se pudo cuantificar debido a su alto límite de cuantificación (Arvapally *et al.*, 2021). También se han propuesto métodos que emplean la microextracción en fase sólida dispersiva (dSPME) para optimizar el contacto entre muestra y extractante, con el objetivo de disminuir el tiempo y disolvente utilizado (Xu *et al.*, 2016). Si además lo combinamos con nanotubos de carbono, que son materiales adsorbentes excepcionales que interactúan con los anillos de benceno de los compuestos aromáticos (Chen *et al.*, 2012) podemos obtener una de las técnicas que mejor resultado ha proporcionado para la determinación de α -, β -, γ - y δ -tocoferol y α -, β -, γ - y δ -tocotrienol en cereales y frutos secos (arroz, arroz negro, avena, maíz, mijo, adlai, harina de guisantes, harina de maíz, harina de trigo, soja, frijo rojo y negro, pipas de girasol, nueces, piñones y cacahuete pelado y sin pelar) (Lu *et al.*, 2019), concretamente mediante una microextracción dispersiva en fase sólida asistida por ultrasonidos usando como adsorbentes nanotubos de carbono de múltiples paredes (MWCNT-UA-dSPME). Al comparar el proceso de saponificación con este método, se vio que este último fue capaz de obtener resultados más satisfactorios, puesto que se consiguieron recuperaciones más altas, así como ser un método más rápido y evitar un gran consumo de disolventes orgánicos.

Se han realizado algunos estudios comparativos de la extracción con saponificación frente a la extracción directa con un disolvente orgánico. Por ejemplo, el estudio de Panfili *et al.* (2003) determinaba α -, β -, γ - y δ -tocoferol y α -, β -, γ - y δ -tocotrienol en muestras de varios cereales (avena, espelta, trigo, maíz, cebada y triticale) utilizando extracción con saponificación, el mismo método (extracción con n-hexano:acetato de etilo (9:1 v/v)) sin saponificación y la extracción con metanol. Se concluyó que todos estos métodos eran válidos puesto que daban unas recuperaciones bastante elevadas. Sin embargo, el método que incluía el proceso de saponificación en caliente fue el que mejor resultado obtuvo, por delante de la extracción con disolvente sin saponificación,

siendo la extracción con metanol, la que peores resultados proporcionó. Esto puede deberse a diversos factores como pueden ser que los tocoferoles se encuentren unidos a la matriz o que se encuentren en forma de éster, de modo que es necesario transformarlos en alcoholes para su separación. Además, sin saponificación, se requieren diversas etapas de purificación y puede aumentar la presencia de interferencias, formación de emulsiones y extracción de gran cantidad de lipídicos.

Otros autores (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2001) han comparado la diferencia entre la extracción tras una hidrólisis alcalina (saponificación) y la extracción directa con metanol y acetonitrilo a través de una membrana de silicona acoplada al sistema cromatográfico para la determinación de α -, β -, γ - y δ -tocoferol en muestras de semillas y frutos secos (nueces, almendras crudas y tostadas, cacahuetes crudos y fritos, y pipas de girasol crudas y fritas). Se vio que cualquiera de los métodos ofrecía buenos resultados en el caso del α -tocoferol, pero la hidrólisis alcalina producía la oxidación parcial de otros isómeros. El método que se deduce pues, como mejor, se trata de la extracción directa por membranas de silicona por dar mejores resultados para todos los tocoferoles, además de ser un método rápido y simple.

La técnica de PLE se ha empleado para la determinación de α -, β -, γ - y δ -tocoferol en muestras de frutos secos (almendras crudas y tostadas, pipas crudas y tostadas, avellanas crudas y fritas y nueces) (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2004), así como de α -, γ -tocoferol y γ -tocotrienol en trigo, y α -, γ -tocoferol y α -, γ -tocotrienol en centeno (Bustamante-Rangel *et al.*, 2007). Se trata de una técnica utilizada para extraer analitos de una matriz en estado sólido que utiliza disolventes a alta presión y temperaturas por encima de la temperatura de ebullición. En los ejemplos mencionados, se puede decir que no existen desigualdades entre los resultados obtenidos con extracción mediante saponificación o con PLE, siendo esta última una técnica más rápida, con un consumo menor de disolventes y con posibilidad de automatizarla, disminuyendo la probabilidad de errores.

La SFE usando como fluido dióxido de carbono (Dean, 1993) puede considerarse también una opción o alternativa interesante a la saponificación de la muestra, ya que el extracto contiene menos sustancias interferentes. Además, es una técnica rápida y protege la muestra contra la degradación provocada por la luz y las altas temperaturas debido a las suaves condiciones a las que se lleva a cabo, lo que puede resultar muy eficaz para la extracción de tocoferoles y tocotrienoles. Como inconveniente se puede citar que hay que tener cuidado con el fluido supercrítico que usamos puesto que no siempre es posible garantizar la extracción cuantitativa de los analitos, siendo necesario ajustar las condiciones de extracción adecuadas. La determinación de α -, γ - y δ -tocoferol en brotes de malta mediante SFE (Carlucci *et al.*, 2001) dio unos resultados comparables a si la extracción se hubiera realizado con acetona y mejores que si se hubiese extraído con otros disolventes orgánicos (cloroformo, metanol y etanol). Como inconveniente, se puede citar la necesidad de elevados tiempos de extracción (>270 min) para conseguir el máximo de recuperación de tocoferoles, tal y como se muestra en la Figura 5.3.

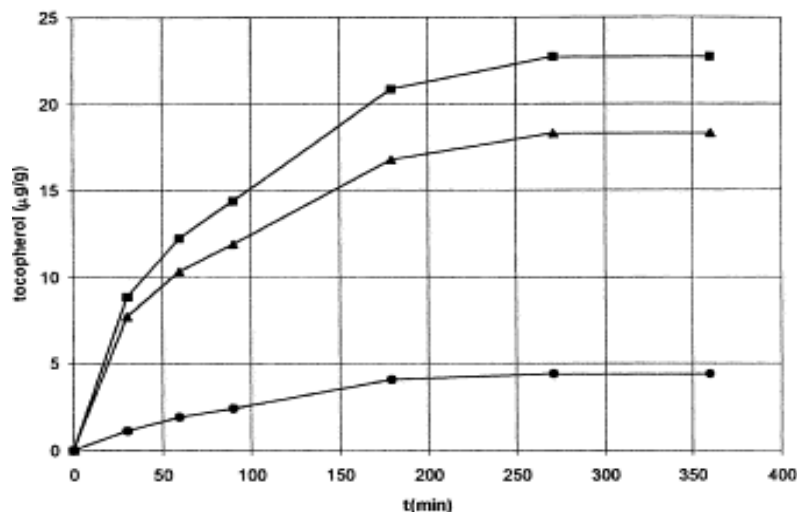


Figura 5.3. Perfiles SFE de tocoferoles de brotes de malta. ■, tocoferoles totales; ▲, α -tocoferol; •, γ -tocoferol (Carlucci *et al.*, 2001).

En conclusión, se puede decir que en el tratamiento de muestras de cereales y frutos secos no siempre es imprescindible realizar un proceso de saponificación, ya que existen muchas técnicas de extracción que dan resultados mejores y/o comparables al proceso de saponificación, y de manera

más rápida. No obstante, la saponificación en algunos casos sí puede ser muy recomendable para la separación de los tocoferoles de la matriz alimentaria. A pesar de poder ser un proceso, en ocasiones, más lento, y que gasta más disolvente, puede ser un método más simple y/o más económico que algunos de los métodos alternativos que se han descrito anteriormente, como por ejemplo el método que utiliza una dSPME usando como adsorbentes nanotubos de carbono de múltiples paredes (MWCNT), ya que el coste de los nanotubos puede encarecer el proceso.

5.2. Técnicas analíticas para la determinación de tocoferoles en cereales y frutos secos

Existe una amplia variedad de técnicas analíticas que se han utilizado para la determinación de los tocoferoles y tocotrienoles en alimentos, sobre todo en aceites. Así, podemos encontrar que se han utilizado (i) técnicas espectroscópicas, como la espectroscopía ultravioleta-visible (Kumar y Kamboj, 2021), o la espectroscopía infrarroja (Ahmed *et al.*, 2005; Özdemir *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2009), (ii) técnicas electroanalíticas (Noel-Robledo *et al.*, 2013), y (iii) técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida de (ultra) alto rendimiento ((U)HPLC) (Arvapally *et al.*, 2021; Bustamante-Rangel *et al.*, 2004 y 2007; Xie *et al.*, 2016), o la cromatografía de gases (CG) (Lu *et al.*, 2019). En lo referente a la determinación de tocoferoles en cereales y frutos secos, se ha podido observar que, de la bibliografía consultada, el 75% utiliza HPLC, el 8,3% otros tipos de cromatografía como la CG y un 16,7% utilizan técnicas espectrofotométricas como método de determinación. Por otra parte, las normas UNE ISO 9936:2016, UNE-EN 12822:2014 y UNE-EN ISO 6867:2001 también usan HPLC como técnica de determinación, mientras que en el caso de la norma UNE 55073:1981 la técnica seleccionada es la cromatografía de capa fina en gel de sílice. No obstante, esta última no es demasiado representativa pues la norma data de 1981 y existen métodos que se han ido desarrollando a lo largo de los años mucho más sensibles y selectivos.

En el caso de la cromatografía de gases, aunque se puede utilizar para determinación de tocoferoles y tocotrienoles, es necesario aumentar la estabilidad de dichos compuestos, así como su volatilidad. Esto se consigue realizando una derivatización. Sin embargo, realizar este tedioso proceso puede conllevar una pérdida irreversible de analito y por tanto se debe evitar utilizar para la determinación de estos compuestos (Lu *et al.*, 2015, 2019). A pesar de eso, investigaciones demuestran que es posible proceder con cromatografía de gases sin tener que derivatizar, además, se consiguen buenos resultados si se utiliza en el tratamiento de muestras una microextracción en fase sólida con nanotubos de carbono de paredes múltiples como adsorbente (Lu *et al.*, 2019). Se puede tratar de un método muy eficaz, pero no es un proceso demasiado económico ni aparentemente sencillo.

5.2.1. Técnicas espectroscópicas

Las técnicas espectroscópicas son aquellas en las que se mide la interacción de energía entre la radiación electromagnética y la materia. Dentro de las técnicas espectroscópicas nos podemos encontrar que existen técnicas de absorción, emisión y dispersión. La espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) es una técnica espectroscópica para medir cuanta luz absorbe una sustancia. Se aprovecha la absorción de la radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro. Por otra parte, la fluorescencia se trata de una técnica en la que la muestra absorbe radiación a una longitud de onda de excitación que incide sobre ella y refleja (emite) luz fluorescente en todas direcciones; un monocromador filtra dicha luz para dar paso a una longitud de onda de emisión que llega al detector (Hernández, 2002).

La instrumentación utilizada en espectrofotometría UV-Vis y espectrofluorimetría es muy similar, y consta fundamentalmente de una fuente de radiación continua, al menos un monocromador para seleccionar la longitud de onda, uno o más recipientes para la muestra, un detector, en algunos casos, un amplificador o procesador de señales y por último un dispositivo de lectura. En la Figura 5.4 se muestra una representación esquemática de un espectrofotómetro UV-Vis y de un espectrofluorímetro.

Con respecto a la configuración de la instrumentación, es destacable recalcar que en los espectrofluorímetros los monocromadores de excitación y emisión deben encontrarse en un ángulo de 90° para que en la longitud de onda de emisión no interfiera la longitud de onda de excitación. Así se consigue eliminar dichas interferencias y mejorar el límite de detección si comparamos con el espectrofotómetro.

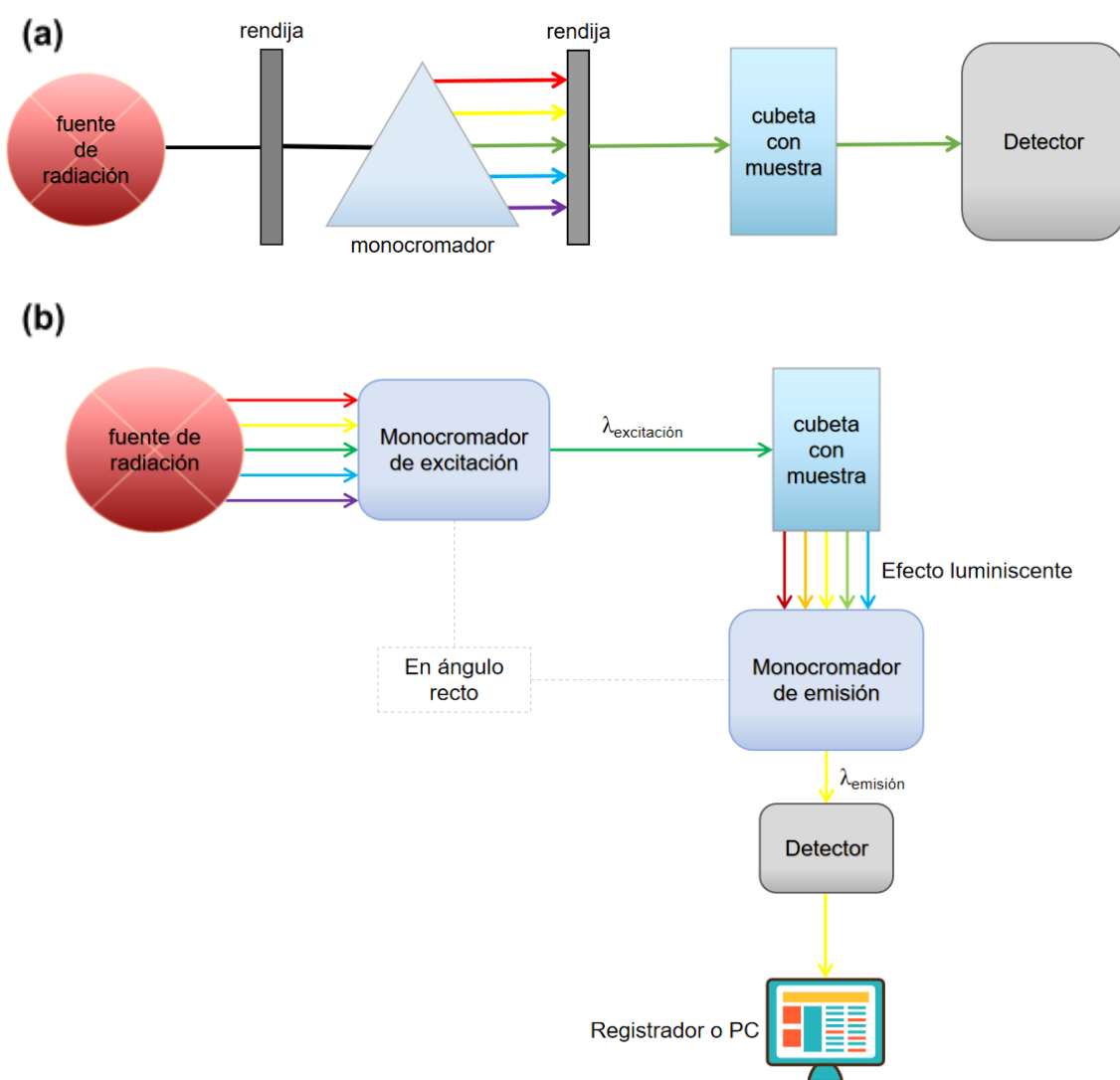


Figura 5.4. (a) Representación esquemática de un espectrofotómetro UV-Vis; (b) Representación esquemática de un espectrofluorímetro.

Los tocoferoles tienen la capacidad de absorber y emitir radiación y es por ello que podemos hacer uso de técnicas espectroscópicas para su determinación.

En la bibliografía consultada, se han encontrado pocos artículos que hayan determinado tocoferoles en cereales y frutos secos mediante una técnica espectrofotométrica, ya que se suele usar más como técnica de detección acoplada a cromatografía líquida que como técnica de determinación en sí. Además, entre las técnicas de absorción y emisión, las de emisión ofrecen una mayor sensibilidad y con un mejor límite de detección, por lo que la fluorescencia es una de las técnicas más utilizadas para la detección de estas sustancias. No obstante, se puede citar como ejemplo de aplicación de la espectroscopía UV-Vis la determinación de α -tocoferol en diferentes productos alimenticios que contienen cereales y algunos frutos secos (almendras, anacardos y pistachos) (Kumar y Kambor, 2020). También se ha utilizado para la determinación de α -, γ -, δ -tocoferol y acetato de α -tocoferol en muestras de semillas de soja y maíz (Prieto *et al.*, 1999), y se obtuvieron resultados que no diferían significativamente de los obtenidos mediante HPLC. Otros autores tampoco encontraron diferencias significativas entre un método espectrofotométrico y uno cromatográfico para la determinación de acetato de α -tocoferol en productos farmacéuticos en forma de grageas y ampollas (Tütem *et al.*, 1997). Dicen ser métodos sencillos, confiables y rápidos, además de contar con la ventaja de ser métodos muy sensibles. También hemos visto que sus resultados no difieren mucho a los que se podrían ver con métodos cromatográficos, siendo estos últimos más caros, por lo que es interesante considerar a las técnicas espectrofotométricas como opción alternativa.

Sin embargo, para cuantificar los tocoferoles y tocotrienoles en la mayoría de estas técnicas se utilizan reacciones de derivatización, como la reacción de los analitos con sales de tetrazolio (Kumar y Kambor, 2020), reacciones de oxidación-reducción, como la reducción de molibdeno (VI) a molibdeno (V) (Prieto *et al.*, 1999), o la reacción con cobre (II)-neocuproína (Tütem *et al.*, 1997). Si además tenemos en cuenta que para el tratamiento de muestras se debería de realizar una saponificación y/o extracción de los analitos, es probable que se trate de un método más lento que otros de los que disponemos, además puede ser muy susceptible de cometer errores, teniendo en cuenta la limitada selectividad del método en cuestión.

5.2.2. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

La cromatografía líquida de alto rendimiento o HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. La cromatografía líquida de ultra rendimiento o UHPLC, que se ha mencionado en uno de los artículos visitados, difiere de la HPLC en el tamaño de partículas de la fase estacionaria, siendo mucho menor en UHPLC (2 μm en lugar de 5 μm) y, en consecuencia, en la longitud y diámetro de la columna, así como la diferencia de presión a la que trabajan dichas técnicas. El tamaño de partícula se trata de un factor que afecta a la anchura del pico cromatográfico y de esta forma también a la resolución y capacidad, de modo que pueden analizarse más compuestos en menor tiempo y con un menor consumo de disolvente cuando se utiliza un tamaño de diámetro menor para la fase estacionaria. La columna cromatográfica está rellena de la fase estacionaria, que puede estar constituida de diversos materiales que ejercen gran resistencia al flujo de disolvente (fase móvil) que pasa a través de ellos, y por ello se necesita usar presiones elevadas para forzar el paso de líquido a través de la columna (alrededor de 200 atmósferas para velocidades de flujo de 0,5 a 5 mL/min, dependiendo del disolvente utilizado) (Miller, 2005).

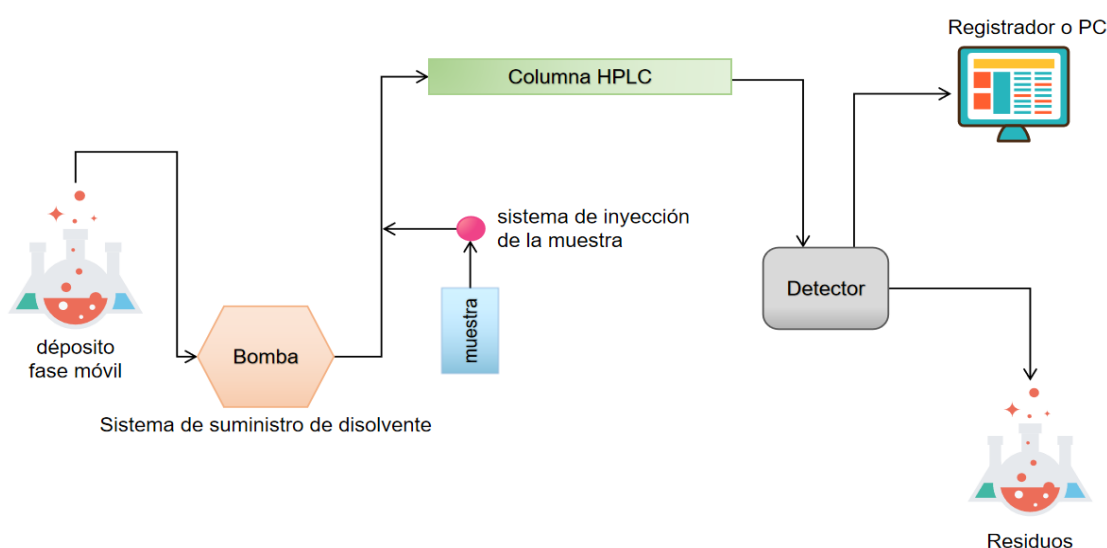


Figura 5.5. Esquema de un cromatógrafo de líquidos.

Los componentes básicos de un sistema para HPLC son (Figura 5.5): depósitos que contengan la fase móvil, desgasificador de fases móviles, un sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil, un dispositivo para la introducción de la muestra, la columna cromatográfica termostatzada, uno o varios detectores y por último, un sistema para el tratamiento de datos y registrador.

En HPLC se considera fase normal si la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar, en este caso los solutos polares serán retenidos más fuertemente que los apolares. Se denomina cromatografía en fase inversa o reversa si, por el contrario, la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar.

Otras de las cosas a destacar es el tipo de detector usado, habiendo una gran variedad de técnicas que pueden acoplarse al sistema cromatográfico. Entre la gran diversidad de técnicas usadas para la detección, se pueden distinguir técnicas electroanalíticas como la detección coulométrica (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2001, 2004) y técnicas espectroscópicas como espectrofotometría UV-Vis y espectrofluorimetría (Ryyänänen *et al.*, 2004, Panfili *et al.*, 2003, Carlucci *et al.*, 2001, Hogarty *et al.*, 1989). De entre todas ellas, teniendo en cuenta que los tocoferoles son compuestos capaces de producir luminiscencia, es decir, emiten luz, la técnica más destacable para la detección de los tocoferoles se trata de la espectrofluorimetría, más sensible que la espectrofotometría, ya que se mejora la señal y se reducen interferencias. Por otra parte, además de los detectores ya mencionados, es muy frecuente el acoplamiento a espectrometría de masas (HPLC-MS) (Arvapally *et al.*, 2021, Xie *et al.*, 2016, Bustamante-Rangel *et al.*, 2007). Al ser la HPLC una técnica separativa pero escasamente identificativa y la MS una técnica identificativa pero no separativa, su acoplamiento da lugar a una técnica con una gran aplicabilidad, separativa e identificativa.

En la tabla 5.1 se muestra una comparativa de los métodos de análisis de tocoferoles y tocotrienoles en cereales y frutos secos basados en HPLC,

detallándose los tipos de columnas, fases móviles, disolventes y tipos de detectores utilizados.

Tabla 5.1. Comparativa de métodos de análisis de tocoferoles y tocotrienoles en cereales y frutos secos mediante HPLC.

Analito	Matriz	columna	Fase móvil	Tipo de detector	t _R	t _{análisis}	Referencia
Nutrientes de clases múltiples (α-tocoferol)	Frutas, verduras y cereales	C ₁₈	Formiato de amonio 20 mM, ácido fórmico al 0,1% en agua / formiato de amonio 20 mM, ácido fórmico al 0,1% en metanol	Espectrómetro de Masas	-	13 min	Arvapally <i>et al.</i> , 2021
α-tocoferol	Trigo, arroz, arroz negro, granos de centeno, mijo y trigo sarraceno	C ₈	Metanol/agua (98:2 v/v)	Espectrómetro de masas	5-6 min	~40 min	Xie <i>et al.</i> , 2016
α-, γ-, δ-tocoferol, α-, γ-, y δ-tocotrienol	Trigo y centeno	C ₁₈	Metanol/agua (97:3 v/v)	Espectrómetro de masas	8 min	~20 min	Bustamante-Rangel <i>et al.</i> , 2007
α-, (β+γ), δ-tocoferol	Almendras, semillas de girasol, avellanas y nueces	C ₁₈	Metanol/agua (99,9:0,1 v/v)	Detección electroquímica	8 min	~40 min	Delgado-Zamarreño <i>et al.</i> , 2004
α-, γ, δ-tocoferol	Frutos secos y semillas	C ₁₈	Metanol/agua (97:3 v/v)	Detección electroquímica	12 min	35- 40 min	Delgado-Zamarreño <i>et al.</i> , 2001

α -, β -, γ - δ -tocoferol, α -, β -, γ - y δ -tocotrienol	Harina de centeno	Sílice	n-hexano/1,4-dioxano (97:3, v/v)	Fluorescencia (λ_{exc} =292nm, λ_{emi} =325nm)	5,5- 14,2 min	~40 min	Ryynänen <i>et al.</i> , 2004
α -, β -, γ - δ -tocoferol, α -, β -, γ - y δ -tocotrienol	Maíz, avena, trigo, espelta, triticales y cebada	Sílice	n- hexano / acetato de etilo / ácido acético (97,3:1,8:0,9 v/v/v)	Fluorescencia (λ_{exc} =290 nm, λ_{emi} =330 nm)	5,2 - 25 min	40-70 min	Panfili <i>et al.</i> , 2003
α -, γ - y δ -tocoferol	Brotes de malta	C ₁₈	Metanol/ agua (98: 2, v/v)	Fluorescencia (λ_{exc} =303 nm, λ_{emi} =328 nm)	6-10 min	>270 min	Carlucci <i>et al.</i> , 2001
α -, γ - y δ -tocoferol	40 productos alimenticios (algunos frutos secos)	C ₁₈	Acetonitrilo/cloruro de metileno + 0,001% de trietilamina/ metanol	Fluorescencia (λ_{exc} = 290 nm, λ_{emi} =330 nm)	-	>7 h	Hogarty <i>et al.</i> , 1989

En la tabla 5.1 se pueden observar las semejanzas y diferencias existentes entre los métodos cromatográficos más representativos de entre los encontrados en bibliografía para la determinación de tocoferoles en cereales y frutos secos. En la mayoría de los casos utilizaban columnas C₁₈ y casi la mitad usaban como fase móvil mezclas metanol:agua, en similares concentraciones, con un tiempo de análisis de entre 20 y 40 min. Con respecto al tipo de detector usado, el más común es la detección fluorimétrica, siendo también bastante usado el espectrómetro de masas y coincidiendo la detección electroquímica hasta en dos de los artículos consultados. La cromatografía en fase inversa con mezclas metanol/agua como fase móvil se ha aplicado a diversos tipos de cereales y frutos secos, así como a la determinación de distintos analitos, que van desde la determinación únicamente de α -tocoferol (Xie *et al.*, 2016), a la determinación de varios isómeros de tocoferol y tocotrienol (Bustamante-Rangel *et al.*, 2007), pasando por la determinación sólo de algunos isómeros de tocoferol (Carlucci *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en las muestras analizadas del mismo tipo de cereal son muy variables, como cabe esperar, teniendo en cuenta la influencia de múltiples factores (localización geográfica, climatología, año de la cosecha, etc) sobre el contenido en tocoferoles y tocotrienoles. Así, mientras que Bustamante-Rangel *et al.* (2007) reporta valores de α -tocoferol de 2,6 y 1,8 mg/kg para trigo y centeno, respectivamente, Xie *et al.* (2016) encontraron valores de α -tocoferol de 13,24 mg/kg en trigo, 13,12 mg/kg en centeno y 3,74 mg/kg en trigo sarraceno.

En la tabla 5.2 se muestran los resultados de dos estudios de los mismos autores en los que determinan α -, (β + γ) y δ -tocoferol en muestras de frutos secos, mediante HPLC con detección electroquímica, con la diferencia del método de pretratamiento de muestra realizado: saponificación seguida de extracción con membrana (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2001) y PLE (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2004).

Tabla 5.2. Análisis de isómeros de vitamina E en semillas y frutos secos mg/kg.

Alimento	Delgado-Zamarreño <i>et al.</i> , 2001			Delgado-Zamarreño <i>et al.</i> , 2004		
	α -T	(β + γ)-T	δ -T	α -T	(β + γ)-T	δ -T
Nueces	7,6	202	37,4	26	195	30,5
Almendras crudas	157	8,4	-	182	145	-
Almendras tostadas	190	20,1	-	223	166	-
Avellanas crudas	151	10,1	-	90	7,6	-
Avellanas tostadas	179	51,5	-	221	53,5	9
Cacahuete crudo	64,9	63,3	4,1	-	-	-
Cacahuete frito	10,1	29,8	19,1	-	-	-
Pipas de girasol crudas	258	16,2	-	269	129	-
Pipas de girasol fritas	171	17,9	-	164	20,7	-

A pesar de obtener resultados similares, podemos ver que existen algunos datos diferentes para el mismo tipo de muestra, lo cual se puede justificar por el tipo de método usado para el tratamiento de muestra, el origen de la muestra o posibles errores en el proceso de determinación. Una de las cosas más llamativas es que para determinados tipos de muestras, en ambos casos no se consigue determinar el δ -tocoferol. Esto puede deberse a que en dichas muestras concretas no se encuentre presente o estuviesen por debajo del límite de cuantificación del método.

Hogarty *et al.*, (1989) determinaron α -, γ - y δ -tocoferol en diversos productos alimenticios, incluyendo frutos secos, mediante HPLC en fase inversa con detección fluorimétrica, usando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:cloruro de metileno y 0,001% de trietilamina: metanol. Así, consiguieron determinar un contenido total de tocoferoles de hasta 114,6 mg/kg en nueces de Brasil, 23,3 mg/kg en nueces inglesas, y 213,3 mg/kg en avellanas, según el lugar de origen de la muestra (distintos proveedores).

Panfili *et al.*, (2003) utilizaron una mezcla de disolventes más apolares para la fase móvil (n-hexano/acetato de etilo/ácido acético (97,3:1,8:0,9 v/v/v)) y consiguieron separar los ocho vitámeros (α -, β -, γ - y δ -tocoferol, α -, β -, γ - y

δ-tocotrienol) en muestras de maíz, avena, trigo, espelta, triticale y cebada. En la figura 5.6 se pueden observar los cromatogramas obtenidos mediante HPLC con detección fluorimétrica para la validación del método en muestras de cebada. Se comparó el contenido de tocoferoles y tocotrienoles para distintos métodos de preparación de la muestra, obteniendo mejores resultados el uso de saponificación en caliente. Los tocoferoles y tocotrienoles totales que se consiguieron cuantificar fueron 72,1 mg/kg para avena, 56,5 mg/kg en espelta, 60,6 mg/kg en trigo duro, 74,3 mg/kg en trigo blando, 66,9 mg/kg en maíz, 74,7 mg/kg en cebada y 68,3 mg/kg para muestras de triticale.

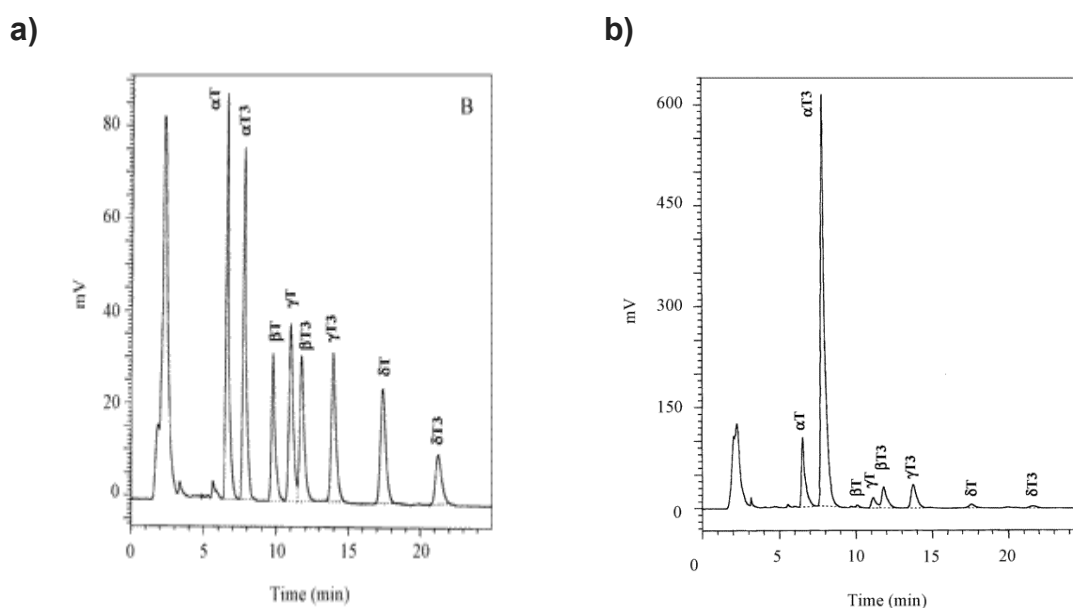


Figura 5.6. a) Cromatograma de patrones puros de tocoferoles; b) cromatograma de tocoferoles en una muestra de cebada. (Panfili *et al.*, 2003).

Como puede observarse en la tabla 5.1, la cromatografía en fase inversa se trata de la opción mayoritariamente escogida para la determinación de estos compuestos en alimentos. Con respecto al sistema cromatográfico utilizado en los métodos estandarizados recogidos en las normas UNE, las tres normas que utilizan cromatografía líquida de alta resolución coinciden en la utilización de sílice para la fase estacionaria (fase normal), así como, el uso de fluorimetría para la detección. Para la norma 9936:2016 se habla del uso de una disolución del 3,85% de tetrahidrofurano en n-heptano si utilizamos una columna de sílice y una disolución de t-butil metil éter/n-heptano 5:95 (v/v) si utilizamos una columna de diol, si buscamos una buena separación del γ-tocoferol y el

β -tocotrienol. Para la norma 6867:2000 se utiliza, como ya hemos dicho, una fase estacionaria de sílice y como fase móvil una mezcla de 1,4 dioxano y hexano 30:970. Por último, para la norma 12822:2014, utilizando como fase estacionaria gel de sílice, se utiliza de fase móvil 3% de 1,4 dioxano o 0,5% de 2-propanol, 3% de éter terc-nbutilico metílico en n-hexano o n-heptano y utilizando como fase estacionaria C_{18} se usa agua desde el 1% hasta el 10% en metanol como fase móvil. Estas normas tienen en común el tipo de fase estacionaria, y por tanto la fase en la que se trabaja, con el siguiente artículo bibliográfico que se discute, que difiere en los demás artículos revisados en este mismo aspecto: para la determinación de α -, β -, γ - δ -tocoferol, α -, β -, γ - y δ -tocotrienol en harina de centeno, se utilizó una columna de sílice y una fase móvil de n-hexano/1,4-dioxano (97:3, v/v). La separación de los analitos puede observarse en el cromatograma en la figura 5.7. La cantidad total de tocoferol y tocotrienol que se determinó fue de 28,7 mg/kg (Ryynänen et al, 2004).

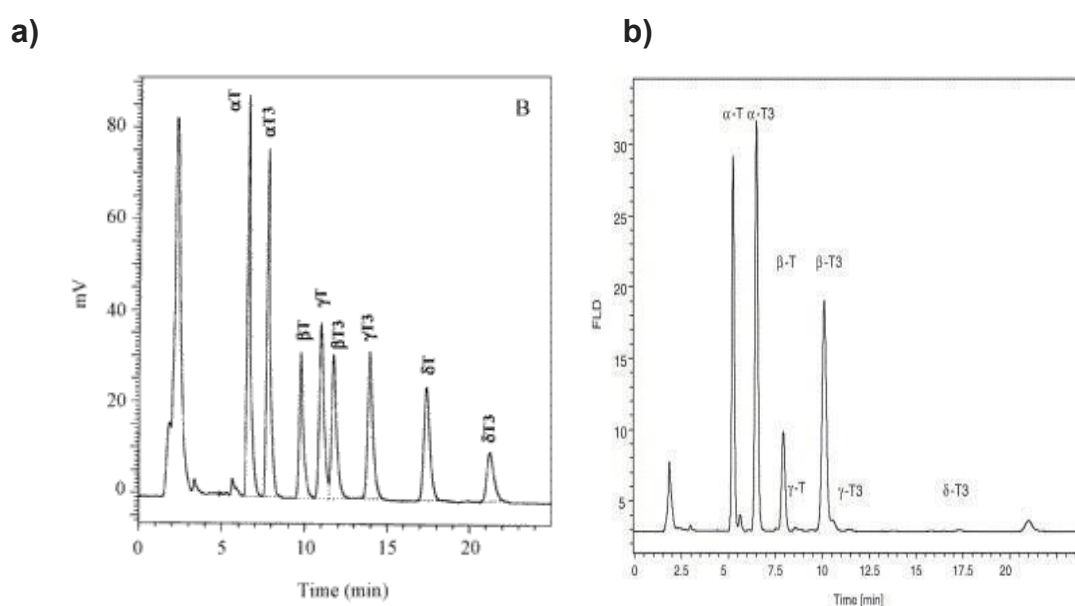


Figura 5.7. a) Cromatograma de una disolución patrón de tocoferoles (Panfili *et al.*, 2003); b) Cromatograma de HPLC de harina de centeno (Ryynänen *et al.*, 2004).

Los cromatogramas a) y b) no difieren en la fase en la que trabajan, fase normal, ambos mediante detección fluorimétrica. Sin embargo, se puede observar pequeñas diferencias con respecto al orden de elución de los analitos a lo largo del cromatograma, siendo lo más destacable que en el cromatograma b) que el pico de β - y γ -tocoferol se encuentran superpuestos por lo que se

determinan juntos, además picos como el δ -tocoferol no se consigue ver (ya sea por la propia determinación o porque la muestra no lo contiene).

Con respecto a la utilización de una cromatografía en fase inversa, es importante destacar que β - y γ -tocoferol y β - y γ -tocotrienol no pueden resolverse completamente; sin embargo, se sabe que los niveles de β -tocoferol en muestras de cereales y frutos secos suelen ser más bajos que los de γ -tocoferol (Bustamante-Rangel *et al.*, 2001, Bustamante-Rangel *et al.*, 2004). La determinación de tocoferoles se puede realizar tanto utilizando fase normal como en fase inversa (Abidi, 2000). Sin embargo, se ha estudiado que las columnas de fase inversa tienen ventajas sobre las de fase normal, como pueden ser que tengan una mayor estabilidad y durabilidad. Sin embargo, como hemos comentado, las columnas cromatográficas en fase normal son más eficaces para separar β - y γ -tocoferoles y β - y γ -tocotrienoles, y además, por los disolventes utilizados, se permite una mayor solubilidad de los lípidos (Panfili *et al.*, 2003).

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se obtienen de esta memoria son las siguientes:

Los frutos secos y, sobre todo, los cereales, son alimentos muy importantes a nivel económico y nutricional y se trata de fuentes bastante importantes de tocoferoles y tocotrienoles.

Debido a su bajo coste y demostrada eficacia, se concluye que la saponificación y posterior extracción con un disolvente es un método adecuado para el tratamiento de muestras de cereales y frutos secos. Es importante cuidar de los factores y/o condiciones de dicho proceso para optimizar al máximo la tasa de recuperación de los analitos y evitar la degradación de los mismos.

En cuanto a la técnica de análisis más utilizada por excelencia, la cromatografía líquida de alta resolución o alto rendimiento (HPLC), podemos concluir que es el método más apropiado para este tipo de determinaciones. Se trata de un método que puede ser estandarizado, no es un proceso demasiado lento y tiene límites de detección y cuantificación suficientes para la determinación de los diferentes isómeros de la vitamina E. En ese sentido, la detección espectrofluorimétrica es una muy buena herramienta para estos analitos, usándose acoplada a HPLC por la capacidad de los tocoferoles y tocotrienoles de producir luminiscencia y, en consecuencia, por los bajos límites de detección y cuantificación que se obtienen. Además, se puede optimizar el proceso de cromatografía, atendiendo a diversos factores como el tipo de matriz, analitos de interés, o disponibilidad de columnas y disolventes. Así, por ejemplo, se puede cambiar el disolvente de la fase móvil y el tipo de columna cromatográfica según la polaridad deseada, administrar la temperatura deseada y trabajar en fase normal o en fase inversa, destacando que al trabajar en HPLC de fase inversa se corre el riesgo de no cuantificar de manera correcta el β - y el γ -tocoferol.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ABIDI, S.L. (2000) "Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants", *Journal of Chromatography A*, 881 (1–2), pp. 197-216, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00131-X)
2. AHMED, M.K., DAUN, J.K., PRZYBYLSKI, R. (2005) "FT-IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 in vegetable oils", *Journal of Food Composition and Analysis*, 18 (5), pp. 359-364 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.12.008>
3. ARVAPALLY, M., ASATI, A., NAGENDIA, N.K., REDDY MUDIAM, M.K. (2021) "Development of an analytical method for the quantitative determination of multi-class nutrients in different food matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry using design of experiments”, *Food Chemistry*, 341(2) pp. 128173 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128173>.
4. AZZI, A. (2018) “Many tocopherols, one vitamin E”, *Molecular Aspects of Medicine*, 61 pp. 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.004>
 5. BARBA, F.J., ESTEVE, M.J., y FRÍGOLA, A. (2011) “Determination of vitamins E (α -, γ - and δ -tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage” *European Food Research and Technology*, 232 (5), pp. 829-836 <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1450-8>
 6. BELITZ H.D. y GROSCH, W. (1997) *Química de los Alimentos* (2nd edition), Zaragoza: Acribia
 7. BURTON, G.W. y INGOLD, K.U. (1989) “Vitamin E as in vitro and in vivo antioxidant” *Ann NY Acad Sci*, 570, pp. 7-22 <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb14904.x>
 8. BUSTAMANTE-RANGEL, M., DELGADO-ZAMARREÑO, M.M., SÁNCHEZ-PÉREZ, A., CARABIAS-MARTÍNEZ, R. (2007) “Determination of tocopherols and tocotrienols in cereals by pressurized liquid extraction–liquid chromatography–mass spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, 587, (2), pp. 216-221 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.01.049>
 9. CARLUCCI, G., MAZZEO, P., DEL GOVERNATORE, S., DI GIACOMO, G. y DEL RE, G. (2001) “Liquid chromatographic method for the analysis of tocopherols in malt sprouts with supercritical fluid extraction”, *Journal of Chromatography A*, 935, (1–2), pp. 87-91 [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01080-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01080-9)
 10. CHEN, X., ZHANG, Z. YANG, X., LI, J., LIU, Y., CHEN, H., RAO, W. y YAO, S. (2012) “Molecularly imprinted polymers based on multi-walled carbon nanotubes for selective solid-phase extraction of oleanolic acid from the

roots of kiwi fruit samples”, *Talanta*, 99(15) pp. 959-65.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.066>

11. DEAN, J.R. (1993) “Applications of Supercritical Fluids in Industrial Analysis”, Blackie Academic & Professional ISBN: 978-94-010-4951-1
12. DELGADO-ZAMARREÑO, M.M., BUSTAMANTE-RANGEL, M., SÁNCHEZ-PÉREZ, A. y HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. (2001) “Analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts with and without coupled hydrolysis by liquid chromatography and coulometric detection”, *Journal of Chromatography A*, 935 (1–2) pp. 77-86
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00991-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00991-8)
13. DELGADO-ZAMARREÑO, M.M., BUSTAMANTE-RANGEL, M., SÁNCHEZ-PÉREZ, A. y CARABIAS-MARTÍNEZ, R. (2004) “Pressurized liquid extraction prior to liquid chromatography with electrochemical detection for the analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts”, *Journal of Chromatography A*, 1056, (1–2) pp. 249-252.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.033>
14. EITSUKA, T., NAKAGAWA, K., y MIYAZAWA, T. (2006) “Down-regulation of telomerase activity in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells by tocotrienol”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348, pp. 170-175 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.029>
15. EVANS, H.M. y BISHOP, K.S. (1922) “On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction”, *Science*, 56, pp. 650-651 <https://doi.org/10.1126/science.56.1458.650>
16. FARDET, A. (2010) “New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: What is beyond fibre?” *Nutrition Research Reviews*, 23(1), pp. 65-134. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000041>

17. GUAN, F., LI, G., LIU, A.B., LEE, M.J., YANG, Z., CHEN, Y.K., LIN, Y., SHIH, W. y YANG, C.S. (2012) "Delta- and gamma-tocopherols, but not alpha-tocopherol, inhibit colon carcinogenesis in azoxymethane-treated F344 rats" *Cancer Prev. Res.*, 5 (4), pp. 644-654
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0521>
18. GYSIN, R., AZZI, A. y VISARIUS, T. (2002) "Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins", *The FASEB Journal*, 16 (14), pp. 1952-1954
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0362fje>
19. HE, L., MO, H., HADISUSILO, S., QURESHI, A.A. y ELSON, C.E. (1997) "Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo", *Journal of Nutrition*, 127, pp. 668-674
<https://doi.org/10.1093/jn/127.5.668>
20. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, L. (2002): *Introducción al análisis instrumental*. Ed. Barcelona: Ariel
21. HOGARTY, C.J., ANG, C., EITENMILLER, R.R. (1989) "Tocopherol content of selected foods by HPLC/fluorescence quantitation", *Journal of Food Composition and Analysis*, 2(3), pp. 200-209
[https://doi.org/10.1016/0889-1575\(89\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0889-1575(89)90017-3)
22. JIANG, Q. y AMES, B.N. (2003) "Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats", *The FASEB Journal*, 17(8), pp. 816-822
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0877com>
23. KUMAR, A. y KAMBOJ, M. (2021) "Colorimetric quantification of α -tocopherol (vitamin E) in pure form and different comestible samples by using newly synthesized tetrazolium salts", *J Iran Chem Soc*, 18, pp. 429–443 <https://doi.org/10.1007/s13738-020-02038-2>

24. LEVÊQUES, A., OBERSON, J.M., TISSOT, E.A., REDEUIL, K., THAKKAR, S.K., CAMPOS-GIMÉNEZ, E. (2019) "Quantification of Vitamins A, E, and K and Carotenoids in Submilliliter Volumes of Human Milk", *Journal of AOAC International*, 102(4), pp. 1059-1068
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0016>

25. LI, G.X., LEE, M.J., LIU, A.B., YANG, Z., LIN, Y., SHIH W.J. y YANG, C.S. (2011) "Delta-tocopherol is more active than alpha - or gamma -tocopherol in inhibiting lung tumorigenesis in vivo" *Cancer Prev. Res.*, 4(3) pp. 404-413
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.capr-10-0130>

26. LU, D., YANG, Y., WU, X., ZENG, L., LI, Y.X., y SUN, C.J. (2015) "Simultaneous determination of eight vitamin E isomers and α -tocopherol acetate in functional foods and nutritional supplements by gas chromatography – mass spectrometry", *Anal. Methods*, 7, pp. 3353-3362 <https://doi.org/10.1039/c4ay02854f>

27. LU, D., YANG, Y., SUN, C. y WANG, S. (2019) "Determination of tocopherols and tocotrienols in cereals and nuts by dispersive solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry", *Analytical Methods*, 42, pp. 5439–5446 <https://doi.org/10.1039/C9AY01634A>

28. MARTIN-NIZARD, F., BOULLIER, A., FRUCHAR, J.C. y DURIEZ, P. (1998) "Alpha-tocopherol but not beta-tocopherol inhibits thrombin-induced PKC activation and endothelin secretion in endothelial cells" *J. Cardiovasc. risk*, 5(5–6), pp. 339-345
<https://doi.org/10.1097/00043798-199810000-00010>

29. MILLER, J. M. (2005): *Cromatography: concepts and contrast* (2nd edition), Ed. Hoboken, N.J. :John Wiley

30. MIYAZAWA, T., NAKAGAWA, K. y SOOKWONG, P. (2011) "Health benefits of vitamin E in grains, cereals and green vegetables", *Trends in Food*

31. MÜLLER, L., THEILE, K. y BÖHM, V. (2010) "In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma", *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, pp. 731-742 <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900399>
32. NESARETNAM, K., KHOR, H.T., GANESON, J., CHONG, Y.H., SUNDRAM, K. y GAPOR, A. (1992) "The effect of vitamin E tocotrienols from palm oil on chemically induced mammary carcinogenesis in female rats", *Nutrition Research*, 12, pp. 879-892 [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(05\)80645-1](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(05)80645-1)
33. NGAH, W.Z., JARIEN, Z., SAN, M.M., MARZUKI, A., TOP, G.M. y SHAMAAN, N.A. (1991) "Effect of tocotrienols on hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene in rats" *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, pp. 1076S-1081S <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.4.1076S>
34. NIKI, E., KAWAKAMI, A., SATIO, M., YAMAMOTO, Y., TSUCHIYA, J. y KAMIYA, Y. (1985) "Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity", *J Biol Chem*, 260, pp. 2191-2196 [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)89536-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)89536-9)
35. NUS, M., RUPERTO, M. y SÁNCHEZ-MÚNIZ, F. J. (2004) "Frutos secos y riesgo cardio y cerebrovascular. Una perspectiva española", *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), pp. 137-148
36. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (2021) Producciones Agrícolas: cultivos herbáceos e industriales. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/cereales/>
37. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (2021) Producciones Agrícolas: frutas y hortalizas.

https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/frutas-y-hortalizas/Informacion_subsectorial.aspx

38. PANFILI, G., FRATIANNI, A. y IRANO, M. (2003) "Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), pp.3940-3944 <https://doi.org/10.1021/jf030009v>
39. PRIETO, P., PINEDA, M. y AGUILAR, M. (1999) "Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E", *Analytical Biochemistry*, 269(2), pp. 337-341 <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
40. PRIMO YÚFERA, E. (1998) *Química de los alimentos*. Ed. Síntesis, Madrid.
41. NOEL-ROBLEDO, S., LOURDES-ZACHETTI V.G., ZON, M.A.y FERNÁNDEZ, H. (2013) "Quantitative determination of tocopherols in edible vegetable oils using electrochemical ultra-microsensors combined with chemometric tools", *Talanta*, 116, pp. 964-971 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.008>
42. ÖZDEMİR, I.S., DAG, Ç., ÖZINANÇ, G., SUÇSORAN, O., ERTAS, E. y BEKIROĞLU, S. (2018) "Quantification of sterols and fatty acids of extra virgin olive oils by FT-NIR spectroscopy and multivariate statistical analyses", *LWT*, 91, pp. 125-132, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.045>
43. QURESHI, A.A., QURESHI, N., WRIGHT, J.J.K. y BRACE, L.D. (1991) "Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee)" *Am J Clin Nutr*, 53, pp. 1021S-1026S <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.4.1021S>
44. RYYNÄNEN, M., LAMPI, A.M., SALO-VÄÄNÄNEN, P., OLLILAINEN, V. y PIIRONEN, V. (2004) "A small-scale sample preparation method with HPLC

- analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(6), pp. 749-765
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.09.014>
45. SILVA, S.D., ROSA, N.F., FERREIRA, A.E., BOAS, L.V. y BRONCE, M.R. (2009) “Rapid Determination of α -Tocopherol in Vegetable Oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy”. *Food Anal. Methods*, 120(2)
<https://doi.org/10.1007/s12161-008-9047-y>
 46. SINGH, U. y JIALAL, I. (2004) “Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1031, pp. 195-203
<https://doi.org/10.1196/annals.1331.019>
 47. SMOLAREK, A.K., SO, J.Y., BURGESS, B., KONG, A.N., REUHL, K., LIN, Y., SHIH, W.J., LI, G., LEE, M.J., CHEN, Y.K., YANG, C.S. y SUH, N. (2012) “Dietary administration of delta- and gamma-tocopherol inhibits tumorigenesis in the animal model of estrogen receptor-positive, but not HER-2 breast cancer”, *Cancer Prev. Res.*, 5 (11), pp. 1310-1320
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.capr-12-0263>
 48. SOOKWONG, P., NAKAGAWA, K., YAMAGUCHI, Y., MIYAZAWA, T., KATO, S. y KIMURA, F. (2010) “Tocotrienol distribution in foods: estimation of daily tocotrienol intake of Japanese population”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), pp. 33500-3355.
<https://doi.org/10.1021/jf903663k>
 49. SRIVASTAVA, J.K. y GUPTA, S. (2006) “Tocotrienol-rich fraction of palm oil induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in human prostate cancer cells” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346, pp. 447-453
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.147>
 50. THERIAULT, A., CHAO, J., WANG, Q., GAPOR, A. y ADELI, K.(1999) “Tocotrienol: a review of its therapeutic potential”, *Clinical Biochemistry*, 32(5), pp. 309-319. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(99\)00027-2](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00027-2)

51. TÜTEM, E., APAK, R., GÜNAYDI, E. y SÖZGEN, K. (1997) "Spectrophotometric determination of vitamin E (α -tocopherol) using copper(II)-neocuproine reagent", *Talanta*, 44(2), pp. 249-255
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(96\)02041-3](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(96)02041-3)
52. UNE 55073:1981 Materias grasas. Determinación de tocoferoles en grasas comestibles.
53. UNE-EN ISO 6867:2001 Alimentos para animales. Determinación del contenido de vitamina E. Método por cromatografía líquida de alta resolución.
54. UNE-EN 12822:2014 Productos alimenticios. Determinación de vitamina E mediante cromatografía líquida de alta resolución. Medición de los tocoferoles alfa-, beta-, gamma- y delta.
55. UNE-EN ISO 9936:2016 Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación de los contenidos de tocoferol y tocotrienol mediante cromatografía líquida de alta resolución.
56. VALLEJO, A. (2011) "El poder de los cereales Integrales", *Fitoterapia Holística*, 1, pp. 14-18
57. WADE, L.G. JR. (2012) *Química Orgánica, Volumen 2*, (7th edition), México, Ed. Pearson Educación de México, S.A. de C.V. 1205.
58. WAGNER, J.G., BIRMINGHAM, N.P., JACKSON-HUMBLES, D., JIANG, Q., HARKEMA, J.R. y PEDEN, D.B. (2014) "Supplementation with gamma-tocopherol attenuates endotoxin-induced airway neutrophil and mucous cell responses in rats" *Free Radic. Biol. Med.*, 68, pp. 101-109
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.024>

59. WANG, H., HONG, J., YANG, C.S. (2016) "delta-Tocopherol inhibits receptor tyrosine kinase-induced AKT activation in prostate cancer cells", *Mol. Carcinog.*, 55 (11), pp. 1728-1738 <https://doi.org/10.1002/mc.22422>

60. WU, D. y MEYDANI, S.N. (2014) "Age-associated changes in immune function: impact of vitamin E intervention and the underlying mechanisms" *Endocr. Metabolic Immune Disord. drug targets*, 14 (4), pp. 283-289 <https://doi.org/10.2174/1871530314666140922143950>

61. YU, W., PARK, S.K., JIA, L., TIWARY, R., SCOTT, W.W., LI, J., WANG, P., SIMMONS-MENCHACA, M., SANDERS, B.G. y KLINE, K. (2008) "RRR-gamma-tocopherol induces human breast cancer cells to undergo apoptosis via death receptor 5 (DR5)-mediated apoptotic signaling", *Cancer Lett.*, 259(2), pp. 165-176 <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.10.008>

62. YU, W., SIMMONS-MENCHACA, M., GAPOR, A., SANDERS, B.G. y KLINE, K. (1999) "Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols", *Nutrition and Cancer*, 33, pp. 26-32 <https://doi.org/10.1080/01635589909514744>

63. XIE, Q., SUN, D., CAO, J., JIA, L., HOU, B. y LI, D. (2016) "Determination of α -tocopherol in cereal grains by use of saponification coupled with ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction before high-performance liquid chromatography-mass spectrometry", *Analytical Methods* 8(26), pp. 5283-5287 <https://doi.org/10.1039/C6AY01112H>

64. XU, M., LIU, K., SWAROOP, M., PORTER, F.D., SIDHU, R., FIRNKES, S., O RY, D.S., MARUGAN, J.J., XIAO, J., SOUTHALL, N., PAVAN, W.J., DAVIDSON, C., WALKLEY, S.U., REMALEY, A.T., BAXA, U., SUN, W., MCKEW, J., C., AUSTIN, C.P. y ZHENG, W. (2012) "Delta-Tocopherol reduces lipid accumulation in Niemann-Pick type C1 and Wolman cholesterol storage disorders", *J. Biol. Chem.*, 287(47), pp. 39349-39360 <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.357707>

65. XU, X., ZHANG, M., WANG, L., ZHANG, S., LIU, M., LONG, N., QI, X., CUI, Z. y ZHANG, L. (2016) "Determination of Rhodamine B in Food Using Ionic Liquid–Coated Multiwalled Carbon Nanotube–Based Ultrasound-Assisted Dispersive Solid-Phase Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography", *Food Anal. Methods* 9, pp. 1696–1705
<https://doi.org/10.1007/s12161-015-0345-x>