



# **Obtención de aceites comestibles a partir de nuevas semillas de girasol enriquecidas en fitoesteroles**

---

**TESIS DOCTORAL**

**AÍDA GARCÍA GONZÁLEZ**  
SEVILLA, 2019



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>LA SEMILLA DE GIRASOL</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2</b>	<b>FITOESTEROLES</b> .....	<b>5</b>
1.2.1	Estructura química.....	5
1.2.2	Fitoesteroles en aceites .....	9
1.2.3	Análisis de compuestos esterólicos .....	11
1.2.4	Productos enriquecidos con fitoesteroles.....	14
<b>1.3</b>	<b>EL ACEITE DE GIRASOL</b> .....	<b>19</b>
1.3.1	Componentes mayoritarios .....	19
1.3.2	Componentes minoritarios: Fitoesteroles .....	23
1.3.3	Otros componentes minoritarios .....	26
1.3.4	Elementos metálicos .....	29
1.3.5	Requisitos exigidos por la Reglamentación vigente .....	29
<b>1.4</b>	<b>OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE ACEITE DE GIRASOL</b> .....	<b>35</b>
1.4.1	Preparación de la semilla.....	35
1.4.2	Extracción de aceite.....	37
1.4.3	Refinación de aceite.....	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS DEL TRABAJO</b> .....	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>REACTIVOS Y MUESTRAS</b> .....	<b>53</b>
3.1.1	Reactivos .....	53
3.1.2	Patrones cromatográficos.....	53
3.1.3	Muestras .....	54
<b>3.2</b>	<b>EXTRACCIÓN DE ACEITE</b> .....	<b>57</b>
3.2.1	Extracción por presión.....	57
3.2.2	Extracción con disolvente .....	59
<b>3.3</b>	<b>REFINACIÓN DE ACEITES</b> .....	<b>62</b>
3.3.1	Refinación física .....	62
3.3.2	Refinación química .....	62
<b>3.4</b>	<b>DETERMINACIONES ANALÍTICAS</b> .....	<b>66</b>
3.4.1	Humedad y materias volátiles en semillas.....	66
3.4.2	Materia grasa en semillas oleaginosas.....	66

3.4.3	Acidez libre _____	67
3.4.4	Composición de ácidos grasos _____	68
3.4.5	Composición y contenido total de fitoesteroles _____	69
3.4.6	Contenido de tocoferoles _____	74
3.4.7	Clorofilas _____	74
3.4.8	Compuestos volátiles _____	75
3.4.9	Elementos metálicos y otros elementos _____	76
<b>3.5</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>79</b>
3.5.1	Nueva metodología analítica _____	79
3.5.2	Influencia del proceso de extracción _____	79
3.5.3	Influencia del proceso de refinación _____	81
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>NUEVA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA UNA DETERMINACIÓN MÁS RÁPIDA DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y FITOESTEROLES EN ACEITES DE SEMILLAS.....</b>	<b>85</b>
4.1.1	Desarrollo y optimización de la preparación de la muestra _____	85
4.1.2	Optimización de condiciones cromatográficas en el análisis de fitoesteroles _____	89
4.1.3	Validación del método propuesto _____	92
<b>4.2</b>	<b>INFLUENCIA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN.....</b>	<b>97</b>
4.2.1	Rendimiento graso _____	97
4.2.2	Acidez _____	100
4.2.3	Composición de ácidos grasos _____	100
4.2.4	Tocoferoles _____	112
4.2.5	Elementos metálicos y otros elementos _____	113
4.2.6	Comparación con el Codex Alimentarius para <i>aceites vírgenes</i> _____	116
4.2.7	Volátiles _____	119
<b>4.3</b>	<b>INFLUENCIA DEL PROCESO DE REFINACIÓN .....</b>	<b>127</b>
4.3.1	Selección del proceso _____	127
4.3.2	Refinación Física _____	133
4.3.3	Refinación Química _____	137
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>149</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>153</b>

## **RESUMEN**

La calidad e inocuidad son temas centrales en la economía alimentaria actual por estar vinculada a la elección de alimentos. La rápida e intensa introducción en el mercado español de productos enriquecidos y fortificados hace que sea esencial disponer de información referente de estos alimentos en nuestro país.

Por ello, en este trabajo se ha evaluado el impacto del enriquecimiento de fitoesteroles en la semilla de girasol sobre el aceite obtenido. Los estudios de la composición química del aceite de girasol producido por semillas mejoradas genéticamente y sus características organolépticas, junto con la demanda por los aceites vírgenes de semillas, hacen que tanto productores como consumidores demanden una normativa que regule los estándares de calidad de estos productos. El Codex Alimentarius (2015) exige que el color, olor y sabor sean el característico del aceite designado y éste debe estar exento de olores y sabores extraños o rancios. No se ha establecido hasta el momento, de forma objetiva, esta caracterización para aceites de semillas en general, ni para aceites vírgenes de girasol en particular.

La producción de aceites vírgenes de girasol permitiría, en principio, la obtención de aceites de mayor calidad, ya que en el proceso de refinación se pierden muchos compuestos de interés nutricional. Sin embargo, para garantizar un mercado a estos nuevos alimentos se requiere un estudio en profundidad de sus características, principalmente de su perfil organoléptico, además de su composición, estabilidad y aplicabilidad.

Esta Tesis forma parte de un proyecto de investigación financiado por la Junta de Andalucía, con referencia P12-AGR-1837, a partir del cual se han desarrollado mediante selección de líneas derivadas de mutagénesis y cruzamientos nuevas semillas de girasol con alto contenido en fitoesteroles totales y elevadas concentraciones de Campesterol, Estigmasterol y  $\Delta^7$ -Estigmastenol, respectivamente.

El principal objetivo del presente trabajo ha consistido en la obtención y caracterización de aceites a partir de estas semillas modificadas para establecer las mejores condiciones de extracción y refinación que permitan obtener un aceite comestible con el máximo contenido final de fitoesteroles. La mayor dificultad encontrada para su desarrollo ha sido el escaso número de muestras facilitadas debido a la dificultad en el cultivo.



## **1 INTRODUCCIÓN**

---

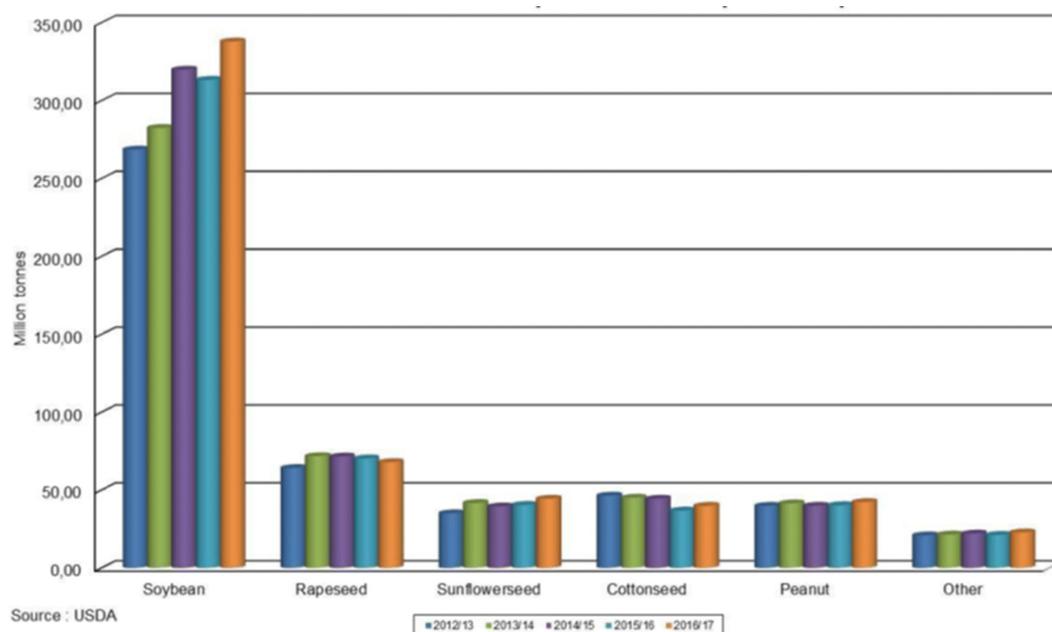


## 1.1 LA SEMILLA DE GIRASOL

El girasol (*Helianthus annuus*) es una planta herbácea de la familia de las Asteráceas originaria de Norteamérica. Se introdujo en Europa en el Siglo XVI como flor ornamental y no fue considerada oleaginosa hasta el siglo XVIII. El cultivo se expandió por Rusia llegando a ser el primer productor mundial.

Actualmente, de la producción global de semillas oleaginosas (431 millones de toneladas en 2017/18), la semilla de girasol representa un 9%, ocupando la tercera posición en la producción mundial después de la soja y la colza. La Figura 1 ilustra la producción mundial de semillas de girasol en los diez últimos años.

Según la encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos de España (ESYRCE), la superficie de siembra de girasol en nuestro país se sitúa en 695.393 ha en 2018.



**Figura 1.-** Producción mundial de semillas oleaginosas (miles de toneladas). (USDA) (European Commission, 2017).

Las semillas de girasol pueden contener entre 44 y 47% de riqueza grasa, por lo que su cultivo es de gran interés no sólo desde el punto de vista de la producción de aceite a gran escala obtenido con disolvente, sino también de aceites vírgenes mediante prensas en plantas industriales de pequeño o mediano tamaño. El porcentaje de aceite obtenido en prensa es de un 70-85% y éste se caracteriza por ser un aceite virgen de alta calidad (Rass, 2008).

La mejora genética de las semillas de girasol ha hecho posible que existan en el mercado aceites de girasol modificados en sus ácidos grasos, como por ejemplo, con alto contenido en oleico, llegando a alcanzar valores del 90% del contenido total de ácidos grasos, o en el ácido esteárico (Anushree *et al.*, 2017), lo que le confiere mejor estabilidad oxidativa y un efecto hipocolesterolémico (Zambelli *et al.*, 2015).

El contenido de los componentes minoritarios en el aceite de girasol va a influir en las propiedades de éste. Otras modificaciones genéticas afectan a este tipo de componentes, como el aumento de  $\gamma$ -tocoferol (>95%) (Velasco *et al.*, 2004). Así, los tocoferoles y fitoesteroles tendrán un impacto positivo en sus propiedades físico-químicas y nutricionales, mientras que los fosfolípidos, ácidos grasos y ceras tendrán un impacto negativo en la calidad y estabilidad del mismo (Velasco & Ruiz-Méndez, 2015).

Por tanto, los procedimientos de extracción del aceite deberían estar enfocados en extraer el máximo contenido posible de estos componentes beneficiosos, y los de refinación, donde se pierden en un alto porcentaje, en mantenerlos.

## 1.2 FITOESTEROLES

### 1.2.1 Estructura química

Al igual que el colesterol en los animales, los fitoesteroles son constituyentes esenciales de las membranas celulares en plantas, responsables de diferentes funciones, entre las que destacan su papel en la regulación de la fluidez y permeabilidad de membrana (Trautwein & Demonty, 2007). Con estructura similar al colesterol, los fitoesteroles son alcoholes derivados del ciclopentano-perhidrofenantreno o esterano. Su estructura básica, como se muestra en la Figura 2, consta de un anillo tetracíclico unido por el carbono C17 a una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono (Hartmann, 1998). Poseen un grupo hidroxilo en el carbono C3 y la mayoría tienen un doble enlace entre los carbonos C5 y C6 y, por lo tanto, se denominan  $\Delta^5$ -esteroles. Otros grupos de fitoesteroles comunes son los  $\Delta^7$ -esteroles, con un doble enlace entre los carbonos C7 y C8, y los  $\Delta^{5,22}$ -esteroles con dobles enlaces entre los carbonos C5 y C6 y también entre C22 y C23. A los fitoesteroles saturados sin dobles enlaces en su estructura se denominan fitoestanoles. Éstos se encuentran de forma natural en cantidades mucho más pequeñas que los fitoesteroles (Moreau *et al.*, 2002).

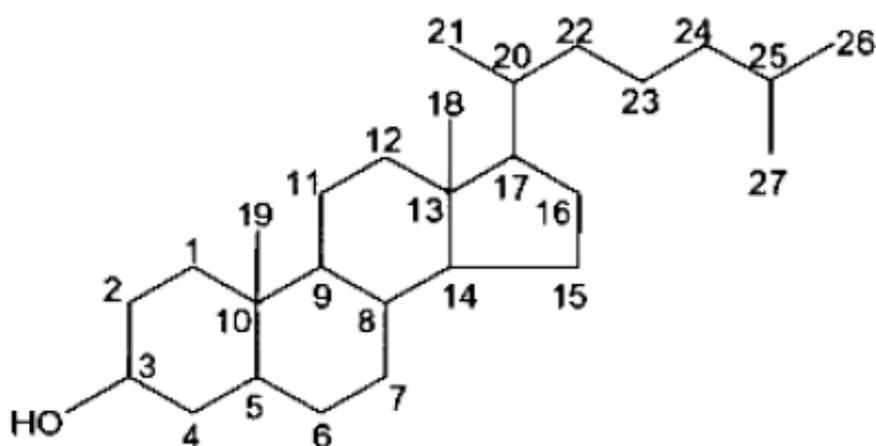
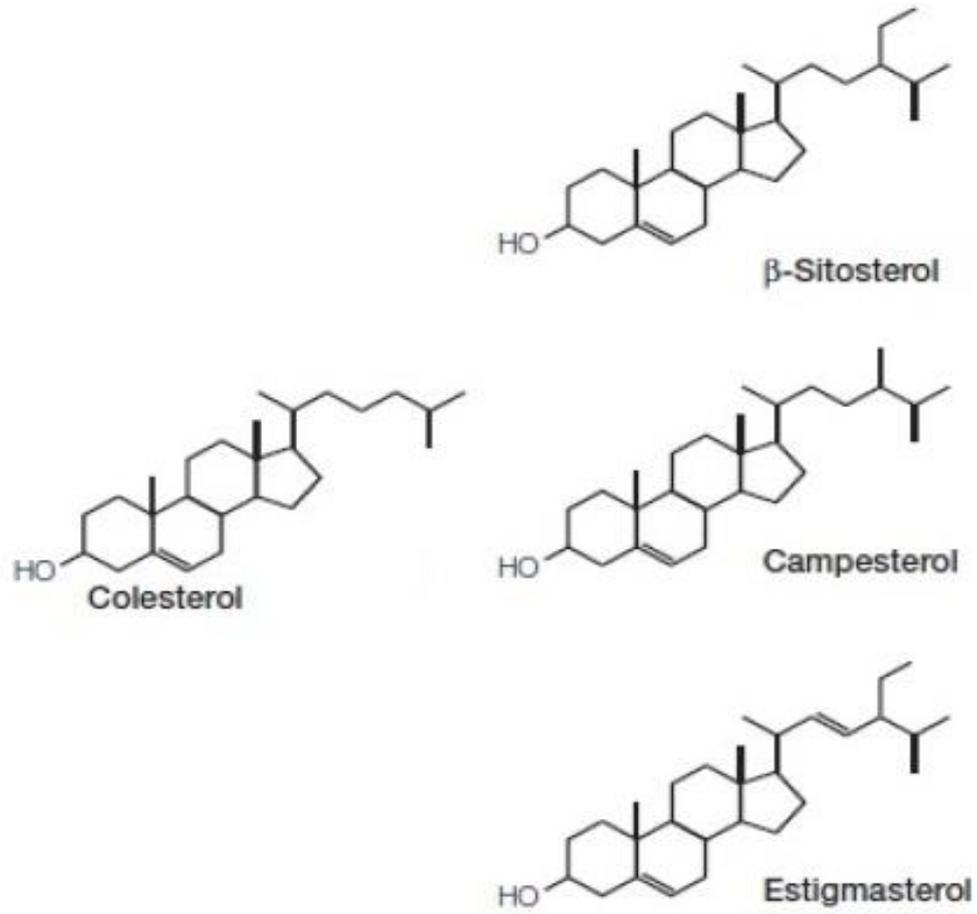


Figura 2.- Estructura química de los fitoesteroles.

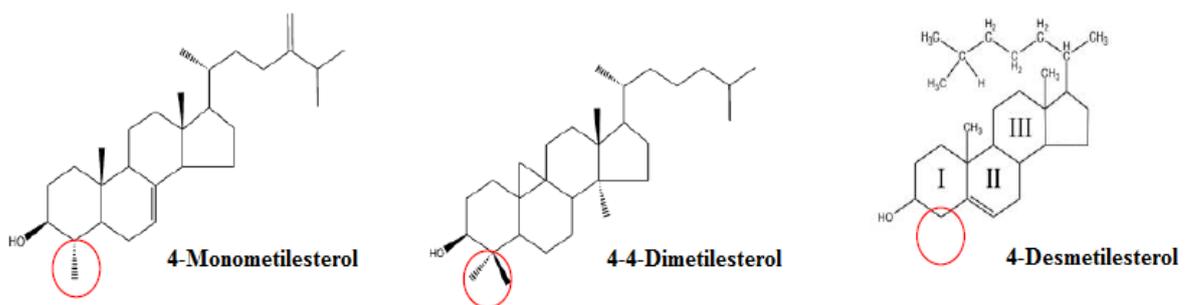
Se han descrito más de 200 tipos de esteroides en diferentes especies de plantas (Lagarda *et al.*, 2006). Los más abundantes son el  $\beta$ -Sitosterol ( $24\alpha$ -etilcolest-5en-3 $\beta$ -ol), Campesterol ( $24\alpha$ -metilcolest-5en-3 $\beta$ -ol) y Estigmasterol ( $5,24\alpha$ -etilcolest-5,22-en-3 $\beta$ -ol) (Piironen & Lampi, 2004). Estos fitoesteroides representan aproximadamente el 45-90%, 30% y 25%, respectivamente (Lutjohann, 2004; Wooddgate *et al.*, 2006; FAO, 2008). Poseen funcionalidad para la propia planta, así el Estigmasterol y el Sitosterol participan en el crecimiento embrionario (Schrack *et al.*, 2002; Schaller, 2004; Dufourc, 2008).

Las estructuras de los fitoesteroides más abundantes se muestran en la Figura 3, en la que puede observarse que la principal diferencia con el colesterol consiste en la existencia de un grupo metilo o etilo en el carbono C24. Ello implica una mayor complejidad estructural debido a que la adición de grupos alquilo en la cadena lateral da lugar a la existencia de carbonos asimétricos y, por tanto, a diferentes estructuras esteroisoméricas.

Por otra parte, a diferencia del colesterol, la estructura de los esteroides vegetales puede incluir grupos metilo en su carbono 4, dando lugar a tres subclases (Figura 4): los 4,4-dimetilesteroides, que contienen dos grupos metilo, los 4-monometilesteroides, que poseen un grupo metilo, y los 4-desmetilesteroides, que no contienen grupos metilo adicionales (Herchi *et al.*, 2009). Las dos primeras subclases corresponden a intermediarios en la síntesis de los esteroides, siendo los 4-desmetilesteroides los que se encuentran en las plantas oleaginosas en cantidades sustanciales.



**Figura 3.-** Estructuras de los esteroides mayoritarios.

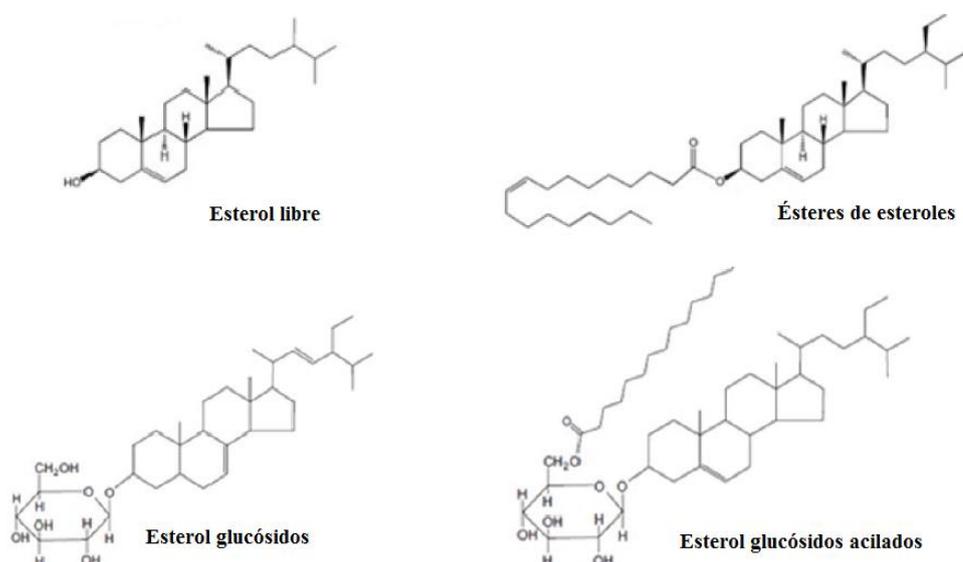


**Figura 4.-** Estructuras de las subclases de esteroides.

Además, como se muestra en la Figura 5, los fitoesteroles se encuentran en la naturaleza en forma libre o conjugada. Así, el grupo hidroxilo del esteroles puede estar esterificado con un ácido graso dando lugar a los ésteres de esterole, también puede estar glicosilado con una hexosa constituyendo el grupo de los esterol-glucósidos y estos últimos, a su vez, pueden estar esterificados con ácidos grasos en el carbono 6 de la hexosa como es el caso de los esterol-glucósidos acilados (Moreau *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2002).

Los ésteres de esterole constituyen una fracción muy importante de los fitoesterole, alcanzando niveles que pueden oscilar del 30 al 45% de esterole totales, como en el aceite de girasol, o incluso más del 70% en los aceites de maíz y salvado de arroz (Kochhar, 1983).

Los ésteres del ácido ferúlico ( $\gamma$ -orizanol) también aparecen en cantidades apreciables en numerosos alimentos, como en el arroz y sus derivados (Sahu *et al.*, 2018), mientras que los esterole glicosilados son minoritarios en la mayoría de alimentos, salvo algunas excepciones, ya que pueden constituir más del 80% del total de esterole en la patata (Jonker *et al.*, 1985).



**Figura 5.-** Principales grupos de los esterole vegetales.

### 1.2.2 Fitoesteroles en aceites

Los aceites vegetales (maíz, soja, girasol y canola) son las fuentes naturales más ricas de fitoesteroles, seguidos de frutos secos y legumbres (Piironen *et al.*, 2000). Sin embargo, si consideramos su frecuencia de consumo, las principales fuentes de fitoesteroles pueden ser las verduras y frutas, seguida de legumbres y cereales (García-Llatas *et al.*, 2015).

El contenido en fitoesteroles de las semillas y frutos oleaginosos es muy variable y determina en parte el contenido en sus correspondientes aceites (Verleyen *et al.*, 2002a). Se ha comprobado tanto en las plantas como en los aceites, que la concentración y composición de esteroides varía atendiendo a distintos factores como los agronómicos, variedad, medioambientales (Roche *et al.*, 2006, 2010; Ayerdi Gotor *et al.*, 2015), factores geográficos (Vlahakis & Hazebroek, 2000) y procesos industriales de extracción y refinación (Ferrari *et al.*, 1997; Piironen *et al.*, 2000; Phillips *et al.*; 2002; Zlatanov *et al.* 2009; Sujith Kumar *et al.* 2017; Ferdosh *et al.* 2018).

En la Tabla 1 se presenta el contenido de fitoesteroles de los principales aceites y grasas, donde pueden observarse las grandes diferencias que existen tanto en su contenido total como en su composición. El  $\beta$ -Sitosterol y el Campesterol son los fitoesteroles más comunes de los aceites vegetales y los mejores aliados para reducir los niveles de colesterol debido a su semejanza con la estructura química del colesterol (Brufau *et al.*, 2008).

Es importante tener en cuenta que los aceites vegetales también contienen pequeñas cantidades de colesterol, generalmente no más de 30-50 mg/kg (Behrman & Gopalan, 2005). Sin embargo, el aceite de girasol apenas contiene colesterol (Behrman & Gopalan, 2005; Schwartz *et al.* 2008).

**Tabla 1.-** Contenido medio en fitosteroles totales (mg/kg) y concentración de los principales fitosteroles (%) en aceites vegetales no refinados (adaptado de Padley *et al.*, 1994).

	<b>Total</b>	<b>Camp</b>	<b>Estig</b>	<b><math>\beta</math>-Sito</b>	<b><math>\Delta</math>5-Av</b>	<b><math>\Delta</math>7-Est</b>	<b><math>\Delta</math>7-Av</b>	<b>Bras</b>	<b>Otros</b>
Maíz	11700	23,0	6,0	66,0	4,0	1,0	0,0	0,0	0,0
Algodón	4260	4,0	0,9	93,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Oliva	1440	2,0	0,7	91,0	2,1	4,2	0,0	0,0	0,0
Palma	2530	14,2	7,9	74,7	2,0	1,2	0,0	0,0	0,0
Colza	6120	25,0	0,0	58,0	2,0	5,0	0,0	10,0	0,0
Cártamo	3480	12,9	8,9	52,0	1,1	20,2	2,9	0,0	2,0
Soja	3610	20,0	19,9	52,9	3,0	3,1	1,1	0,0	0,0
<b>Girasol</b>	<b>3910</b>	<b>7,9</b>	<b>7,7</b>	<b>60,1</b>	<b>4,1</b>	<b>15,1</b>	<b>4,1</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>

Camp, Campesterol; Estig, Estigmasterol;  $\beta$ -Sito,  $\beta$ -Sitosterol;  $\Delta$ 5-Av,  $\Delta$ 5-Avenasterol;  $\Delta$ 7-Est,  $\Delta$ 7-Estigmastenol;  $\Delta$ 7-Av,  $\Delta$ 7-Avenasterol; Bras, Brasicasterol.

### 1.2.3 Análisis de compuestos esterólicos

La determinación cuantitativa de estos compuestos en vegetales se ha abordado desde hace décadas. Moreau *et al.* (2002), Lagarda *et al.* (2006) y Ferdosh *et al.* (2018) han realizado excelentes revisiones sobre este aspecto. A continuación, se presenta un breve resumen de las técnicas de extracción, separación y análisis de estos compuestos.

#### - Extracción de fitoesteroles

Los métodos comunes de extracción de lípidos, extraen también los fitoesteroles. Los disolventes no polares, como el hexano, extraen de forma cuantitativa los ésteres de esteroides y la mayor parte de los esteroides libres (Moreau *et al.*, 2002; Read & Bacic, 2002). Los esteroides-glucósidos y esteroides-glucósidos acilados se extraen con hexano en muy baja proporción, aumentando el porcentaje de extracción conforme aumenta la polaridad del disolvente (Moreau *et al.*, 2003). El procedimiento más habitual de extracción de esteroides-glucósidos y esteroides-glucósidos acilados es el método de Folch (1957), que utiliza una mezcla de cloroformo-metanol, posteriormente modificado por Bligh & Dyer (1959). El tejido vegetal seco y molido se extrae a temperaturas menores de 40°C, con un volumen suficiente de una mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v). En esta extracción se obtienen todos los compuestos liposolubles tales como esteroides, triacilglicerol, terpenoides, ácidos grasos y otros. Sin embargo, aún quedarían esteroides ligados en el sólido residual, que sería necesario hidrolizar para liberarlos y poderlos analizar como esteroides libres.

La hidrólisis alcalina rompe el enlace éster tanto de los ésteres de esteroides como de los esteroides-glucósidos acilados, mientras que la hidrólisis ácida actúa, además, sobre el enlace glicosídico.

#### - Métodos de concentración y purificación de compuestos esterólicos

Dada la complejidad de la fracción esterólica y su baja concentración en la muestra, no existen técnicas que permitan determinar la concentración y/o composición de la fracción esterólica en la muestra inicial sin utilizarse técnicas complementarias de concentración y purificación.

El procedimiento habitual en aceites para separar la fracción esterólica consiste en una hidrólisis alcalina o saponificación con potasa etanólica seguida de la extracción de la fracción insaponificable. Se designa con la denominación de insaponificable a un grupo de sustancias que después de efectuada la saponificación son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Esta extracción permite, por tanto, concentrar los compuestos minoritarios (0,5-3% de la muestra inicial para la mayoría de los aceites) aislándolos de los componentes mayoritarios del aceite que quedan en la fase acuosa como jabones de ácidos grasos.

Una vez obtenida la fracción insaponificable, los métodos de separación usuales son la cromatografía en capa fina y la extracción en fase sólida (Lagarda *et al.*, 2006).

La hidrólisis alcalina necesaria para la obtención de la fracción insaponificable da lugar al cambio de estructura de los ésteres de esteroides a esteroides libres y, por ello, hasta hace pocos años, todos los estudios realizados en aceites estuvieron limitados a la determinación cuantitativa de los esteroides libres.

Para profundizar en la composición detallada de la fracción de ésteres de esteroides se utiliza la cromatografía de adsorción o extracción en fase sólida en columna de sílice, aprovechando su menor polaridad que la de los triglicéridos (Cunha *et al.*, 2006; Iafelice *et al.*, 2009) y de la de los esteroil-glucósidos, de mayor polaridad que los triglicéridos (Bondioli *et al.*, 2008; Van Hoed *et al.*, 2008; Lacoste *et al.*, 2009). En ambos casos se parte del aceite y mientras la elución de los ésteres de esteroides se realiza con un disolvente de polaridad inferior al necesario para obtener los triacilglicéridos, los esteroil-glucósidos se eluyen con un disolvente polar, tras la eliminación de los triacilglicéridos.

#### *- Análisis cromatográfico de los compuestos esteroides*

Desde el descubrimiento de los fitoesteroides, se han desarrollado varios métodos para su análisis cuantitativo. El primer método aplicado para la determinación de fitoesteroides fue el método de precipitación con digitonina (Paquot, 2013). Posteriormente, se introdujo un método colorimétrico más sensible basado en una reacción de oxidación enzimática. Sin embargo, éste se volvió obsoleto debido a que se trataba de un método laborioso y a que precisaba reactivos costosos (Naudet &

Hautfenne, 1985). Los extractos obtenidos mediante diversos procedimientos se han analizado mediante diferentes técnicas cromatográficas para separar, identificar y cuantificar los diferentes esteroides, como la cromatografía de gases (GC), la cromatografía de adsorción en columna de relleno (CC), la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y la electrocromatografía capilar (CEC) (Ferdosh *et al.*, 2018). También se ha aplicado la cromatografía de capa fina (TLC) para la evaluación preliminar de los fitoesteroides cualitativa y cuantitativamente (Ferdosh *et al.*, 2018).

Hoy en día, la GC es la técnica más frecuentemente utilizada para el análisis de fitoesteroides. Aunque la GC es la mejor opción para la determinación de fitoesteroides, el análisis por cromatografía líquida, HPLC y cromatografía líquida de alta presión (UPLC), también puede considerarse como una opción para determinar y aislar fitoesteroides individuales (Lu *et al.*, 2007).

La GC en columna capilar ofrece ventajas potenciales al reducir el tiempo de análisis y mejorar la separación de los diferentes esteroides (Abidi, 2001). La mayoría de los fitoesteroides han sido determinados con una fase estacionaria no polar, aunque una fase ligeramente polar, con 5% de difenilo y 95% de dimetilpolisiloxano, proporciona una mejor resolución de los picos y, por tanto, una determinación más precisa de los fitoesteroides individuales. Para el análisis por GC, los analitos son derivatizados y evaluados como trimetilsilil (TMS) derivados. Es difícil mejorar la forma y la resolución de los picos de los fitostanoles y fitoesteroides individuales sin derivatización (Laakso, 2005). *N*-metil-*N*-(trimetilsilil) trifluoroacetamida en piridina anhidra y bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida con 1% de trimetilclorosilano o hexametildisilazano con piridina seca y trimetilclorosilano son normalmente utilizados como reactivos para la derivatización (Ferdosh *et al.*, 2018).

La detección de fitoesteroides se puede realizar mediante detección por ionización de llama (FID), resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR), detección ultravioleta (UV) (Murui & Siew, 1997), detección por dispersión de luz (ELSD) (Moreau *et al.*, 2003) y espectrometría de masas (MS) (Abidi, 2001; Carretero *et al.*, 2008). Sin embargo, los detectores más comunes son FID (Lacoste *et al.*, 2009) y MS, utilizado principalmente para la confirmación de sus estructuras químicas (Cunha *et al.*, 2006; Lagarda *et al.*, 2006).

El análisis de esteroides es utilizado para caracterizar aceites de distinta naturaleza e incluso de distintas variedades, como en el caso del aceite de oliva virgen, y para detectar posibles mezclas fraudulentas con aceites de menor valor. Por ejemplo, el Brasicasterol es característico de las crucíferas. La colza contiene una concentración relativamente alta de Brasicasterol, que se sintetiza por desaturación del Campesterol por la esteroil-C22-desaturasa, mientras que está ausente o presente en cantidades muy pequeñas en otros aceites vegetales comunes.

La determinación de la composición de ácidos grasos y el análisis de esteroides son los principales análisis aplicados en la industria para identificar la naturaleza de los aceites (Codex Alimentarius, 2015). Mientras que el primero es un método relativamente simple y rápido, la obtención de la fracción insaponificable y el desarrollo en placa fina necesarios para el análisis de esteroides hacen que el método estándar sea laborioso y que se necesite un tiempo considerable para la preparación de la muestra.

En el presente trabajo de Tesis se propone una mejora analítica de las determinaciones estándar de la composición de ácidos grasos y de esteroides en aceites de semilla.

#### **1.2.4 Productos enriquecidos con fitoesteroides**

Aunque son varios los efectos atribuidos a los fitoesteroides, el más reconocido es su capacidad de reducir el colesterol total y colesterol LDL en plasma y, por tanto, de reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Hendriks *et al.*, 1999; Sierksma *et al.*, 1999; Piironen *et al.*, 2000; Awad *et al.*, 2003; Trautwein & Demonty, 2007; Mannarino *et al.*, 2014).

Los fitoesteroides son consumidos diariamente a través de alimentos naturales aunque los niveles no son significativos para reducir el colesterol. Por ejemplo, las personas con dietas vegetarianas consumen al día 1 g de fitoesteroides, mientras que otras dietas contienen menor cantidad (Lagarda *et al.*, 2006). En una dieta occidental la ingesta diaria de fitoesteroides es de 150-400 mg (Ostlund, 2002; Lagarda *et al.*, 2006; Trautwein & Demonty, 2007; EFSA, 2008), con contenidos de 65% de  $\beta$ -Sitosterol,

30% de Campesterol y 5% de Estigmasterol (Trautwein *et al.*, 2003). Estos niveles sólo constituyen un 10-20% de la ingesta recomendada para reducir la hipercolesterolemia (2 g/día) (Saraiva *et al.*, 2011; Shanahan & Lorimier, 2013).

En la Tabla 2 se puede observar el contenido de fitoesteroles de algunos alimentos seleccionados. De estos valores se desprende que el enriquecimiento de ciertos alimentos y la formulación nutracéutica con fitoesteroles es de gran importancia (Mannarino *et al.*, 2014).

El efecto de reducir los niveles de colesterol fue la mayor influencia en la fabricación de alimentos funcionales enriquecidos con fitoesteroles (Zawistowski, 2010). A pesar de que su acción fue descrita a inicios de 1950, su uso como tal se retardó principalmente porque, al margen del elevado coste de su proceso de obtención, los primeros fitoesteroles comercializados en 1957 (Cytellin, Eli Lilly) tenían muy baja biodisponibilidad.

**Tabla 2.-** Contenido de fitoesteroles en alimentos (mg de fitoesteroles/g de alimento)\*

	mg fitoesteroles/g producto
<b>Aceites</b>	
Aceite de oliva refinado	2,36
Aceite de oliva virgen	2,60
Aceite de orujo	2,79
Aceite de girasol	4,93
<b>Cereales</b>	
Trigo	0,42
Arroz	0,29
<b>Legumbres</b>	
Lenteja	1,17
Garbanzo	1,08

\*Resultados obtenidos por Jiménez-Escrig *et al.* (2006); Lama-Muñoz *et al.* (2011).

La margarina fue la primera aplicación comercial de alimentos enriquecidos con fitoesterol. Estas margarinas, fortificadas con estanoles y ésteres de esteroides vegetales, suministraban a los consumidores la cantidad ideal de esteroides requeridos para producir los efectos beneficiosos deseados (Leeson & Flöter, 2002; Meister, 2002).

Hoy día, la variedad de matrices de alimentos se ha expandido más allá de la margarina para incluir mayonesa, aderezos para ensaladas, productos lácteos (yogurt, leche, quesos), chocolates, barritas de cereales, zumos de fruta, carne (salchichas) y productos horneados (pan) (Weingartner *et al.*, 2009; MacKay & Jones, 2011; Maki *et al.*, 2013; Barbagallo *et al.*, 2015). Sin embargo, los nutraceuticos con fitoesteroides pueden ser más prácticos y eficaces para ayudar a los pacientes hipercolesterolémicos que no consumen a diario los alimentos mencionados anteriormente (Woodgate *et al.*, 2006; Sorrentino, 2008; AbuMweis *et al.*, 2014). De hecho, se ha sugerido que las cápsulas de fitoesteroides son más flexibles y convenientes para dosis continuas. Además, son más accesibles, con otros agentes farmacéuticos/nutraceuticos que reducen el colesterol para mejorar su capacidad terapéutica y eficacia preventiva como terapia adyuvante (McPherson *et al.*, 2005; Shaghghi *et al.*, 2013). Los fitoesteroides también tienen un papel importante en las áreas de los productos farmacéuticos (producción de esteroides terapéuticos) y en la industria cosmética como emulsionantes (Abidi, 2001; Rudkowska, 2010; Cherif, 2012).

Su utilización como ingredientes funcionales ha contribuido al desarrollo de numerosos estudios fundamentalmente relacionados con la búsqueda de técnicas para aumentar su contenido en los alimentos de origen vegetal (Miettinen, 2001; Piironen *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2006; Lagarda *et al.*, 2006) y a conocer su acción beneficiosa sobre la salud (Moreau *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2009).

La producción de alimentos enriquecidos con fitoesterol representó una oportunidad de negocios tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica para el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos, respectivamente. Según Moreau *et al.* (2002), existían al menos 10 compañías diferentes que estaban desarrollando y comercializando fitoesterol, ingredientes a base de fitoestanol, así como productos comerciales de alimentos y bebidas fortificados con fitoesteroides en muchas partes del mundo.

Recientemente, los productos alimenticios fortificados (Corrêa *et al.* 2017) y los suplementos (Laitinen *et al.* 2017) continúan produciéndose y mejorándose desde el punto de vista sensorial y funcional (Ferguson *et al.*, 2016). La mayoría de estos alimentos y bebidas funcionales se han formulado para alcanzar una ingesta de 1-2 g de fitoesteroles o fitostanoles por día (Moreau, 2015). Sin embargo, parece que la demanda mundial de este tipo de productos no está creciendo notablemente en el momento actual (Moreau *et al.*, 2018).

Los fitoesteroles y fitostanoles añadidos a alimentos se obtienen de los destilados de desodorización procedentes de la refinación del aceite de soja, y de aceites esenciales obtenidos a partir de la pasta de papel derivado del pino y otras coníferas (Moreau, 2015).



## 1.3 EL ACEITE DE GIRASOL

### 1.3.1 Componentes mayoritarios

El aceite de girasol representa casi el 80% de la producción de aceites de semillas en España y constituye el 10% de la producción mundial de aceite de girasol (FEDIOL, 2018).

Con más de un 98% de su peso, el aceite crudo de girasol está compuesto por triacilglicérols, ésteres de glicerol con tres moléculas de ácidos grasos. Sus propiedades físicas y químicas vienen determinadas principalmente por la composición de ácidos grasos y su distribución en la molécula de glicerol.

#### 1.3.1.1 - Triacilglicérols

En la Tabla 3 se presenta la composición en triacilglicérols de los aceites de girasol y girasol alto oleico. Como es conocido, los ácidos grasos no se distribuyen de manera aleatoria en los aceites vegetales. La posición 2 del triacilglicérol está ocupada por un ácido insaturado, mientras que los ácidos grasos saturados, casi de forma exclusiva, se localizan en las posiciones *sn*-1,3.

**Tabla 3.-** Composición en triacilglicérols de aceites de girasol (%).

Triacilglicérols	Girasol	Girasol Alto Oleico
LLL	33,9	0,4
OLL	28,2	0,9
PLL	9,6	-
OOL	8,5	8,2
POL+SLL	11,1	1,4
OOO	1,2	62,6
SOL+POO	4,8	10,1
SOO	0,8	14,2
POS	1,9	2,1

Abreviaturas: P (palmítico, C16:0), S (esteárico, C18:0), O (oleico, C18:1), L (linoleico, C18:2)

En el girasol, dado su alto contenido en ácido linoleico, el principal triacilglicerol es la trilinoleína (LLL) (33,9%), seguida de la oleo-dilinoleína (28,2%). La trioleína (OOO) constituye aproximadamente el 1%. Por tanto, el porcentaje de triacilgliceroles con cuatro o más dobles enlaces es superior al 80%.

Este perfil de triacilgliceroles es responsable de los puntos de solidificación bajos que presenta este aceite (de -16°C a -19°C), permitiendo, por ejemplo, que se pueda mantener una mayonesa elaborada con este aceite en condiciones de refrigeración sin que se rompa la emulsión (Grompone, 2005).

Por el contrario, el girasol alto oleico presenta un porcentaje de OOO del 62,6%. El hecho de que su composición de ácidos grasos sea similar a la que presenta el aceite de oliva, puede generar casos de adulteración o fraude, dada la diferencia de precios entre ambos aceites. Sin embargo, la naturaleza del aceite puede establecerse a través de la composición de esteroides y a la diferente composición de triacilgliceroles. Aunque la OOO es la especie principal en ambos aceites, el girasol alto oleico presenta un contenido superior al 60%, mientras que en el aceite de oliva suele ser inferior al 50%.

Además, el aceite de oliva contiene una alta proporción de dioleilpalmitina (POO), del orden del 20% (Cert & Moreda, 2000).

#### *1.3.1.2 - Ácidos grasos*

Las composiciones de ácidos grasos de los aceites de girasol presentes en el mercado se muestran en la Tabla 4.

El Codex Alimentarius (2015) distingue tres tipos de aceite según su contenido en ácido oleico: girasol, girasol alto oleico y girasol medio-oleico. El aceite de girasol se caracteriza por una concentración alta de ácido linoleico seguida de ácido oleico. Desde el punto de vista nutricional conviene destacar que el consumo de este aceite proporciona ácidos grasos esenciales (ácido linoleico) y que el contenido en ácido linolénico es relativamente bajo (0,3%), confiriéndole una estabilidad oxidativa relativamente alta.

**Tabla 4.-** Composición de los ácidos grasos principales del aceite de girasol (%).

	<b>Girasol</b>	<b>Alto oleico</b>	<b>Medio oleico</b>
C16:0	5,0-7,6	2,6-5,0	4,0-5,5
C18:0	2,3-4,0	2,0-4,0	3,0-5,0
C20:0	0,1-0,5	0,2-0,5	0,2-0,4
C22:0	0,3-1,5	0,5-1,6	0,6-1,1
C24:0	nd-0,5	nd-0,5	0,3-0,4
C18:1	14,0-39,4	75,0-90,7	43,1-71,8
C18:2	48,3-74,0	2,1-17,0	18,7-45,3

Datos: Ayerdi Gotor & Rhazi (2016). nd: no detectado

Por otra parte, los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) no suponen más de un 15% del contenido total (Grompone, 2005).

En la década de los 60 se desarrollaron en Rusia semillas de girasol con alto contenido en ácido oleico (> 80%), tratando semillas *Peredovik* con dimetil sulfato, un agente químico mutagénico. A la nueva variedad se la denominó *Pervenets*. La principal diferencia entre el girasol y el girasol alto oleico viene dada por el cociente oleico/linoleico. El aceite de girasol alto oleico permanece líquido en un amplio rango de temperaturas y posee una gran estabilidad oxidativa.

Por último, aparece a nivel comercial el aceite denominado “NuSun” o medio oleico, obtenido por hibridación mediante polinización cruzada entre una variedad alto oleico y una variedad tradicional. NuSun contiene menos del 10% de ácidos grasos saturados, 50-75% de monoinsaturados, 30-32% de poliinsaturados y menos de 1% de ácido linolénico (Gupta, 1998). Es más estable que el aceite de girasol y ha tenido un enorme éxito debido a que no está protegido con patentes.

La Reglamentación Técnico-Sanitaria de aceites vegetales comestibles vigente en España (Real decreto 478/2007) recoge la composición de ácidos grasos del aceite refinado de girasol que se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.-** Características de los aceites refinados de girasol establecidas en la Reglamentación Técnico-Sanitaria de aceites vegetales comestibles (Real decreto 478/2007).

Ácidos grasos	Composición porcentual (%) <sup>a</sup>
C12:0	≤0,1
C14:0	≤0,1
C16:0	2,7-7,6
C16:1 <sup>b</sup>	≤0,3
C17:0	≤0,2
C17:1	≤0,1
C18:0	2,1-6,5
C18:1 <sup>b</sup>	14,0-90,7
C18:2 <sup>b</sup>	2,1-74,0
C18:3 <sup>b</sup>	≤0,3
C20:0	≤0,5
C20:1	≤0,5
C22:0	≤1,6
C24:0	≤0,5

<sup>a</sup> En estos intervalos están incluidos los diferentes tipos de aceite refinado de girasol. <sup>b</sup> Suma de isómeros

El aceite debe presentar un aspecto limpio y transparente a 20°C durante 24 h, con un color <2,5 unidades Rojas Lovibond, sin humedad ni impurezas sólidas y con una acidez inferior a 0,2%.

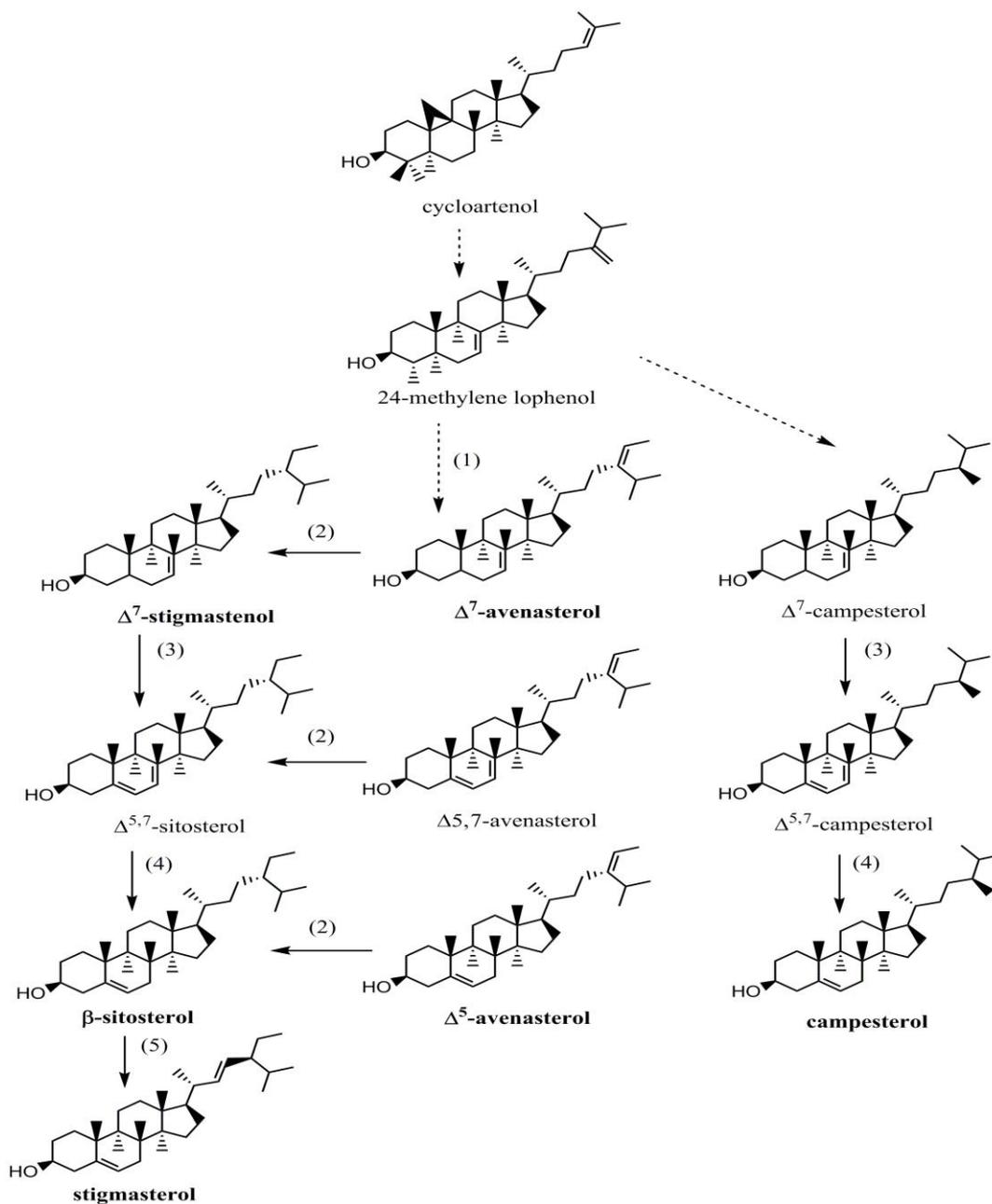
Debido a los nuevos aceites obtenidos mediante modificación genética, la reglamentación está en constante cambio para incluir las composiciones de las nuevas variedades comercializadas. La vigente reglamentación incluye las variedades tradicionales y de alto contenido en ácido oleico, estableciendo rangos muy amplios para los dos principales ácidos insaturados, oleico y linoleico. Además, considera también la posibilidad de formación de isómeros *trans* e isómeros de posición de dobles enlaces en el proceso de refinación. La existencia de nuevas variedades de alto contenido en ácidos palmítico y esteárico (Martínez-Force & Garcés 1999; Fernández-Moya *et al.*, 2005) ha tenido como consecuencia una nueva modificación de la reglamentación con la introducción del punto 3.3. “Pruebas de pureza de los aceites de girasol alto esteárico-alto oleico” que indica que estos aceites deben cumplir con las características establecidas en el Anexo especial añadido a esta reglamentación en 2010, donde se amplía el rango de C18:0, entre 15 y 36,5%.

### 1.3.2 Componentes minoritarios: Fitoesteroles

Los principales fitoesteroles en el aceite de girasol son  $\beta$ -Sitosterol (60% del total de desmetilesteroles),  $\Delta$ 7-Estigmastenol (14%), Campesterol (8%) y Estigmasterol (8%), aunque existe una gran variación en la composición. Por ejemplo, Vlahakis & Hazebroek (2000) han detectado germoplasma con concentraciones máximas de 20,4% de Campesterol, 17,9% de Estigmasterol y 81,5% de  $\beta$ -Sitosterol. Verleyen *et al.* (2002b) han encontrado un 15,1% de  $\Delta$ 5-Avenasterol. Fernández-Cuesta *et al.* (2012b) identificaron germoplasma con niveles máximos de 18,0% de Campesterol, 16,1% de Estigmasterol y 30,0% de  $\Delta$ 7-Estigmastenol. Además, se han obtenido valores máximos de 23,9% para Estigmasterol, 20,5% para  $\Delta$ 5-Avenasterol y 10,6% para  $\Delta$ 7-Avenasterol en *Helianthus spp silvestre*. (Fernández-Cuesta *et al.*, 2011).

La Figura 6 muestra la ruta biosintética de los principales fitoesteroles en el girasol. La ruta comprende dos ramas principales a partir del 24-metileno lofenol. La primera conduce a la biosíntesis de  $\beta$ -Sitosterol y Estigmasterol, y la segunda a la

biosíntesis de Campesterol. La primera rama tiene  $\Delta^7$ -Estigmastenol como uno de los productos intermedios. (Velasco & Ruiz Méndez, 2015)



**Figura 6.-** Ruta biosintética de los principales fitoesteroides en el girasol (Velasco & Ruiz-Méndez, 2015)

El aceite de girasol presenta un 30-40% de fitosterol en forma de esterol éster. Las composiciones modificadas de ácidos grasos en los mutantes de girasol modifican también la composición de los restos acilos de estos compuestos (Broughton et al., 2018).

La Tabla 6 muestra la composición de esteroides en los principales aceites de girasol, así como los límites de concentración total de esteroides recogidos en el Codex Alimentarius (2015). El límite máximo de esteroides es de 5200 mg/kg y los tres esteroides mayoritarios,  $\beta$ -Sitosterol, Campesterol y Estigmasterol, están presentes en proporciones elevadas, siendo el contenido de  $\Delta$ -7-Estigmasterol el más específico para determinar la genuinidad del aceite.

**Tabla 6.-** Composición y contenido de esteroides en aceites de girasol presentes en el mercado (Codex, 2015).

	<b>Girasol</b>	<b>Alto-oleico</b>	<b>Medio-oleico</b>
<b>Composición (%)</b>			
Colesterol	nd-0,7	nd-0,5	0,1-0,2
Brasicasterol	nd-0,2	nd-0,3	nd-0,1
Campesterol	6,5-13,0	5,0-13,0	9,1-9,6
Estigmasterol	6,0-13,0	4,5-13,0	9,0-9,3
$\beta$ -Sitosterol	50-70	42,0-70	56-58
$\Delta$ 5-Avenasterol	nd-6,9	1,5-6,9	4,8-5,3
$\Delta$ 7-Estigmasterol	6,5-24,0	6,5-24,0	7,7-7,9
$\Delta$ 7-Avenasterol	3,0-7,5	nd-9,0	4,3-4,4
Otros	nd-5,3	3,5-9,5	5,4-5,8
<b>Esteroides Totales (mg/kg)</b>	<b>2400-5000</b>	<b>1700-5200</b>	<b>4558-4815</b>

nd, no detectado.

### 1.3.3 Otros componentes minoritarios

Otros componentes presentes en los aceites en cantidades minoritarias son diacilgliceroles, fosfolípidos, ácidos grasos libres (AGL), hidrocarburos, tocoferoles, ceras, alcoholes alifáticos, trazas metálicas, compuestos carotenoides, compuestos fenólicos y clorofilas (Tabla 7) (Sánchez-Muniz & Cuesta, 2003; Grompone, 2005). También pueden contener pesticidas resultantes de prácticas agrícolas (Gunstone, 2005).

**Tabla 7.-** Componentes menores del aceite de girasol crudo.

Componentes	mg/kg aceite	Referencia
Diacilgliceroles	10000-18900	Sanchez-Muniz & Cuesta, 2003
Fosfolípidos	6000-12000	Carelli <i>et al.</i> , 2002a
Ácidos grasos libres	3700-4500	Sanchez-Muniz and Cuesta, 2003
Fitoesteroles	2400-4600	Grompone, 2005
Hidrocarburos	1000	Basti <i>et al.</i> , 1978
Tocoferoles	403-935	Grompone, 2005
Ceras	200-3500	Carelli <i>et al.</i> , 2002b
Alcoholes alifáticos	59-63	Sanchez-Muniz and Cuesta, 2003
Trazas metales	45-95	Gupta, 2002
Carotenoides	6,5-15,3	Premovic <i>et al.</i> , 2010
Compuestos fenólicos	4,8-16,4	Perretti <i>et al.</i> , 2004
Clorofilas	0-1	Premovic <i>et al.</i> , 2010

#### 1.3.3.1 Fosfolípidos

Los fosfolípidos, comúnmente denominados fosfátidos o gomas, están constituidos por una molécula de glicerol esterificada en las posiciones 1 y 2 con ácidos grasos y en la posición 3 con el ácido fosfórico que, a su vez, está normalmente unido a un grupo polar de naturaleza variada.

Los aceites crudos de girasol presentan un alto contenido de fosfolípidos. Éstos están constituidos por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico (Gupta, 2002; Salas *et al.*, 2015).

El contenido de fosfolípidos en los aceites crudos de girasol oscila entre 0,5% y 1,2%, siendo superior en los aceites que se obtienen con disolvente. La mayoría de estos compuestos son hidratables y se retiran del aceite crudo con agua en la etapa de desgomado del proceso de refinación (Zufarov *et al.*, 2008). Sin embargo, también contienen fosfolípidos no hidratables, cuyo contenido podría variar en función de la actividad de la fosfolipasa D, que es capaz de convertir fosfolípidos hidratables en fosfolípidos no hidratables en presencia de agua (Haraldsson, 1983). Estas moléculas tienen efectos desfavorables durante el proceso de refinación, ya que pueden saturar las tierras decolorantes (Taylor, 1993) o pardear los aceites durante la desodorización (Zamora *et al.*, 2004).

El contenido en fosfolípidos se evalúa en los aceites de forma indirecta, considerando el contenido en fósforo multiplicado por un factor que depende de la composición relativa en estos compuestos (Carelli *et al.*, 2002a).

#### *1.3.3.2 Ceras*

Otros componentes minoritarios saponificables característicos del aceite de girasol son las ceras, componentes principales de la cáscara (Martini & Añón, 2000). Las ceras son ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos. Cuando poseen 44 ó más átomos de carbono cristalizan y causan turbidez, interfiriendo en su procesamiento y comercialización. Éstas se conocen como “ceras cristalizables” y se eliminan en la etapa de descerado o “winterizado” a fin de obtener un aceite claro, que no se vea afectado por las temperaturas de almacenamiento y sea bien aceptado por el consumidor. Por ello, es una práctica habitual en la industria eliminar estos compuestos durante el proceso de refinación.

El contenido y la composición de las ceras en el aceite de girasol pueden variar significativamente debido a las diferencias genéticas de las semillas, a la relación grano/cáscara y al método de extracción (Broughton *et al.*, 2018).

### 1.3.3.3 Componentes de la fracción insaponificable

La fracción mayoritaria de componentes menores del aceite de girasol la constituye la denominada fracción insaponificable, que incluye aquellos componentes menores que no son saponificados con el tratamiento cáustico habitual, pero que son solubles en grasas y disolventes (AOCS, 2011). La Comisión del Codex Alimentarius recomienda una materia insaponificable máxima de 15 g/kg para el aceite de girasol crudo (Codex Alimentarius, 2015).

Los principales compuestos encontrados son, además de los fitoesteroles ya mencionados, tocoferoles, pequeñas cantidades de alcoholes, compuestos fenólicos e hidrocarburos, como carotenoides y escualeno (15-20 mg/100g). Generalmente, el contenido total constituye entre 0,5 a 1,5% del peso del aceite crudo (Grompone, 2005). De estos compuestos destacan por contenido e importancia los tocoferoles.

#### *Tocoferoles*

Los tocoferoles son compuestos heterocíclicos de tipo fenólico con una cadena hidrocarbonada lateral ramificada, que le confiere un carácter lipófilo. Son antioxidantes naturales y tienen actividad de Vitamina E. La composición y contenido en tocoferoles de las variedades comerciales se recogen en la Tabla 8.

**Tabla 8.-** Composición y contenido en tocoferoles de aceites de girasol presentes en el mercado.

	<b>Girasol</b>	<b>Alto oleico</b>	<b>Medio oleico</b>
<b>Composición (%)</b>			
$\alpha$ -tocoferol	403-935	400-1090	488-668
$\beta$ -tocoferol	nd-45	10-35	19-52
$\gamma$ -tocoferol	nd-34	3-30	2-19
$\delta$ -tocoferol	nd-7	nd-17	nd-2
<b>Tocoferoles totales (mg/kg)</b>	440-1520	450-1120	509-741

Datos: Codex Standard 210-1999 (2015); nd: no detectado.

#### **1.3.4 Elementos metálicos**

La calidad de los aceites comestibles está directamente relacionada con la concentración de trazas metálicas. Algunos elementos (Cu, Zn y Fe) constituyen minerales esenciales y son importantes para la salud, mientras que otros (Ni, Pb, Cd, As y Hg) pueden ser perjudiciales si se consumen en cantidades excesivas.

Con respecto a la calidad comercial, están bien establecidos los efectos negativos que los metales pesados tienen sobre el sabor y la estabilidad oxidativa de los aceites (Chen *et al.*, 1999).

Las principales fuentes de metales pesados para las plantas son sus medios de crecimiento, principalmente la solución de nutrientes y los suelos (Tüzen, 2003a-b), aunque existen otras fuentes como los pesticidas y los fertilizantes (Mena *et al.*, 1996). Además, en los aceites y grasas comestibles se produce un contacto inevitable con superficies metálicas durante los procesos de extracción y, especialmente, en la refinación, donde la incorporación de metales se ve favorecida por las altas temperaturas (Martin-Polvillo *et al.*, 1994).

Desde el punto de vista técnico, principalmente el Fe y el Cu reducen drásticamente la estabilidad oxidativa de los aceites comestibles. La presencia de Ca y Mg en los aceites reduce la eficacia de las operaciones de desgomado y refinación, y los jabones de Na reducen la eficacia de la etapa de decoloración, al inactivar los sitios de adsorción en la tierra decolorante. El Ca y el Mg suelen estar unidos a los fosfátidos o fosfolípidos (Zufarov *et al.*, 2008), que contienen P, y dan lugar a depósitos en el aceite por la formación de coloides, de ahí el interés en su eliminación en el proceso de refinación.

#### **1.3.5 Requisitos exigidos por la Reglamentación vigente**

La evaluación de la calidad implica una comparación entre la composición de la grasa y lo que se le exige como mínimo para un uso determinado. Las normas de calidad para grasas y aceites establecidas oficialmente pretenden salvaguardar la salud

pública, regular contratos comerciales o facilitar métodos de inspección, muestreo y análisis para cumplir los dos primeros objetivos.

El Codex Alimentarius (2015) define a los aceites vírgenes como aquéllos que se obtienen, sin modificar el aceite, por procedimientos mecánicos y por aplicación únicamente de calor. Pueden haber sido purificados mediante lavado, sedimentación, filtración y centrifugación únicamente. El color, olor y sabor de cada producto debe ser el característico del producto designado, que debe estar exento de olores y sabores extraños.

Las principales diferencias establecidas entre un aceite virgen y un aceite refinado se recogen en la Tabla 9.

En algunos países el consumo de los aceites vírgenes de semillas está en auge. La Sociedad Alemana de la Grasa (DGF) ya propuso en 2007 un método estandarizado para aceite de colza virgen (Standard method DGF, 2007). En España, sin embargo, no existe reglamentación en este sentido para los aceites vírgenes de semillas. La Reglamentación Técnico Sanitaria para Aceites Comestibles (B.O.E. 1983) obliga al consumo de aceite refinado y tiene por objeto fijar las características de identificación y las especificaciones de calidad. Estas últimas se centran en tres aspectos fundamentalmente: apariencia, características organolépticas y ausencia de sustancias extrañas y/o nocivas.

**Tabla 9.-** Principales diferencias establecidas en el Codex Standard 210-1999 referidas a aceites vírgenes y refinados.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>Unidades</b>	<b>Virgen</b>	<b>Refinado</b>
<b>Índice de Acidez</b>	mg KOH/kg	4	<0,6
<b>Índice de Peróxidos</b>	meq O <sub>2</sub> /kg	15	10
<b>Reconocimiento de jabones</b>	mg/kg	0,005	Negativo
<b>Metales</b>			
Hierro	mg/kg	5,0	≤1,5
Cobre	mg/kg	0,4	≤0,1

Con respecto a la apariencia, los aceites refinados deben ser claros y brillantes, estableciéndose que, a una temperatura de 20°C y durante un período de 24 h, deberán mantenerse claros y estar libres de sedimentos. Por tanto, todo aquello que cause turbidez en el aceite deberá ser eliminado a lo largo del proceso de refinación

Un problema que puede plantearse a la hora de producir aceite virgen de girasol es el provocado por las ceras que recubren las cáscaras de las semillas, que son co-extraídas durante el prensado y que precipitan durante el almacenamiento del aceite provocando turbidez. Esta turbidez, que en principio puede crear rechazo por parte del consumidor, se puede eliminar a través de una de las etapas del proceso de refinación, winterización, sin que esto repercuta en la calidad final del aceite virgen. Otra opción es la elaboración de aceite de girasol a partir de semillas descascaradas, lo que contribuiría a la obtención de un aceite con propiedades sensoriales más atractivas, pero implicaría un menor rendimiento en el prensado. De ahí que los productores tiendan a elaborar aceites de girasol a partir de semillas parcialmente descascaradas, buscando un compromiso entre el rendimiento y la calidad del aceite resultante (Rass et al., 2008).

También se requiere el secado a vacío para eliminar el agua y la filtración para eliminar restos de tierras decolorantes y otras impurezas. Estos dos últimos requerimientos se controlan específicamente tanto para los aceites vírgenes como refinados, ya que la normativa establece que el contenido de humedad y materias volátiles en estufa de vacío debe ser inferior al 0,1%, y el contenido en impurezas insolubles en éter de petróleo inferior a 0,05%.

Las especificaciones del color dependen de cada tipo de aceite. Así, para el aceite de girasol se establece que no debe ser más intenso que el equivalente a una combinación de 25 unidades amarillas y 2 unidades rojas de la escala Lovibond.

Estas especificaciones se relacionan también con las características organolépticas, ya que el aceite deberá estar exento de olor y sabor a rancio, sin que manifieste contaminación por sustancias extrañas. Para ello, es esencial la eliminación de humedad, acidez libre y jabones debido a que son catalizadores de reacciones de oxidación e hidrólisis en la grasa. No obstante, no existe normalizada ninguna prueba de

análisis sensorial y sólo el valor del índice de peróxidos (<10 meq O<sub>2</sub>/kg) garantiza una limitación en la cantidad de compuestos de alteración presentes.

La aceptación de los aceites vírgenes dependerá en gran medida de su perfil aromático. En este sentido, hay una relación directa entre el contenido y composición de compuestos volátiles del aceite y su aceptación por parte del consumidor. No son muchos los estudios sobre los volátiles que pasan al aceite crudo o virgen de girasol. Bocci & Frega (1996) presentaron el análisis de componentes volátiles que pueden contribuir a la formación del sabor del aceite extraído de las semillas de girasol.

Estudios sobre de la evaluación sensorial de los aceites vírgenes de girasol descascarado fueron realizados por Rass *et al.* (2008), que lo caracterizaron como un aceite con un “sabor parecido a la semilla de girasol”, “avellanado” y a veces “afrutado”; mientras que a los aceites obtenidos de la semilla completa les atribuyeron un “sabor parecido a la madera”, “fuerte, astringente y amargo”. Estas características negativas, principalmente el sabor amargo, junto con su fuerte sabor a semilla de girasol y a madera, hacen que los aceites vírgenes de girasol se traten con corrientes de vapor a temperaturas comprendidas entre 120°C y 180°C a vacío durante horas. Esta desodorización suave elimina los aromas desagradables haciendo posible el uso de estos aceites en la industria alimentaria y sin perder su denominación de vírgenes (Grob *et al.*, 1994).

Posteriormente, Bendini *et al.* (2011; 2014) llevaron a cabo un análisis descriptivo cuantitativo (QDA) para caracterizar la calidad sensorial de aceites de extracción en frío de girasol en comparación con aceites refinados. Mediante la evaluación con un panel de cata, encontraron 18 descriptores sensoriales que caracterizaban a estos aceites y que se correlacionaban con los volátiles determinados por cromatografía de gases. Los principales compuestos fueron terpenos (aproximadamente 225 mg/L), constituidos por  $\alpha$ -pineno (80%), limoneno (5%), sabineno (3,3%), 13-pineno (1,8%), 1,2,6,6-tetrametil-1,3-ciclohexadieno (1,5%) y canfeno (1,2%). También se encontró una pequeña cantidad de hexanal (1,3%) y trazas (<1%) de compuestos no identificados, que los autores atribuyeron a otros hidrocarburos y alcoholes terpénicos y/o aldehídos. Grob (1994) sugirió el  $\alpha$ -pineno como marcador útil para distinguir los aceites de girasol obtenidos sólo por procesos

mecánicos de aceites sometidos a un tratamiento físico. Varios estudios han mostrado que este compuesto es el predominante en los aceites de girasol prensados en frío (Etievant *et al.*, 1984; Cioni *et al.*, 2005; Krist *et al.*, 2006; Bendini *et al.*, 2011)

Se encuentran más referencias en relación a compuestos derivados de la oxidación del aceite tanto crudo como refinado (Keszler *et al.*, 1998; Guillén & Goicoechea, 2008; Uriarte *et al.*, 2011; Ontañón *et al.*, 2013). Entre los compuestos detectados hay gran diversidad, como aldehídos, 2,4-alcadienal, cetonas, ácidos, ésteres, alcoholes, así como hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

Entre los componentes minoritarios del aceite virgen de girasol implicados en el aroma cabe destacar el contenido de compuestos fenólicos, cuyas concentraciones oscilan de 4,8 a 16,4 mg/kg de aceite (Perretti *et al.*, 2004). Aunque no hay estudios de fenoles y de su influencia en el aroma de aceites de girasol, se ha comprobado que aceites de oliva enriquecidos en fenoles afectan el aroma del mismo (Genovese *et al.*, 2015). Existen estudios donde se ha relacionado el contenido fenólico con la formación de aromas en sistemas modelos (Delgado *et al.*, 2015; 2016). Este efecto podría estar presente en los aceites de girasol, principalmente vírgenes por sus contenidos en fenoles.

Por último, en las normas de etiquetado del producto se establece un período de consumo preferente de un año, por lo que deben mantener sus características en el mercado durante el citado período.



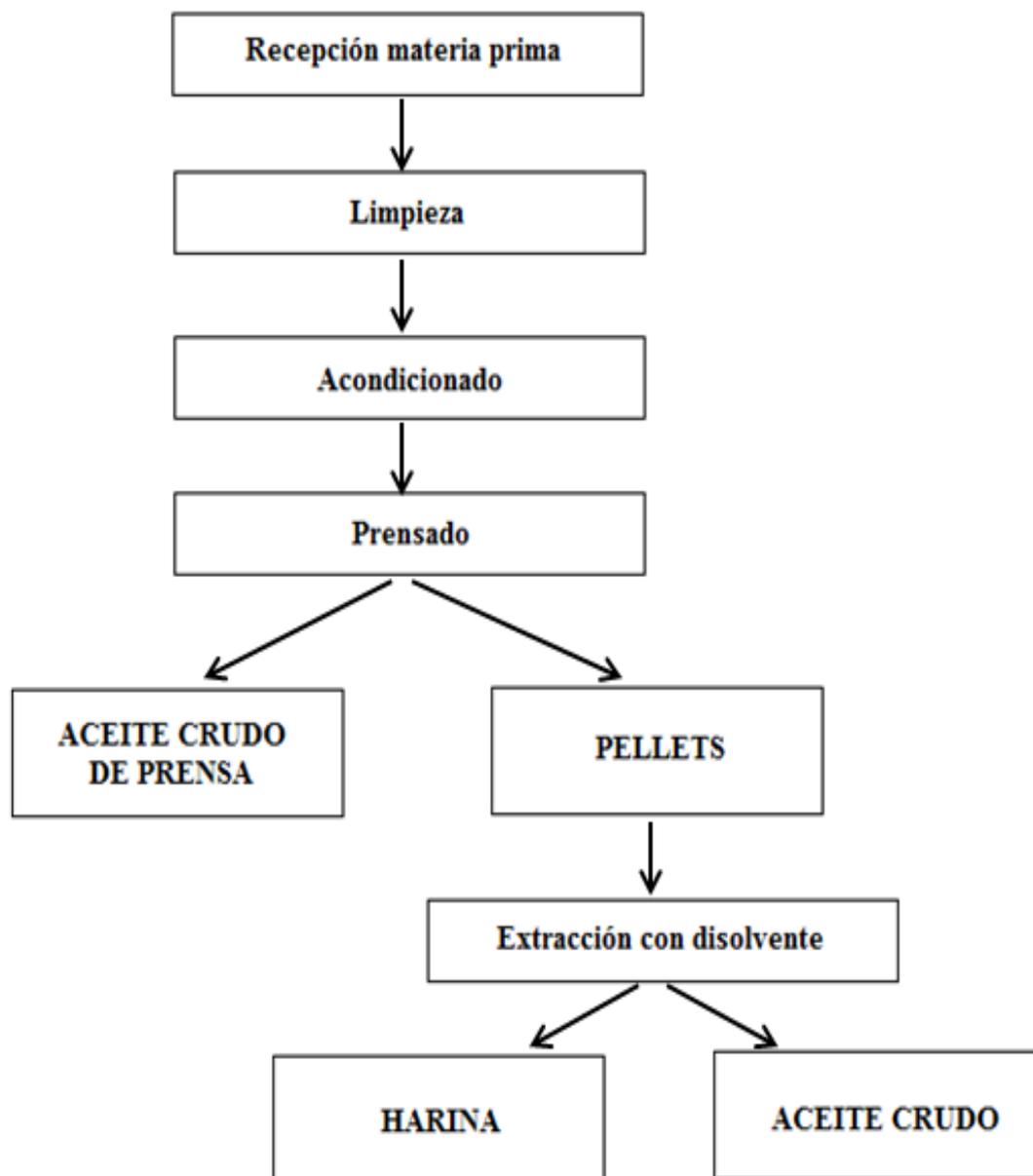
## 1.4 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE ACEITE DE GIRASOL

La producción comercial de los aceites vegetales se realiza tanto por métodos físicos, mediante prensado, como por extracción con disolvente. En las semillas y frutos oleaginosos con un alto contenido en grasa (>20%), como es el caso de las semillas de girasol, el maní, hueso de palma o semillas de colza, la extracción directa con disolventes no es rentable, por lo que se lleva a cabo una extracción previa en prensas continuas denominadas *expellers*. Después de esta primera extracción por presión, la materia sólida resultante (*pellets*) tiene un contenido graso relativamente alto (15-18%) y se somete a una extracción con disolvente para agotar al máximo el aceite que contiene (Carr, 1997).

El conjunto de operaciones básicas necesarias para la extracción del aceite y la obtención de la harina o sólido residual a partir de la semilla se esquematizan en la Figura 7.

### 1.4.1 Preparación de la semilla

Para optimizar la extracción se requiere un tratamiento previo de limpieza de la semilla. Se debe retirar toda la materia extraña de la sustancia que se va a procesar y, en ocasiones, también se retira la cáscara o película, lo cual influye en el contenido de compuestos minoritarios en el aceite (Figueiredo *et al.*, 2019). Posteriormente, se muelen las semillas para que el prensado sea más eficiente. Previamente a la entrada al *expeller*, las semillas se someten a un tratamiento con humedad y temperatura (acondicionado) para que el aceite tenga una menor viscosidad y fluya hacia el exterior con más facilidad (Pérez *et al.*, 2019).



**Figura 7.-** Esquema de extracción de aceite de semillas oleaginosas.

## 1.4.2 Extracción de aceite

Como ya se ha mencionado anteriormente, la extracción industrial de aceites vegetales se lleva a cabo mediante extracción mecánica y/o extracción con disolvente, este último es el más aplicado debido a su alto rendimiento (alrededor del 95%), aunque se obtiene un aceite de menor calidad (Liu *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2019). En particular, para aceites de alto valor añadido esta calidad es inaceptable, limitando el proceso de producción a la extracción por presión (Rass *et al.*, 2008).

### 1.4.2.1 Extracción mecánica

Los *expellers* constan de un tornillo sinfín de conicidad variable, localizado en el interior de una caja perforada que actúa de filtro para el aceite. El extremo está controlado por un dispositivo obturador regulable. El movimiento de rotación del tornillo empuja al *pellet* que cae por la boca de carga hacia la salida. El *pellet* junto con el obturador crea una presión que hace que el aceite fluya al exterior, a lo largo de la caja, a la vez que el *pellet* va saliendo por el extremo. El aceite obtenido por presión contiene sólidos o lodos que tienen que ser eliminados. Los *pellets* obtenidos pasan a ser extractados con disolvente.

La recuperación de aceite se ve influida por el descascarado, la humedad de la muestra y la temperatura del cabezal de la prensa (Pérez *et al.*, 2019).

### 1.4.2.2 Extracción con disolvente

La extracción por disolvente no es más que una transferencia de materia, una extracción sólido-fluido. Es una operación que consiste en retirar una sustancia contenida en un sólido por la acción de un fluido que la disuelve selectivamente. Es muy importante la preparación de las semillas para optimizar la extracción.

El disolvente autorizado para la extracción de grasas es el hexano, que destaca por su gran poder extractivo, selectividad y mínima influencia sobre la calidad del aceite extraído. Además, posee características físicas óptimas (calor latente de vaporización, temperatura de ebullición, tensión de vapor), así como adecuadas propiedades químicas, entre ellas una baja acción corrosiva (Galvin, 1997). Sin embargo, tiene alta volatilidad,

toxicidad e inflamabilidad, por lo que es necesario un manejo especial junto con el tratamiento de residuos y una eliminación adecuada después del proceso de extracción (Bäumler *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2017).

Tras la extracción con disolvente, el contenido final de aceite en la torta es inferior al 2%. Además, comparado con el aceite de prensa, el aceite que se extrae es de calidad notablemente inferior, debido a que el disolvente extrae fundamentalmente compuestos lipídicos de las membranas celulares, como fosfolípidos y ceras, que deben ser eliminados posteriormente mediante refinación (Velasco & Ruiz-Méndez, 2015).

El método de extracción influye sobre el contenido total y la composición de los fitoesteroles en el aceite, además de factores genéticos y ambientales del girasol (Velasco & Ruiz-Méndez, 2015). Los aceites extraídos con disolventes tienen un mayor contenido total de fitoesteroles, pero un menor contenido de fitoesteroles esterificados que los aceites de prensa, ya que la solubilidad de estos componentes minoritarios depende del aceite que actúa como disolvente. La mayoría de los esteroides presentes en las semillas de girasol forman parte de la fracción de aceite después de la extracción, pero alrededor de un tercio del contenido total permanece en la harina desgrasada como glicósidos de esterol (Aguirre *et al.*, 2012).

### **1.4.3 Refinación de aceite**

El proceso de refinación de aceites elimina aquellos compuestos responsables del color, olor y sabor que hacen que los aceites crudos sean inaceptables para los consumidores. Su objetivo es obtener un aceite o grasa suave, casi insípida, muy ligeramente coloreada y estable. Además, la refinación debe eliminar compuestos que pueden ser tóxicos o los que influyen negativamente en la calidad o estabilidad del mismo. En general, el objetivo final siempre es producir un producto seguro y estable con un 96% o más de triacilglicerol.

Los componentes a eliminar son principalmente fosfolípidos, AGL, pigmentos, compuestos volátiles y contaminantes (Van Duijn, 2016). Desafortunadamente, otros componentes menores como los fitoesteroides, los tocoferoles y otros se eliminan en

parte junto con los compuestos no deseados. En consecuencia, para alcanzar la máxima calidad del aceite, todos los pasos del proceso de refinación deben realizarse con pérdidas mínimas de estos compuestos de interés.

### Etapas de refinación

El proceso de refinación es muy similar para todos los aceites, aunque algunos parámetros pueden variar ligeramente según el tipo de semilla. Consta de varias etapas que se pueden combinar según un procedimiento de refinación clásica/química o de refinación física. Las diferencias entre ambos procesos de refinación y los principales componentes eliminados se muestran en la Tabla 10.

La principal diferencia entre la refinación clásica alcalina y el refinado físico es que en el primero se aplica un tratamiento con sosa cáustica para neutralizar el aceite, mientras que en el último los AGL son eliminados mediante destilación durante la etapa de desodorización (Ruiz-Méndez *et al.*, 2013).

La refinación física es más complicada desde el punto de vista técnico. Sin embargo, reduce la pérdida de aceite neutro, minimiza la contaminación y permite la recuperación de AGL de alta calidad. Además, sólo requiere, en general, tres etapas mientras que la refinación clásica puede necesitar más de seis, con continuas separaciones de fases que nunca se realizan con el 100% de eficacia (Ruiz-Méndez *et al.*, 2013).

**Tabla 10.-** Pasos básicos del proceso de refino de aceites (Ruiz-Méndez *et al.*, 2013).

Refinación Clásica	Compuestos eliminados	Refinación Física
Desgomado	Fosfolípidos	Desgomado
Neutralización	AGL	
Winterización	Ceras/TG saturados	Winterización
Decoloración	Compuestos coloreados	Decoloración
Desodorización	Olor y Sabor	Destilación neutralizante

No todos los aceites pueden ser físicamente refinados debido a que es necesario utilizar una temperatura elevada en la fase de destilación. Por efecto de la temperatura se pueden producir alteraciones en el aceite, como la interesterificación cuando la acidez es elevada, y dar lugar a un aceite refinado que no cumpla los requisitos recogidos en las normas establecidas (Amelotti, 1987).

#### *-Desgomado*

El objetivo de esta etapa, también llamada depuración o desmucilagínación, es la eliminación de los fosfolípidos, compuestos altamente emulsionantes (Segers & van de Sande, 1990). Normalmente están asociados a metales pro-oxidantes que disminuyen la estabilidad del producto y les confiere turbidez por aparición de precipitados, e impiden la correcta formación de cristales y la separación de fases durante la winterización (Carola, 1969; Bockish, 1998). Por otra parte, si los fosfátidos permanecen antes de la desodorización o de la refinación física, el aceite resultará de un color más oscuro y tendrá peores caracteres organolépticos y estabilidad (Dijkstra & Van Opstal, 1989).

De acuerdo con su nivel de hidratación, se diferencian dos tipos de fosfolípidos, hidratables y no hidratables. Los últimos están formados principalmente por sales de calcio y magnesio de ácidos fosfatídicos y lisofosfatídicos. Los fosfolípidos hidratados pueden separarse eficazmente por filtración o centrifugación mediante la adición de agua. Para eliminar la fracción no hidratable es necesario acidificar el medio. En estas condiciones los fosfolípidos precipitan y son separados mediante centrifugación. En la industria alimentaria sólo se permite el uso de ácido cítrico y ácido fosfórico, siendo este último el de utilización más extendida por su menor precio (De Greyt, 2013).

El control de esta etapa se realiza mediante el contenido de fósforo, el cual se relaciona mediante un factor con el contenido total de fosfolípidos (Carelli *et al.*, 2002a). Las especificaciones en fósforo propuestas para aceites que vayan a ser sometidos a refinación física establecen que su contenido no debe ser superior a 10 mg/kg (De Greyt, 2013).

El desgomado puede realizarse de forma discontinua o continua, y generalmente se efectúa como paso previo a la neutralización. Se lleva a cabo con ácido diluido cualquiera que sea la neutralización usada física o química.

Actualmente se está estudiando la aplicación de tratamientos enzimáticos para una mejor eliminación de los fosfolípidos del aceite, consiguiendo resultados muy prometedores (Lamas *et al.*, 2014). Así mismo, para facilitar la separación de los precipitados formados están siendo objeto de estudios nuevas tecnologías como la utilización de ultrasonidos (Mahmood *et al.*, 2017) y el uso de membranas (Doshi *et al.*, 2019).

#### *-Neutralización*

La neutralización, una de las etapas más importantes del proceso, tiene por objeto eliminar los AGL y otras impurezas presentes en los aceites crudos, minimizando las pérdidas de aceite neutro. En general, consta de tres etapas: neutralización, lavado y secado.

En la etapa de neutralización los AGL son transformados en jabones insolubles por reacción con sosa cáustica (hidróxido de sodio) (Hendrix, 1990). Los jabones se eliminan fácilmente por decantación o por centrifugación. Este paso sólo se usa en el proceso de refinación química.

Aunque el principal objetivo de la neutralización es la eliminación de los AGL, también descompone los pigmentos, elimina trazas metálicas, proteínas, materiales oxidantes y los compuestos de fósforo. Los fosfolípidos residuales en aceites desgomados o todos los fosfolípidos en aceites crudos se eliminan como hidratos insolubles. Además, la neutralización también contribuye a la decoloración parcial, ya que los pigmentos polares, como el gosipol (Gozek *et al.*, 1999), el sesamol, ácidos grasos con función hidroxilo y otros, reaccionan en parte con el hidróxido de sodio y luego se eliminan por solubilización en agua.

Dependiendo de las condiciones utilizadas, se puede eliminar también una cantidad significativa de compuestos minoritarios de interés, principalmente esteroides y tocoferoles (Ruiz-Méndez *et al.*, 2015). Esta reducción en el contenido total de esteroides se ha atribuido principalmente a las pérdidas de esteroides libres que pueden haber formado micelas con jabones y luego se transfieren al jaboncillo (Verleyen *et al.*, 2002b). Contenidos de hasta un 21% de esteroides del aceite crudo pueden transferirse así a jabones (Ubhayasekera & Dutta, 2009).

La refinación clásica es absolutamente necesaria en aceites crudos de elevada acidez y/o alto contenido de pigmentos. El contenido de AGL es el factor principal que determina la cantidad y la concentración de sosa cáustica utilizada y también su exceso (10 a 20%) para una pérdida mínima de aceite y favorecer la reacción de saponificación. Sin embargo, es inevitable que se originen además una serie de reacciones secundarias, como son la saponificación de una pequeña parte de los triglicéridos, que se favorece por el tiempo de contacto entre el aceite y el álcali y por la presencia del jabón formado (Denise, 1983).

En la etapa de lavado y secado se reduce el contenido residual de jabones. Para bajar el contenido de jabones hasta 50 mg/kg como máximo, se procede a realizar varias etapas de lavado con 8-10% de agua caliente (90-95°C). El agua con los jabones disueltos se separa mediante centrifugación. El aceite lavado contiene entre 0,3-0,5% de agua.

La neutralización está considerada como la etapa de la refinación de mayor impacto económico, debido al número de separación de fases que están implicadas. Es en esta separación de aceite-agua donde se producen las mayores pérdidas en el proceso, ya que una pequeña cantidad de aceite neutro queda englobado en las denominadas “pastas de refinación”. Estos subproductos consisten principalmente en sales de sodio de los AGL neutralizados, aunque también contienen triglicéridos, gomas, proteínas, pigmentos y otros compuestos (Dumont & Narine, 2008).

#### *-Winterización/Descerado*

Se denomina así a la etapa que tiene por objeto principal eliminar las partículas sólidas que enturbian el aceite refinado final y provocan el rechazo del consumidor (De Greyt & Kellens, 2000). Se eliminan principalmente las ceras y triacilgliceroles saturados, aunque también se eliminan parcialmente ésteres de esteroides (Chalapoud *et al.*, 2017; Broughton *et al.*, 2018). Dichos compuestos no afectan negativamente el rendimiento o la funcionalidad del aceite, pero cambian su aspecto haciéndolo inaceptable para los consumidores.

El proceso normalmente utilizado es la cristalización y consiste en enfriar el aceite gradualmente a temperaturas entre 5 y 8°C en un tanque de maduración entre 24 y

48 h. Actualmente, el proceso se realiza mediante una cristalización inducida, en la que para la nucleación o formación de microcristales se utiliza el propio jabón de la etapa de neutralización, pasando después a la etapa de maduración o crecimiento de los cristales hasta tamaños macroscópicos.

Los sólidos se separan mediante centrifugación, lo que minimizan las pérdidas del proceso (Mastrobattista & Gabriele, 1992). También pueden ser eliminados por filtración, utilizando filtros de placas a vacío. Sin embargo, este proceso requiere un elevado coste de mantenimiento y mano de obra, y la necesidad de contar con espacios refrigerados. Por otra parte, el proceso de filtración es lento debido a la alta viscosidad que presenta el aceite a baja temperatura. Además, la naturaleza del medio filtrante influye en la estabilidad oxidativa del aceite (Günç Ergönül & Nergiz, 2015).

#### *-Decoloración*

En esta etapa, que es común tanto en la refinación física como en la química, se reduce el color del aceite debido a la adsorción de los pigmentos sobre tierras decolorantes. Los colorantes presentes en los aceites son pigmentos carotenoides y clorofílicos (Gandul-Rojas *et al.*, 1999). Durante la decoloración se adsorben también productos primarios y secundarios de oxidación, metales, jabones, compuestos fosfatídicos y hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Mag, 1990), así como ciertos componentes menores de interés, como los tocoferoles (Tasan & Dermici, 2005).

Las tierras decolorantes, naturales o activadas, son las más usadas para decolorar. Suelen ser normalmente bentonitas y montmorillonitas (silicatos aluminomagnésicos) con un rango de partícula comprendido entre 20 y 80  $\mu\text{m}$ . Las propiedades de mayor interés en las tierras, desde el punto de vista de la adsorción, son físicas (área superficial, centros activos en la superficie, tamaño de poro) y químicas (acidez y humedad). Por otra parte, el tamaño de partícula afecta a la filtrabilidad y a la retención de aceite. Desde el punto de vista industrial, los consumos normales de tierras decolorantes pueden oscilar entre 0,3% y 1% (Mag, 1990).

Otros adsorbentes de importancia son el carbón activo y las sílices sintéticas, que se aplican industrialmente con objetivos más específicos. El carbón activo es cada vez más utilizado para la eliminación de hidrocarburos aromáticos pesados, especialmente

en aceites de pescado y orujo, y otros contaminantes clorados de carácter tóxico (Pattersson, 1992). Las sílices sintéticas presentan una mayor selectividad para la adsorción de compuestos fosfatídicos, jabones y productos secundarios de oxidación (Bogdanor *et al.*, 1994; Hussin *et al.*, 2011). Estas sílices no adsorben directamente carotenoides y clorofilas, aunque facilitan la adsorción de estos compuestos cuando se utilizan conjuntamente con tierras, ya que eliminan previamente todos los compuestos que interfieren en su adsorción.

Otras propuestas para la decoloración térmica se relacionan también con la aplicación de campos eléctricos de alto voltaje con resultados prometedores (Abedi *et al.*, 2016)

Para una óptima adsorción de estos compuestos, el aceite debe estar exento de agua y de jabones que colmatarían las tierras. Se calienta el aceite a vacío a temperaturas entre 100 y 105°C, y se trata con tierra decolorante (1-2%) durante un tiempo de contacto íntimo que no debe exceder los 15 min para no provocar reacciones de hidrólisis.

La eliminación de los pigmentos clorofílicos es esencial ya que, a diferencia de los compuestos carotenoides que se eliminan durante la desodorización, no se eliminan en ninguna otra etapa de refinación.

Los principales factores que influyen en la decoloración por adsorción a una temperatura fija y propiedades fijas de los adsorbentes depende de la concentración de soluto y de la concentración de adsorbente.

Finalmente, la filtración debe eliminar completamente las tierras decolorantes, ya que actuarían como prooxidantes durante el almacenamiento del aceite debido a su contenido de hierro.

#### *-Desodorización*

La desodorización es la última etapa en el proceso de refinación de los aceites y grasas comestibles. El objetivo de la desodorización es eliminar los compuestos volátiles que afectan el sabor y el olor del aceite. Los AGL también son eliminados en esta etapa en la refinación física. También se eliminan los AGL residuales en el caso de

aceites neutralizados y decolorados. Para ello se procede a una destilación a vacío y a alta temperatura con arrastre con vapor de agua.

Entre los compuestos eliminados, los de mayor importancia desde el punto de vista sensorial son los aldehídos y cetonas originados en la escisión de los hidroperóxidos, todos ellos volátiles y con umbrales de percepción muy bajos (Hamilton, 1983; Akterian, 2009). Las condiciones de desodorización también favorecen la eliminación de contaminantes, incluidos los PAHs ligeros y los pesticidas, y mejoran la reducción del color como resultado de la descomposición a alta temperatura de los carotenos remanentes (Ruiz-Méndez *et al.*, 2013).

Por otra parte, es igualmente importante el mantenimiento de los componentes menores que tienen efectos positivos sobre la calidad y la estabilidad del aceite, como son esteroides y tocoferoles.

La eficiencia de esta etapa depende de la presión (1 a 5 Torr), temperatura (180 a 270°C), tiempo (0,5 a 3 h) y vapor (1 a 3%). La combinación de vacío con arrastre de vapor se utiliza para aumentar la eficacia de la destilación. Estos límites de temperatura vienen establecidos por las reacciones químicas de descomposición e hidrólisis que se producen durante esta etapa (Sjöberg, 1991), aunque es recomendable utilizar temperaturas superiores a 200°C cuando se desea obtener un efecto decolorante adicional, ya que a estas temperaturas tiene lugar una rápida descomposición de carotenoides y también de peróxidos (Ouyan *et al.*, 1980). El tiempo mínimo requerido depende normalmente del grado de decoloración térmica que se desea obtener. Este tiempo varía con el tipo de aceite y con la calidad inicial del mismo (Sjöberg, 1991) y está directamente relacionado, lógicamente, con la temperatura utilizada, ya que la presión de vapor de los constituyentes volátiles aumenta con la temperatura. Este proceso se puede realizar de manera discontinua, semicontinua y continua (Balchen, 1999).

Largos tiempos de desodorización y/o temperaturas demasiado altas pueden tener un efecto devastador en la calidad del aceite, no sólo debido a los cambios químicos comentados anteriormente, sino también a la destilación de una parte

significativa de los esteroides y tocoferoles libres naturales (20 a 40%), cuya eliminación disminuiría la estabilidad del aceite refinado (Ergönül & Köseoğlu, 2014).

#### 1.4.3.1 Efecto del proceso de refinación en el contenido y composición de los fitosteroides presentes en el aceite

Los fitoesteroides se eliminan parcialmente durante el proceso de refinación y la magnitud de la pérdida depende en gran medida de las condiciones aplicadas en las diferentes etapas del proceso. La mayoría de los autores coinciden en que la mayor disminución en el contenido total de esteroides se registra durante la neutralización y la desodorización (Gutfinger & Letan, 1974; Ferrari *et al.*, 1996; Ortega-García *et al.*, 2006). En esta última se debe a la presión de vapor relativamente alta, a las temperaturas elevadas y al alto vacío (Antonopoulos *et al.*, 2006).

La disminución en el contenido total de esteroides se debe principalmente a la formación de esteradienos y diesteril éteres en la decoloración, especialmente cuando se utilizan tierras activadas con ácido. Los esteradienos son esteroides deshidratados que han perdido el grupo hidroxilo y contienen un doble enlace adicional. El 3,5-Estigmastadieno, derivado de la deshidratación del  $\beta$ -Sitosterol, es el esteradieno más abundante en los aceites vegetales (Verleyen *et al.*, 2002c). Los esteradienos también pueden formarse en la etapa de desodorización por efecto de la temperatura, pero en menor proporción que en la decoloración. Además, éstos son también eliminados por destilación y, por tanto, los niveles adicionales de estos compuestos por efecto de la temperatura de desodorización son muy bajos (Cert *et al.*, 1994).

Los diesteril éteres son productos de condensación de esteroides y esteroides oxidados (Verleyen *et al.*, 2002a).

Además, también se ha observado esterificación de esteroides libres durante el proceso de refinación (Sciancalepore, 1981; Verleyen *et al.*, 2002c; Ortega-García *et al.*, 2006).

Por otra parte, se puede dar hidrólisis ácida de los ésteres de esteroides con la tierra decolorante (Verleyen *et al.*, 2002b). Dicha pérdida total durante el proceso de refinación puede oscilar entre 10 y 70% del contenido total de esteroides en el aceite crudo, dependiendo de las condiciones empleadas, aunque la composición de fitoesteroides no se altera durante el proceso de refinación (Ferrari *et al.*, 1996; Naz *et*

*al.*, 2011). No obstante, se modifica la relación entre esteroides esterificados y esteroides libres (Sciancalepore, 1981; Verleyen *et al.*, 2002b; Ortega-García *et al.*, 2006).

## **2 OBJETIVOS DEL TRABAJO**

---

Esta tesis forma parte de un proyecto de investigación dirigido a obtener semillas de girasol con alto contenido en fitoesteroles y con composiciones de fitoesteroles modificadas. El objetivo principal del presente trabajo de tesis ha consistido en caracterizar los aceites crudos obtenidos de las nuevas líneas de girasol de semillas procedentes de dos cosechas (2015 y 2017), con especial interés en los aceites de prensa frente a los de disolvente, y determinar las condiciones de refinación más apropiadas para obtener aceites comestibles con las mínimas pérdidas posibles de fitoesteroles. Para ello, han sido necesarios los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollo de una metodología analítica rápida para determinar, por un lado, la composición de ácidos grasos y, por otro, los contenidos de fitoesteroles sin la extracción de la fracción insaponificable. Dicha metodología ayudaría a mejorar no sólo los análisis de control realizados en el sector industrial, sino también en estudios donde las cantidades de muestra a analizar son pequeñas.

2. Determinar la influencia del proceso de extracción mediante presión y disolvente en la composición de los nuevos aceites, ácidos grasos y componentes menores, especialmente fitoesteroles. En la práctica industrial, el aceite se obtiene por presión de la semilla y, a continuación, con disolvente de la torta prensada. Ambos se mezclan dando lugar a lo que se denomina aceite crudo, que debe ser posteriormente refinado. Sin embargo, el aceite de presión, obtenido sin disolvente, puede presentar un valor añadido que invite a comercializar ambos aceites de forma separada. En este sentido, este objetivo permitiría además establecer la viabilidad de los aceites de prensa obtenidos como aceites vírgenes de semilla.

3. Conocer la influencia del proceso de refinación en los contenidos de compuestos menores, con especial interés en fitoesteroles, y establecer diferencias entre los procesos de refinación física y química.

4. Caracterizar los compuestos volátiles de los aceites vírgenes y refinados. Estos componentes determinan las características sensoriales de los aceites y podrían ser de utilidad para diferenciar los nuevos aceites de los aceites de girasol o de otros aceites vegetales.



### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

---



### **3.1 REACTIVOS Y MUESTRAS**

#### **3.1.1 Reactivos**

Todos los reactivos y disolventes utilizados indicados a continuación fueron de calidad para análisis.

- Acetato de etilo, n-hexano (95%), éter dietílico, cloroformo, hidróxido potásico, hidróxido sódico (85%), metanol, metóxido sódico (30%), ácido fosfórico y fenoltaleína fueron suministrados por Panreac Química SLU (Castellar del Vallès, Barcelona, España).
- Diclorometano, n-heptano y ciclohexano se adquirieron por Carlo Erba Reagents S.A.S (Val de Reuil, Francia).
- Ácido sulfúrico (95-97%) y ácido benzoico fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).
- Ácido acético glacial y sulfato sódico anhidro se obtuvieron de Quality Chemicals (Esparreguera, Barcelona, España).
- Etanol (96%) y etanol absoluto fueron proporcionados por VWR Chemicals (Fontenay-Sous-Bois, Francia).
- Piridina, hydranal Coulomat AG y reactivo silanizante (BSTFA + 1% TMCS) fueron suministrados por Sigma-Aldrich S.A. (S. Louis, USA).
- Trisyl y tierras decolorantes (TONSIL Optimum 278 FF y TONSIL Supreme 114 FF) fueron suministrados por Clariant Ibérico producción S.A. (Toledo, España).

#### **3.1.2 Patrones cromatográficos**

Todos los patrones y mezclas utilizados fueron de pureza cromatográfica del 99%. Se utilizaron 5- $\alpha$ -Colestan-3-ol, estearato de colesterilo, 4-metil-2-pentanol, y tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), que fueron suministrados por Sigma-Aldrich S.A. (S.Louis, USA).

## Muestras

Las muestras utilizadas fueron:

-Aceites de colza, girasol y soja suministrados por Lesieur (Clichy, Francia) y utilizados en el desarrollo de la nueva metodología analítica propuesta. Los aceites de colza y girasol fueron suministrados crudos, mientras que el aceite de soja se recibió refinado. Los aceites crudos se filtraron para eliminar las partículas sólidas en suspensión y la humedad. Se usaron dos aceites de colza de diferentes lotes con valores de acidez de 1,8 y 1,9%, respectivamente. El aceite de soja presentó una acidez de 0,05%.

-El Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC de Córdoba facilitó tres muestras de semillas procedentes de híbridos enriquecidos en fitoesteroles. Una muestra con referencia GF-8 fue utilizada como muestra control en los estudios genéticos. A pesar de estar enriquecida en fitoesteroles, la muestra GF-8 también fue considerada muestra Control en el presente trabajo de Tesis, ya que su contenido total de fitoesteroles se encontraba dentro del rango establecido para aceites de girasol no modificados. Las otras dos muestras de semilla estaban enriquecidas en Campesterol (GF-2) y  $\Delta^7$ -Estigmastenol (GF-7), respectivamente. Las tres líneas fueron desarrolladas por recombinación a partir de germoplasma, seleccionando poblaciones detalladas en los estudios realizados por Fernández-Cuesta *et al.* (2014b). Se estudiaron semillas de dos cosechas distintas, 2005 y 2007.

### Características del crecimiento de las semillas

La siembra de 2015 se produjo el día 27 de marzo. El 50% de las plantas se encontraron en floración el 2 de junio, mientras que la maduración tuvo lugar el 17 de julio, teniendo en cuenta que el 50% de las plantas estaban maduras.

En el 2017 la siembra fue más tardía, el 13 abril, la floración se produjo el 6 junio, con el 50% de las plantas en floración, y la maduración el 15 julio.

En la Tabla 11 podemos observar para cada cosecha la Temperatura mínima, máxima y temperatura media diaria expresada en °C. Además también se muestra la radiación solar en MJ/m<sup>2</sup> día y la cantidad de precipitación por día (mm/día).

**Tabla 11.-** Datos meteorológicos de cada cosecha

<b>Año</b>	<b>Precipitación (mm/día)</b>	<b>T<sub>MAX</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>MIN</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>MED</sub> (°C)</b>	<b>Radiación solar (MJ/m<sup>2</sup> día)</b>
2015	0,47	36,57	17,43	27,53	23,30
2017	0,48	37,73	20,02	29,00	27,45

T<sub>MAX</sub>: temperatura máxima; T<sub>MIN</sub>: temperatura mínima; T<sub>MED</sub>: temperatura media.

El volumen de muestra de semillas de 2015 fue de 1 kg de Control, 3 kg de semilla GF-2 y 5 kg de semilla GF-7. En 2017 se recibieron 13 kg de Control, 3 kg de GF-2 y 5 kg de GF-7. En la Figura 8 se ilustran las diferencias morfológicas de las tres líneas (Figura 8).



**Figura 8.-** Muestras de semillas Control, GF-2 y GF-7, respectivamente, pertenecientes a la cosecha 2017.

## 3.2 EXTRACCIÓN DE ACEITE

Las semillas de girasol fueron sometidas a un procedimiento de extracción por presión seguido de extracción con disolvente.

Las semillas íntegras se sometieron a un tratamiento previo de acondicionado, en estufa a 60°C durante 1 h, con un 10% p/p de agua destilada añadida. Las normas IUPAC establecen un mínimo de 10% de humedad en material oleaginoso para cuantificar su contenido total de aceite por Soxhlet (Paquot, 2013). En un estudio reciente se confirma que aproximadamente un 12% de humedad genera una mejora de rendimiento de aceite y un aumento en la cantidad total de compuestos menores extraídos (Pérez *et al.*, 2019).

Los procesos de extracción de aceite fueron replicados en muestras seleccionadas. La muestra Control se utilizó en su totalidad, mientras que la muestra GF-2 de 2015 se dividió en dos porciones y GF-7 de la misma cosecha en tres. Cada una de estas porciones recibió los mismos tratamientos de extracción, y los aceites obtenidos fueron tratados como muestras independientes. Sin embargo, para cada muestra, estas porciones fueron mezcladas entre sí y la mezcla resultante fue la que se utilizó en los estudios de refinación.

### 3.2.1 Extracción por presión

El Instituto de la Grasa-CSIC dispone de una Prensa de presión Taby tipo 40A (Pressen, Orebro, Suecia) que se muestra en la Figura 9.

La semilla acondicionada se introduce en el *expeller* mediante la tolva (1) en la cámara de prensado. A través de la abertura de la boquilla (6) es expulsada la mayor parte del material sólido, bajo la forma de pellets cilíndricos, que pasan a constituir la torta (Figura 9).



**Figura 9.-** Prensa TABY 40A

En todos los casos se realizaron dos pases del material por la prensa para extraer la mayor cantidad de aceite. La prensa utilizada no permite modificar las condiciones de operación. La velocidad de giro del tornillo fue de 70 rpm y el diámetro de la boquilla utilizada de 8,5 mm d.i. El aspecto de los pellets obtenidos se puede observar en la Figura 10.

El aceite crudo se recogió en un vaso de precipitado, se filtró para eliminar impurezas sólidas y se conservó en cámara de refrigeración hasta su posterior análisis y refinación.

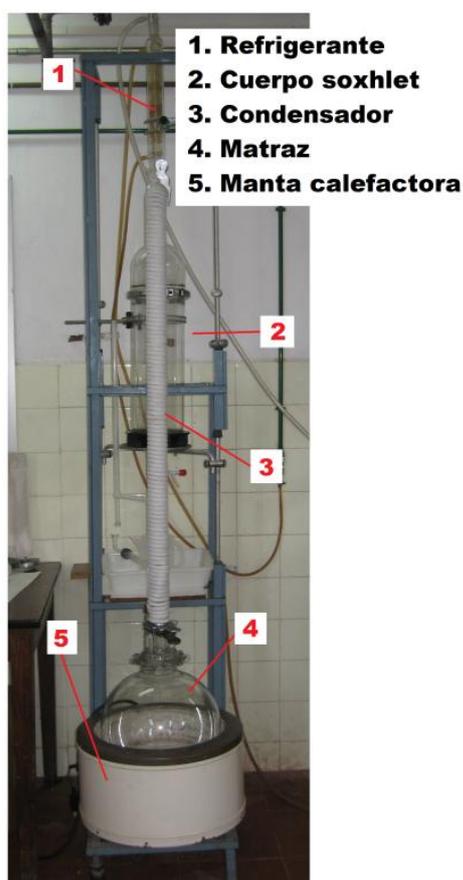


**Figura 10.-** Pellets obtenidos tras la extracción con prensa.

### 3.2.2 Extracción con disolvente

El aceite retenido en los *pellets* obtenidos en la extracción por presión, se sometió a extracción con hexano, disolvente con alta afinidad por las grasas y punto de ebullición bajo, mediante dos equipos de distinta capacidad, 2 y 25 kg respectivamente.

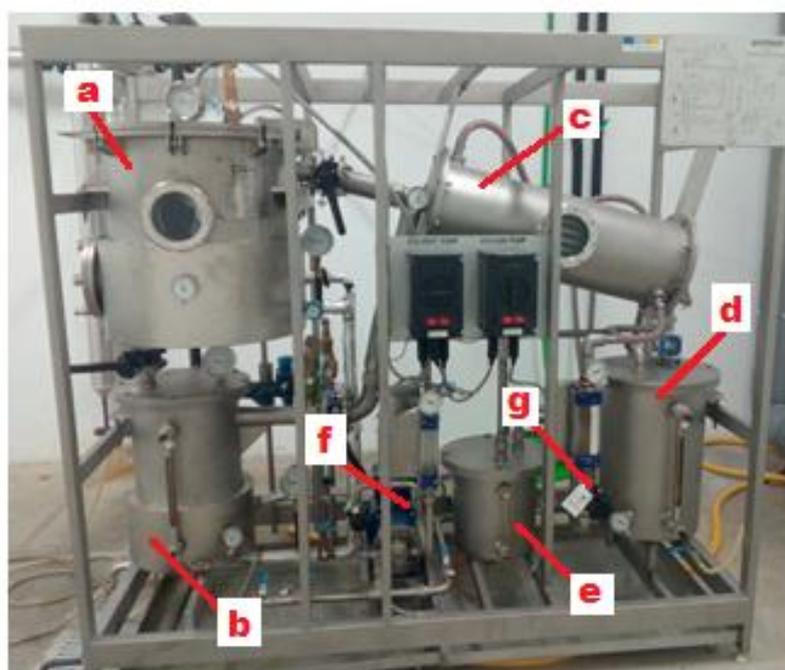
El equipo de 2 kg de capacidad fue un Soxhlet, similar a los de laboratorio (Figura 11). Se utilizó sólo para las muestras de 2015. Los *pellets* obtenidos en la prensa se introdujeron en un cartucho de extracción, que se colocó dentro del cuerpo Soxhlet (2), al que se adaptó un matraz redondo (4), el refrigerante (1) y el condensador (3). En el matraz se introdujeron 2 ó 3 trozos de plato poroso para facilitar la ebullición con 2,5 L de disolvente. El sistema se calentó a 60°C y el aceite se extrajo durante un periodo de 4 h. A continuación, se eliminó el disolvente, se secó en corriente de nitrógeno hasta peso constante y se conservó en cámara de refrigeración hasta su posterior análisis y



**Figura 11.-** Equipo de extracción por disolvente (2 kg).

refinación.

El equipo de extracción por disolvente de 25 kg de capacidad fue un extractor de disolvente Armfield FT29, diseñado para investigar procesos industriales en plantas piloto (Figura 12). Éste sólo se utilizó para las muestras de 2017. El procedimiento de extracción es similar al de un Soxhlet, pero difiere en su mayor capacidad y en el uso de vacío para garantizar su seguridad. Usando una combinación de calor, vacío y vapor directo, el disolvente puede separarse del aceite para ser reutilizado. Los *pellets* extraídos se desolventizan y se pueden utilizar como alimento para animales. Los principales elementos del equipo son extractor/desolventizador (a), tanque miscela (b), condensador (c), tanque separador disolvente/agua (d), tanque de agua residual (e), bomba de disolvente (f) y bomba de vacío (g) (Figura 12).



**Figura 12.-** Equipo de extracción por disolvente (25 kg).

### **3.3 REFINACIÓN DE ACEITES**

Los aceites crudos, prensa y disolvente, fueron refinados por separado mediante procesos físicos o químicos. Por sus bajos contenidos en fosfolípidos, clorofilas y AGL, los aceites de prensa, en general, pueden ser sometidos a una refinación física, constituida por una etapa de decoloración seguida de desodorización. Cuando el contenido de fosfolípidos y/o pigmentos es elevado, como ocurre en aceites extraídos con disolvente, es necesaria una refinación química. Ésta debe tener antes de la decoloración, una etapa de desgomado, para la eliminación de fosfolípidos, y, a continuación, una etapa de neutralización de AGL en condiciones básicas, donde parcialmente también se eliminan pigmentos. La eliminación de fósforo hasta niveles por debajo de 10 mg/kg es esencial para llevar a cabo la desodorización. En caso contrario, se produciría pardeamiento de los aceites como consecuencia de las elevadas temperaturas del proceso.

#### **3.3.1 Refinación física**

Los aceites de prensa de la cosecha 2015 fueron sometidos a refinación física en dos etapas, decoloración y desodorización (descritos en el apartado 3.3.2), debido a que el contenido en fósforo fue menor a 10 mg/kg.

#### **3.3.2 Refinación química**

A diferencia de los aceites de prensa de 2015, los aceites de la cosecha de 2017 fueron refinados mediante refinación química, debido a su elevado contenido en fósforo. El proceso consistió en desgomado, neutralización, decoloración y desodorización. Las condiciones utilizadas se describen en los siguientes apartados.

##### *3.3.2.1 Desgomado*

En un agitador de palas se atemperó el aceite a 40°C y se añadió ácido fosfórico en una cantidad de 0,1% (p/p) para los aceites de prensa y 0,2% (p/p) para los de

disolvente. El ácido fosfórico se añadió utilizando una mezcla de fósforo y agua en la misma proporción en peso. La mezcla de aceite y agua se agitó vigorosamente durante 5 min. De esta forma, los fosfolípidos precipitaron en medio ácido.

#### *3.3.2.2 Neutralización*

Los AGL fueron neutralizados con una solución de hidróxido sódico. Sin separar las gomas de la etapa anterior, se añadió hidróxido sódico con una concentración adecuada, según el nivel de acidez, y en cantidad suficiente para la neutralización de los AGL, así como del ácido mineral añadido, más un exceso de 10% para asegurar el desplazamiento de la reacción hacia la formación de jabones. La adición se realizó con agitación de paleta a 40°C y la temperatura se subió a 80°C, manteniendo la mezcla a esta temperatura durante 10 min. Los jabones resultantes, junto con los fosfolípidos hidratados en la etapa anterior, fueron eliminados mediante lavado y centrifugación. La centrifugación se llevó a cabo a 1295 g durante 10 min.

#### *3.3.2.3 Lavados*

Se lavaron los aceites obtenidos en la etapa anterior con tres porciones sucesivas de 15% de agua durante 10 min a 90°C y con agitación de paleta. A continuación, se separaron las aguas de lavado mediante centrifugación a 1295 g durante 10 min.

#### *3.3.2.4 Decoloración*

El procedimiento utilizado se basó en el propuesto en el Anexo XIII del Reglamento (CEE) N° 2568/91 de la comisión de 11 de julio de 1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva.

Se realizaron varias pruebas de decoloración, modificando tanto la cantidad de tierra decolorante y Trisyl como el tipo de tierras con distinta capacidad de adsorción. Se utilizó como parámetro de control la eliminación de metales. Las tierras decolorantes fueron Tonsil optimum 278 FF y Tonsil supreme 114 FF, cuyas composiciones químicas se recogen en la Tabla 12. Ambas tierras son Bentonitas de calcio; la primera, no activada, y la segunda activada con ácido con una estructura interna altamente porosa y con multitud de sitios ácidos sobre su superficie. Las dos tienen un excelente rendimiento de filtración.

**Tabla 12.-** Composición química de las tierras decolorantes empleadas en los ensayos de decoloración (%).

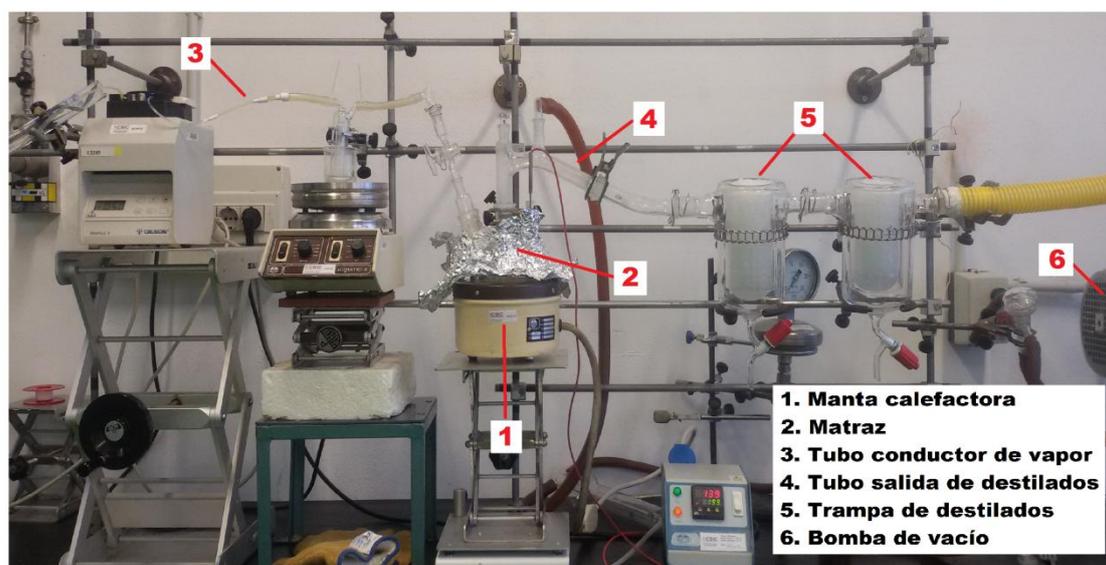
	<b>278 FF</b>	<b>114 FF</b>
SiO <sub>2</sub>	52,5	69,3
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8,3	14,0
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3,3	3,3
CaO	2,3	0,9
MgO	17,3	2,0
Na <sub>2</sub> O	0,8	0,6
K <sub>2</sub> O	2,0	1,7

El aceite neutro se introdujo en un matraz y se calentó hasta 95°C, con agitación y a vacío. Cuando llegó a la temperatura establecida se añadió Trisyl y tierra decolorante. Se restableció el vacío y se mantuvo a una temperatura de 95°C, durante 10 min con agitación. Al finalizar el tiempo estipulado, el aceite fue filtrado mediante filtro MilliPore a vacío y se mantuvo en condiciones óptimas de conservación.

### 3.3.2.5 Desodorización

Con la desodorización se eliminaron los compuestos responsables del olor y del sabor de los aceites, compuestos volátiles, principalmente aldehídos y cetonas. La desodorización es fundamentalmente un proceso de destilación con vapor que se lleva a cabo a bajas presiones (2-6 mbares) y elevadas temperaturas (180-270°C).

El sistema de laboratorio que se utilizó se muestra en la Figura 13. El aceite decolorado se introdujo en el matraz (2) del esquema, el cual se calentó mediante una manta calefactora semiesférica con un termorregulador. El tubo (3) dirigió el vapor de agua hacia el fondo del matraz del desodorizador, cuyo flujo se reguló mediante una válvula. El tubo de salida (4) dirigió los vapores hacia las trampas (5) que recogieron el material condensable y evitaron que pasasen a la bomba de vacío (6).



**Figura 13.-** Sistema de desodorización.

La fuente de vapor de agua fue suministrada desde una probeta de 50 mL conteniendo agua que se conectó a una bomba peristáltica para regular el flujo de entrada. El agua se hizo pasar por un separa-gotas termostatzado y finalmente se introdujo en el matraz redondo que contenía el aceite a través de un difusor (Figura 13).

El calentamiento hasta la temperatura estipulada se realizó de la forma más rápida posible y la desodorización se llevó a cabo bajo un vacío de 0,5-1 mmHg, un flujo de vapor de 0,50 mL/min, durante 2 h a 200°C, contadas a partir del momento en que se alcanza la temperatura de operación. Al final del tiempo estipulado, se enfrió el aceite y el vacío se reemplazó por atmósfera de nitrógeno. Una vez desodorizado, el aceite se filtró con papel para mejorar su brillo y se conservó en refrigeración para su posterior análisis.

## 3.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

### 3.4.1 Humedad y materias volátiles en semillas

Se siguió el procedimiento recogido en la Norma UNE 55-082-73. En primer lugar, se realizó la preparación de la muestra, se le retiró cualquier tipo de impureza visible como piedras, hojas y se pasó por molinillo para ser triturada.

Se pesó una cápsula desecada previamente en estufa a 103-105°C y enfriada en un desecador, con exactitud de 0,001 g, anotando su peso, P1. Sobre la cápsula tarada, se pesó una cantidad aproximada de 5 a 10 g de muestra, anotando su peso P2. Se colocó en la estufa, previamente estabilizada a una temperatura de 70°C y se hizo vacío a 0,5 mbar durante 1 h.

Transcurrido el tiempo en estufa se sacó y se pasó a un desecador, donde se dejó enfriar, pesando a continuación. Repitiendo esta operación (en las mismas condiciones, excepto el tiempo, será de 30 min) sucesivamente hasta que la diferencia entre las dos últimas pesadas no fuese superior al 0,05%.

Los resultados se expresaron en tanto por ciento de humedad y materia volátil:

$$\text{Humedad y materia volátil (\%)} = \frac{(P3-P1)}{P2} \cdot 100$$

donde

P1; peso de la cápsula vacía, desecada y fría.

P2; peso de muestra a determinar.

P3; peso final de la cápsula con muestra desecada y fría.

### 3.4.2 Materia grasa en semillas oleaginosas

Esta determinación se aplicó a semillas oleaginosas y a los *pellets* procedentes de la extracción con disolvente realizada en planta piloto.

La determinación se realizó con hexano en un equipo Soxhlet según el procedimiento operatorio descrito en la norma UNE 55-062-80 que se resume a continuación.

Se pesó 10-15 g de muestra molida en una cápsula tarada, con precisión del mg. Se pasó la mezcla a un cartucho de extracción haciendo el trasvase de forma cuantitativa. El cartucho se taponó con algodón, se introdujo en el Soxhlet, se adaptó a un matraz previamente desecado y tarado conteniendo 2 ó 3 trozos de plato poroso para facilitar la ebullición. Al matraz se le añadió 150 mL de hexano. Se mantuvo en ebullición suave durante 4h. Se interrumpió la calefacción y se destiló el disolvente, las últimas trazas se eliminaron con nitrógeno. Se dejó enfriar en el desecador y se pesó.

Los resultados se expresaron en porcentaje de aceite:

$$\text{Aceite (\%)} = 100 \cdot \frac{P}{M}$$

donde

P; peso del extracto recogido en el matraz.

M; peso muestra, expresada en gramos.

### 3.4.3 Acidez libre

El grado de acidez es el porcentaje de AGL que contiene un aceite o grasa expresado normalmente como ácido oleico. Su determinación se realizó mediante volumetría ácido-base, según el procedimiento descrito en la norma UNE 55011-73.

#### *Procedimiento analítico*

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se adicionó 50 mL de una mezcla, a volúmenes iguales, de alcohol etílico de 96° y éter dietílico, y varias gotas de disolución alcohólica de fenolftaleína al 1%. La mezcla se neutralizó con una disolución de hidróxido potásico 0,1M hasta viraje incipiente del indicador.

En otro matraz Erlenmeyer igual al anterior se pesaron de 2 a 20 g de aceite con exactitud del mg. El consumo de disolución alcalina no deberá exceder en la valoración

un volumen de 20 mL. El disolvente neutralizado se vertió en el matraz y se agitó hasta conseguir la disolución completa de la grasa. Seguidamente se valoró con una disolución de hidróxido sódico 0,5 ó 0,1 M según fuese la acidez de la muestra. La adición de hidróxido sódico se hizo agitando constantemente, dándose por terminada la valoración cuando la adición de una sola gota produjo un viraje débil, pero definido, que persistió durante unos segundos.

El grado de acidez se expresó en porcentaje de ácido oleico:

$$\text{Grado de acidez (\% ácido oleico)} = \frac{P_m \cdot V \cdot M}{10 \cdot P}$$

donde:

P<sub>m</sub>; peso molecular del ácido con relación al cual se expresa la acidez (282 para el ácido oleico).

V; volumen consumido, expresado en mL, de la disolución de hidróxido potásico

M; molaridad de la disolución alcalina utilizada.

P; peso de la materia grasa, en gramos.

#### **3.4.4 Composición de ácidos grasos**

Para la determinación de la composición de ácidos grasos en aceite se aplicó el método de preparación de ésteres metílicos IUPAC 2.301 y el método de análisis por cromatografía gas-líquido IUPAC 2.302.

##### *Preparación de muestra*

Se pesaron 50 mg de muestra, con exactitud de miligramo, en un tubo de ensayo de 20 mL, se añadió 5 mL de metilato sódico 3% en metanol, plato poroso, se agitó y se metió en el baño cubriendo el contenido del tubo a 80°C, se mantuvo durante 10 min. Transcurrido el tiempo se sacó del baño y se dejó enfriar. A continuación, se añadieron unas gotas del indicador de fenolftaleína, la solución se volvió rosa, y fue añadida la cantidad necesaria de sulfúrico en metanol al 4% hasta que desapareció el color rosa, aproximadamente 5 mL, se agitó e introdujo en el baño nuevamente durante 10 min. A

continuación, se dejó enfriar y se añadió 2 mL de hexano, se agitó vigorosamente y se esperó a que se separasen dos fases. En el caso de que no se separe en dos fases se añade agua destilada hasta completar el volumen del tubo. Se recogió el disolvente y se llenó el vial de cromatografía. Se inyectó un volumen de 1 µL de la solución en el cromatógrafo.

#### *Análisis cromatográfico*

Se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies (AT) 6890. Equipado con un inyector split / splitless, una columna capilar AT INNOWAX (100 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 mm de espesor) y un detector de ionización de llama. La temperatura del inyector fue de 225°C con una división de 40:1. El gas portador fue hidrógeno, con una velocidad de flujo de 1.2 mL/min. Los análisis se realizaron aplicando una temperatura inicial de 180°C durante 9 min, aumentando a 220°C a 3°C/min y, por último, se mantuvo a 220°C durante 15 min. El tiempo total del análisis fue de 37,33 min. La temperatura del detector de ionización de llama fue de 250°C.

El contenido de cada ácido (Cx) en la muestra fue expresado en porcentaje de ácido graso en relación con el total de ácidos grasos.

$$C_x (\%) = \frac{\text{Área de } C_x}{\text{Área total}} \cdot 100$$

#### **3.4.5 Composición y contenido total de fitosteroles**

Se siguió el Método CEE 2568/91 modificado por UE N° 1348/2013 anexo IV; COI T.20 Doc. 30 Rev. 2013.

Este procedimiento consta de 3 etapas que se describen a continuación;

##### *a) Saponificación de la grasa y extracción de la materia insaponificable*

En un matraz redondo de fondo plano de 250 mL se añadió 1 mL de una disolución de α-colestanol (1 mg/mL) en cloroformo, utilizando como patrón interno. Una vez eliminado el disolvente con nitrógeno, se pesó 2 g de aceite con exactitud de miligramo. Se añadieron 50 mL de KOH etanólica 2M y se mantuvo en ebullición

durante 1 h con plato poroso. Se retiró el matraz, se dejó enfriar y se añadió 100 mL de agua. A continuación, se traspasó el contenido del matraz a un embudo de extracción de 500 mL. Se realizaron tres extracciones con 80 mL de éter etílico cada vez y se reunió las tres fracciones etéreas en un embudo de decantación de 500 mL. La fase etérea se lavó varias veces con agua destilada hasta que la fase acuosa presentó reacción neutra con fenolftaleína. En el primer lavado se utilizó 125 mL y en los restantes 50 mL de agua, para eliminar totalmente los jabones. Se traspasó la fase orgánica a un matraz previamente tarado, se eliminó completamente el disolvente en un rotavapor y se terminó el secado hasta alcanzar peso constante, usando una estufa calentada a 103°C durante 15 min y un desecador para enfriar el matraz.

El porcentaje de la fracción insaponificable se determinó aplicando la siguiente expresión:

$$\text{Insaponificable (\%)} = \frac{100 \cdot P_1}{P_0}$$

donde

P<sub>1</sub>; peso en gramos del extracto.

P<sub>0</sub>; peso en gramos de la muestra de aceite.

A continuación, se disolvió el insaponificable en acetato de etilo. Para el cálculo exacto del volumen de acetato de etilo a añadir se aplicó la siguiente fórmula:

$$V \text{ (mL)} = 20 \cdot P$$

donde P; peso en gramos del insaponificable.

#### *b) Fraccionamiento del insaponificable mediante cromatografía en placa fina.*

En una placa cromatográfica de gel de sílice (60 G, 0,25 mm de espesor) se extendió 0,3 mL de muestra. Se depositó como referencia  $\alpha$ -colestanol. La placa sembrada se desarrolló con una mezcla hexano:éter dietílico (70:30).

Finalizado el proceso, para identificar la banda esterólica, la zona de la referencia se quemó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50%. Se raspó la banda, y se colocó el raspado en un embudo con papel de filtro. Se realizaron extracciones con 10 mL de acetato de etilo y 3

porciones de 10 mL de éter. El extracto se recogió en un matraz con forma de corazón de 50 mL.

*c) Análisis por cromatografía gaseosa de los componentes de la fracción esterólica.*

El extracto recogido se secó en un rotavapor y se le añadió 200 µL de reactivo silanizante (BSTFA+TMCS 99:1, mezclado en proporción 1:1 con piridina). Se calentó levemente la punta del matraz para eliminar posibles restos de humedad y se esperó 15 min. A continuación, el contenido del matraz se trasvasó a un vial de cromatografía con inserto y se analizó mediante cromatografía gaseosa.

*Análisis GC, inyector PTV*

Se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies (AT) 7890A, equipado con un inyector PTV (vaporizador de temperatura programada), una columna capilar de sílice fundida HP-5 (5% difenil- 94% dimetil- 1% vinilpolisiloxano), de 30 m x 0,32 mm I.D. y 0,25 µm de espesor, y un detector de ionización de llama. La fracción silanizada se diluyó con 1 mL de n-hexano y se inyectó un volumen de 1 µL en el cromatógrafo.

Se aplicó el modo de venteo de disolvente utilizando una temperatura inicial de 80°C, 20 psi, un flujo de purga de 3 mL/min y un flujo de venteo de 50 mL/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 80°C durante 1 min, posteriormente se aumentó a 280°C a una velocidad de 700 °C/min y a continuación se reestablecieron las condiciones iniciales. Se utilizó hidrógeno como gas portador a una presión constante de 15 psi. El programa de temperatura del horno aplicado comenzó a 80°C durante 1 min, se aumentó a 200°C a 40°C/min y se mantuvo durante 3 min, y posteriormente se volvió a aumentar a 300°C a 4°C/min, y se mantuvo durante 10 min. La temperatura del detector fue de 325°C.

*Análisis GC, inyector Split-Splitless*

Se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies (AT) 7890A, equipado con un inyector split-splitless, o inyector con división, usando una división 10:1, una columna capilar de sílice fundida HP-5 (5% difenil- 94% dimetil- 1% vinilpolisiloxano), de 30 m x 0,32 mm I.D. y 0,25 µm de espesor, y un detector de ionización de llama.

La temperatura del inyector fue de 275°C. La temperatura del horno se mantuvo a 260°C durante 40 min. La temperatura del detector fue de 320°C. Se utilizó hidrógeno como gas portador a presión constante de 15 psi. Se inyectó directamente en el cromatógrafo un volumen de 1 µL de la fracción silanizada.

El contenido de cada fitoesterol (Cx) en la muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$C_x (\%) = \frac{\text{Área de } C_x}{\text{Área total}} \cdot 100$$

La cuantificación de los diferentes fitoesteroles se llevó a cabo teniendo en cuenta el mismo factor de respuesta que el del patrón interno.

#### *3.4.5.1 Nueva metodología analítica para una determinación más rápida de la composición de ácidos grasos y fitoesteroles en aceites de semillas*

Una alícuota de 50 mg de aceite se transmitió en un tubo de ensayo Pyrex® con tapón de rosca (20 cm x 20 mm O.D.) con 5 mL de solución de metilato sódico al 3% en metanol a 80°C durante 30 min. Posteriormente, para la metilación de AGL, se añadió una solución de ácido sulfúrico al 4% en metanol y la reacción se llevó a cabo a 80°C durante 30 min. Para evitar la presencia de oxígeno y con ello la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados durante la reacción de metilación, los reactivos, esto es las dos soluciones metanólicas, se purgaron previamente con borboteo de nitrógeno durante 10 min. Además, el tubo de reacción fue sometido a una corriente de nitrógeno para desplazar el aire en el espacio de cabeza antes de cada reacción y se cerró el tubo. Como en el método oficial, el  $\alpha$ -colestanol se usó como patrón interno en el análisis de fitoesteroles (50 µL, 0,5 mg/mL). La fracción de lípidos se extrajo tres veces con n-hexano (2 mL cada una), se lavó dos veces con agua (2 mL cada vez) y se secó con sulfato de sodio anhidro. Finalmente, el disolvente se evaporó bajo nitrógeno y el aceite derivado se redisolvió en 1 mL de hexano para el fraccionamiento por extracción en fase sólida.

Se usaron cartuchos de aminopropilo (NH<sub>2</sub>-500 mg, 3 mL) (Agilent Technologies). Los cartuchos se acondicionaron utilizando, respectivamente, 3 mL de metanol, 3 mL de acetona y 4 mL de n-hexano. Una primera fracción que contenía

ésteres metílicos de ácidos grasos se eluyó con 8 mL de n-hexano/diclorometano (90:10, v/v) (fracción A) y se obtuvo una segunda fracción que contenía los fitoesteres con 7 mL de n-hexano/acetato de etilo (40:60, v/v) (fracción B).

La fracción A se analizó directamente por cromatografía de gases para determinar la composición de ácidos grasos, de acuerdo con el método IUPAC 2.302. Las condiciones del cromatógrafo fueron las mismas que las descritas anteriormente para el método oficial (apartado 3.4.4).

Para el análisis de fitoesteres, el disolvente de la fracción B se eliminó a 60°C bajo vacío en un rotavapor. Como se describió anteriormente para el método oficial, el extracto seco se silanizó con 200 µL de reactivo silanizante (BSTFA+TMCS 99:1, mezclado en proporción 1:1 con piridina) y se calentó levemente el matraz de reacción para eliminar posibles restos de humedad. Tras esperar 15 min, la muestra silanizada se analizó mediante cromatografía gaseosa. Además, el cromatógrafo y las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las descritas anteriormente para el método estándar de fitoesteres (apartado 3.4.5).

#### *Identificación de fitoesteres*

Para la identificación de fitoesteres se utilizó un cromatógrafo de gases Finnigan Trace-GC 2000 acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica “Polaris-Q Ion” (ThermoFinnigan, Austin, TX, EE. UU.) Se usó el modo de fraccionamiento múltiple MS/MS. El cromatógrafo estaba equipado con un inyector Split/Splitless que operaba a 290°C en el modo de división con una relación de división de 20:1. La columna utilizada fue una columna capilar de sílice fundida Zebron ZB-5ms (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) (30 m de largo × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm de espesor de película). Se utilizó helio como gas portador con un flujo constante 1 mL/min. La temperatura inicial fue de 180°C, que se mantuvo durante 3 min, luego se elevó a 270°C a una velocidad de 8°C/min y se mantuvo durante 46 min, luego se elevó de nuevo a 295°C a una velocidad de 4°C/min y se mantuvo durante 8 min. Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases-masas fueron las siguientes. La energía del electrón fue de 70 eV y el rango de exploración utilizado fue de 60-700

uma. El software Xcalibur (versión 1.4) se usó para adquisición y procesamiento de datos.

### 3.4.6 Contenido de tocoferoles

La determinación cuantitativa de tocoferoles se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y detector de fluorescencia, de acuerdo con el Método 2.432 de “Determinación del contenido en tocoferoles y tocotrienoles en aceites vegetales y grasas” (IUPAC, 1992).

Durante el proceso es esencial que la muestra permanezca protegida de la luz para evitar la degradación de los tocoferoles. Con tal fin, se recomienda el uso de material de vidrio de color topacio.

Se pesaron aproximadamente 0,1 g de muestra, con exactitud de miligramo, en un matraz aforado de 2 mL, se disolvieron en n-heptano y se enrasó. Se inyectó 20  $\mu$ L en el cromatógrafo líquido en las siguientes condiciones:

- Columna analítica de cromatografía líquida (25 cm x 4 mm d.i.) rellena de micropartículas de sílice con tamaño medio de 5  $\mu$ m.
- Detector de fluorescencia a 290 nm de longitud de onda de excitación y 330 nm de emisión.
- Concentración de la muestra: 20-30 mg/mL.
- Fase móvil: hexano:isopropanol (99:1, v/v).
- Flujo: 1 mL/min.

El contenido de cada tocoferol en la muestra se calculó mediante rectas de calibrado externo de patrones de referencia y se expresó en mg/kg.

### 3.4.7 Clorofilas

La determinación cuantitativa de clorofilas en aceites se realizó mediante espectrofotometría a 670 nm (Pokorný *et al.*, 1995).

*Procedimiento analítico:*

Se pesaron aproximadamente 7,5 g de aceite en un matraz aforado de 25 mL, se enrasó con ciclohexano. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Genesys 10uv. El blanco usado para la lectura espectrofotométrica fue ciclohexano.

Los resultados se expresaron de la siguiente forma:

$$\text{Clorofilas (mg/kg de feofitina)} = \frac{\text{Abs}_{670} \cdot 480.73}{P(g)}$$

### 3.4.8 Compuestos volátiles

Esta determinación se basó en el método propuesto por Ramón *et al.* (2018), ligeramente modificado, el cual incluye una etapa de preparación de muestra, usando como patrón interno 4-metil-2-pentanol, con su posterior análisis mediante microextracción en fase sólida acoplada a un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (SPME-GC/FID) e identificación de compuestos mediante espectrometría de masas.

*Procedimiento analítico:*

Se pesaron 1,9 g de muestra de aceite enriquecida con 2,6 mg/kg de 4-metil-2-pentanol y se depositó en un vial de vidrio de 20 mL, encapsulado con septum de politetrafluoroetileno (PTFE), y se dejó durante 10 min a 40°C para equilibrar los volátiles en el espacio de cabeza. Después del tiempo de equilibrio (10 min), el septum que cubre cada vial se perforó con una aguja de microextracción en fase sólida dotada con fase estacionaria divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Esta fibra tenía 1 cm de longitud y 50/30 µm de espesor de película. La fibra se expuso al espacio de cabeza durante 40 min a 40°C. A continuación, ésta se insertó en el puerto del inyector del cromatógrafo de gases.

Este paso de concentración anteriormente descrito se llevó a cabo con un Combipal (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza). La temperatura y el tiempo fueron

controlados automáticamente por el software Varian Star Chromatography v6.41 (Varian, Walnut Creek, CA, EE UU).

Los volátiles adsorbidos por la fibra se desorbieron térmicamente en el puerto de inyección caliente de un cromatógrafo de gases durante 5 min a 260°C con la válvula de purga desactivada (modo splitless) y depositado en una columna capilar TR-WAX (60 m x 0,25 mm i.d., recubrimiento 0,25; Teknokroma, España) de un Varian 3900 cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama. El gas portador fue hidrógeno, con un flujo de 1,5 mL/min. La temperatura del horno se mantuvo a 40°C durante 10 min y luego se programó para que aumentara a una velocidad de 3°C/min hasta 200°C. La señal fue registrada y procesada con el software WorkStation (v6.41).

### **3.4.9 Elementos metálicos y otros elementos**

Los contenidos de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sr, V y Zn fueron determinados mediante espectrofotometría de plasma, ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*), en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (CSIC) de Sevilla

Al no disponer de muestra de referencia de aceites para estos elementos, se utilizó como material de referencia SRM 1573a - *Tomato Leaves* y una muestra interlaboratorio ISE 2016 IPE-WEPAL, de la Universidad de Wageningen, de control de calidad de análisis foliares

#### *Procedimiento analítico:*

Se pesó una cantidad aproximada de 0,25 g de cada muestra de aceite previamente homogeneizada, con exactitud de 0,1 mg, en balanza microanalítica y se digirió con una mezcla de 4 mL de ácido nítrico y 2 mL de peróxido de hidrógeno en vasos de teflón herméticamente cerrados en horno microondas (MILESTONE mod. START D).

Los extractos resultantes fueron disueltos en 25 mL de agua purificada y se filtraron para su posterior análisis. Las medidas se realizaron en un equipo Varian ICP 720-ES de configuración axial. Los resultados se expresaron en mg/kg.



## 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 3.5.1 Nueva metodología analítica para una determinación más rápida de la composición de ácidos grasos y fitosteroles en aceites de semillas

El diseño experimental aplicado para la optimización de las condiciones de preparación de muestra consistió en un diseño factorial completo de tres factores y dos niveles. Los factores optimizados fueron la cantidad de muestra (50 y 100 mg de aceite), el tiempo total de metilación (60 y 120 min) y el número de extracciones de los analitos (1 y 3). Se aplicó el test de la *t* de *student* para examinar diferencias entre valores medios. Por otra parte, para evaluar posibles diferencias entre el método propuesto y los métodos estándar de ácidos grasos y fitosteroles se utilizó análisis multivariante aplicando un modelo lineal general (MLG) en SPSS versión 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). El tipo de aceite y el método analítico fueron los factores independientes, mientras que el tipo de ácido graso, por un lado, o de fitosterol, por otro, fueron los factores dependientes. La cantidad total de fitosterol también fue considerada como variable dependiente en el análisis estadístico. Debido a que no se cumplió el test de homogeneidad de la varianza de Levene, se aplicó finalmente un análisis no paramétrico, usando el test de U de Mann-Whitney para muestras independientes. Se consideró significación a partir de una probabilidad superior al 95% ( $p < 0,05$ ).

### 3.5.2 Influencia del proceso de extracción

Se utilizó un diseño factorial completo de tres factores, tipo de semilla (Control, GF-2 y GF-7), Cosecha (2015 y 2017) y proceso de extracción (prensa, disolvente y aceite total extraído en Soxhlet en el laboratorio). El programa estadístico utilizado fue SPSS versión 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y se consideró significación a partir de una probabilidad superior al 95% ( $p < 0,05$ ).

Se aplicó análisis univariado utilizando un MLG para evaluar la influencia del tipo de semilla y año de cosecha en el contenido de humedad de las semillas y en el rendimiento graso obtenido en cada uno de los tres procesos de extracción. Asimismo,

también se aplicó el mismo análisis estadístico a los resultados estimados para la grasa total (prensa + disolvente) y al contenido graso de las harinas. Se aplicó el test de la *t* de *student* para comparar valores medios de las dos cosechas. Por otra parte, se aplicó análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey para la comparación entre los tres tipos de muestras.

Para analizar los datos de composición de ácidos grasos se utilizó un MLG aplicando análisis multivariante de tres factores. Se utilizaron como factores independientes el tipo de semilla, el año de cosecha y el proceso de extracción (prensa, disolvente y Soxhlet en el laboratorio), mientras que las variables dependientes fueron cada uno de los ácidos grasos. En el análisis estadístico no se tuvieron en cuenta los ácidos C16:1, C18:3 y C20:1, ya que sus cantidades fueron tan bajas que en determinadas muestras no pudieron ser determinados por presentar niveles inferiores a los límites de cuantificación. No se cumplió el test de Levene para ningún ácido graso ( $p=0,000$ ) y, por tanto, se aplicó análisis no paramétrico para muestras independientes a cada uno de los tres factores. Los tests de significación aplicados fueron las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney para 3 y 2 niveles, respectivamente. Debido a que se encontraron diferencias sustanciales entre cosechas se aplicó el mismo análisis no paramétrico a los datos obtenidos para cada cosecha por separado. La comparación entre cosechas se llevó a cabo aplicando la prueba T de muestras emparejadas y, de forma complementaria, un test no paramétrico de muestras relacionadas. Se obtuvieron los mismos resultados en ambos tests.

En cuanto a la composición de fitoesteroles se aplicó el mismo análisis estadístico que el descrito anteriormente para ácidos grasos, pero, por razones obvias, el tratamiento estadístico fue aplicado para cada tipo de muestra (Control, GF-2 y GF-7) por separado. Nuevamente, no se cumplió el test de homogeneidad de la varianza o prueba de Levene y se aplicó, por un lado, análisis no paramétrico para muestras independientes con el fin de evaluar la influencia del proceso de extracción y, por otro, análisis no paramétrico de muestras relacionadas para evaluar la influencia del año de cosecha.

El contenido total de fitoesteroles fue analizado mediante un MLG de tres factores. Nuevamente fue necesario aplicar tests no paramétricos porque no se cumplía

la prueba de Levene. Se aplicó, por un lado, análisis no paramétrico de muestras independientes para los factores *tipo de semilla* y *proceso de extracción* y, por otro, análisis no paramétrico de muestras relacionadas para el *año de cosecha*. Debido a las grandes diferencias encontradas entre cosechas, el tratamiento estadístico fue aplicado al conjunto de datos de cada cosecha por separado. Por otra parte, para establecer diferencias entre los valores medios de aceites obtenidos por diferentes procesos de extracción, para cada tipo de semilla y año de cosecha, se utilizó ANOVA de un factor aplicando el test de Tukey para varianzas iguales o Games-Howell para varianzas desiguales.

Los contenidos de tocoferol, así como también las concentraciones de elementos metálicos y no metálicos, fueron analizados con la prueba T de muestras emparejadas para evaluar la influencia del proceso de extracción (prensa y disolvente) y de la cosecha (2015 y 2017). Se utilizó ANOVA y test de Tukey para la comparación de los tres tipos de semilla.

El contenido de componentes volátiles fue analizado siguiendo un tratamiento estadístico similar al descrito anteriormente para el contenido total de fitoesteroles, con la excepción de que se aplicó análisis multivariante de 3 factores. Nuevamente, fue necesario aplicar tests no paramétricos. En el análisis global del conjunto total de datos se aplicó el test de Kruskal-Wallis de muestras independientes para el tipo de semilla y la prueba U de Mann-Whitney para el año de cosecha y proceso de extracción (prensa y disolvente), respectivamente. Se aplicó la prueba T de muestras emparejadas para establecer diferencias entre cosechas y entre procesos de extracción. De forma similar también se aplicó el mismo test para establecer diferencias entre los tipos de semilla, comparando las muestras de dos en dos.

### **3.5.3 Influencia del proceso de refinación**

La evaluación de la influencia del proceso de refinación se llevó a cabo también en SPSS versión 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y nuevamente se consideró significación a partir de una probabilidad superior al 95% ( $p < 0,05$ ).

La influencia de los diferentes tratamientos en los diferentes parámetros analizados fue evaluada aplicando la prueba T de muestras emparejadas. Se utilizó

ANOVA y test de Tukey cuando se compararon los tres tipos de semilla. La comparación entre dos medias se llevó a cabo con la *t* de *student*.

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



#### **4.1 NUEVA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA UNA DETERMINACIÓN MÁS RÁPIDA DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y FITOESTEROLES EN ACEITES DE SEMILLAS**

En este apartado se propone una simplificación analítica de las determinaciones estándar de la composición de ácidos grasos y fitoesteroles en aceites de semillas para ayudar a mejorar no sólo los análisis de control realizados en el sector industrial, sino también en estudios donde las cantidades de muestra a analizar son pequeñas. Las mejoras introducidas consistieron en reducir la cantidad de muestra y acortar el tiempo de preparación de la muestra. La saponificación del aceite, la posterior extracción de la fracción insaponificable y la separación por cromatografía en capa fina en el análisis de fitoesteroles se reemplazaron por la metilación completa del aceite para obtener los derivados de ésteres metílicos de ácidos grasos y la separación por extracción en fase sólida de dos fracciones que contienen los ésteres metílicos de ácidos grasos y los fitoesteroles, respectivamente. Por tanto, la preparación de muestra fue común para las dos determinaciones, composición de ácidos grasos y determinación de fitoesteroles. Las condiciones de reacción aplicadas para obtener la fracción de ésteres metílicos de ácidos grasos se optimizaron para asegurar que los ésteres de esteroles reaccionaran completamente, liberando sus formas de esteroles libres. Las dos fracciones, ésteres metílicos de ácidos grasos y fitoesteroles, fueron analizadas mediante cromatografía gaseosa y detector de ionización de llama según los métodos estándar. Para validar dicha metodología analítica se utilizaron aceites crudos y refinados de distinta naturaleza, colza, girasol y aceite de soja.

##### **4.1.1 Desarrollo y optimización de la preparación de la muestra**

Dado que la preparación y extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos no constituye un paso crítico, el desarrollo de la preparación de muestras se centró principalmente en fitoesteroles. Se optimizaron tres variables, que fueron el tamaño de muestra (50 y 100 mg de aceite), el tiempo de metilación (60 y 120 min) y el número de extracciones de muestra (1 y 3). La optimización se realizó utilizando dos aceites de colza crudos obtenidos en diferentes lotes. Se evaluó la cantidad total de fitoesteroles para determinar las condiciones más apropiadas. El criterio adoptado se basó en

aquellas condiciones que dieron lugar a la mayor cantidad de fitoesteroles totales y mayor repetitividad.

Los resultados mostraron que la mayor cantidad de fitoesteroles totales se alcanzó en el experimento 2 (Tabla 13). Sin embargo, las condiciones aplicadas en el experimento 2 dieron lugar a los valores mínimos de repetitividad. El experimento 6 dio como resultado los segundos valores más altos para la cantidad total de fitoesteroles con repetitividad aceptable. El coeficiente de variación fue inferior al 3%. Por lo tanto, las condiciones utilizadas en el experimento 6 se consideraron las más apropiadas y fueron las aplicadas en el método propuesto.

El tiempo total de metilación seleccionado fue de 60 min, 30 min en condiciones básicas y 30 min en condiciones ácidas. Este tiempo fue más largo comparado con el utilizado en el método estándar para la preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos, que es de 20 min en total, 10 min en condiciones básicas para la reacción de transmetilación seguido de 10 min en condiciones ácidas para la reacción de AGL. Para examinar si tal diferencia podría tener una influencia en los resultados de la composición de ácidos grasos, se analizaron los aceites de colza, girasol y soja aplicando ambos tiempos de metilación, 20 y 60 min.

**Tabla 13.-** Optimización de las condiciones en el análisis de fitoesteroles totales (mg/kg de aceite) por el método propuesto.

Experimento	Muestra (mg)	Tiempo (min)	Nº de extracciones	Colza 1	Colza 2
1	50	120	3	7680±309	7820±249
2	100	120	3	8404±446	8721±814
3	50	120	1	7729±71	7618±104
4	100	120	1	7772±150	7819±146
5	50	60	1	7702±65	7968±132
6	50	60	3	7939±219	7985±70
7	100	60	1	7574±36	7529±94
8	100	60	3	7796±96	7803±120

Los resultados se expresaron como valores medios seguidos de desviación estándar (n=3).

Los resultados mostraron diferencias leves pero significativas (Tabla 14). Se observó una disminución de ácidos grasos poliinsaturados, es decir, ácidos linoleico y linolénico, y, en consecuencia, aumentaron significativamente los ácidos grasos saturados, principalmente los ácidos palmítico y esteárico. Este hecho se puede atribuir a la degradación oxidativa de los ácidos poliinsaturados, que reaccionan fácilmente con el oxígeno dando lugar a una serie de compuestos no volátiles y volátiles (Frankel, 2012). Para evitar la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados fue necesario llevar a cabo las reacciones de metilación en condiciones inertes, es decir, usando una corriente de nitrógeno para desplazar el aire disuelto en las soluciones reactivas y en el espacio superior del tubo de reacción. Según el método estándar (IUPAC, 1992), cuando los aceites o grasas son especialmente susceptibles a degradación oxidativa, principalmente aceites y grasas que contienen ácidos grasos con más de dos dobles enlaces, es aconsejable purgar los reactivos y el matraz de reacción con nitrógeno durante unos minutos. Esto generalmente no se realiza en grasas y aceites con baja acidez, como los utilizados en el presente estudio, pero en este caso fue necesario debido al prolongado tiempo de reacción aplicado.

Para confirmar que las condiciones seleccionadas en la preparación de la muestra permitían la liberación completa de fitoesteroles de sus formas esterificadas, se añadió estearato de colesterol a uno de los dos aceites crudos en concentraciones comprendidas entre 300 y 3000 mg/kg aceite. El aceite enriquecido fue analizado según las condiciones analíticas seleccionadas y la recuperación del analito fue valorada sobre una base molar. La recuperación promedio del estearato de colesterol agregado al aceite de colza fue del 94%. Por tanto, las condiciones aplicadas en la etapa de preparación de la muestra fueron suficientes para la liberación completa de fitoesteroles a partir de sus formas esterificadas. Por otra parte, estos resultados también fueron indicativos de una buena exactitud del método.

**Tabla 14.-** Influencia del tiempo de metilación en la composición de ácidos grasos.

	Aceite de colza		Aceite de girasol		Aceite de soja	
	20 min	60 min	20 min	60 min	20 min	60 min
C16:0	4,42±0,02b	4,57±0,05a	5,95±0,07b	6,13±0,03a	10,68±0,16b	11,39±0,08a
C16:1	0,19±0,00	0,18±0,01	0,09±0,01	0,08±0,00	0,09±0,00	0,09±0,01
C18:0	1,62±0,02b	3,52±0,25a	3,33±0,07b	4,60±0,12a	3,61±0,04b	4,82±0,08a
C18:1	63,47±0,12	63,66±0,26	29,32±0,12b	30,24±0,12a	25,32±1,40	25,54±0,15
C18:2	19,21±0,05a	17,98±0,17b	60,09±0,15a	57,96±0,21b	53,04±1,08	54,22±0,19
C20:0	0,57±0,01	0,58±0,03	0,37±0,01a	0,29±0,01b	0,46±0,01	0,44±0,03
C18:3	8,44±0,05a	7,67±0,05b	0,11±0,01a	0,08±0,01b	5,99±0,11	5,85±0,08
C20:1	1,82±0,04a	1,59±0,04b	0,15±0,00a	0,12±0,00b	0,47±0,01a	0,33±0,01b
C22:0	0,26±0,01	0,25±0,01	0,58±0,01a	0,49±0,01b	0,35±0,02	0,30±0,04

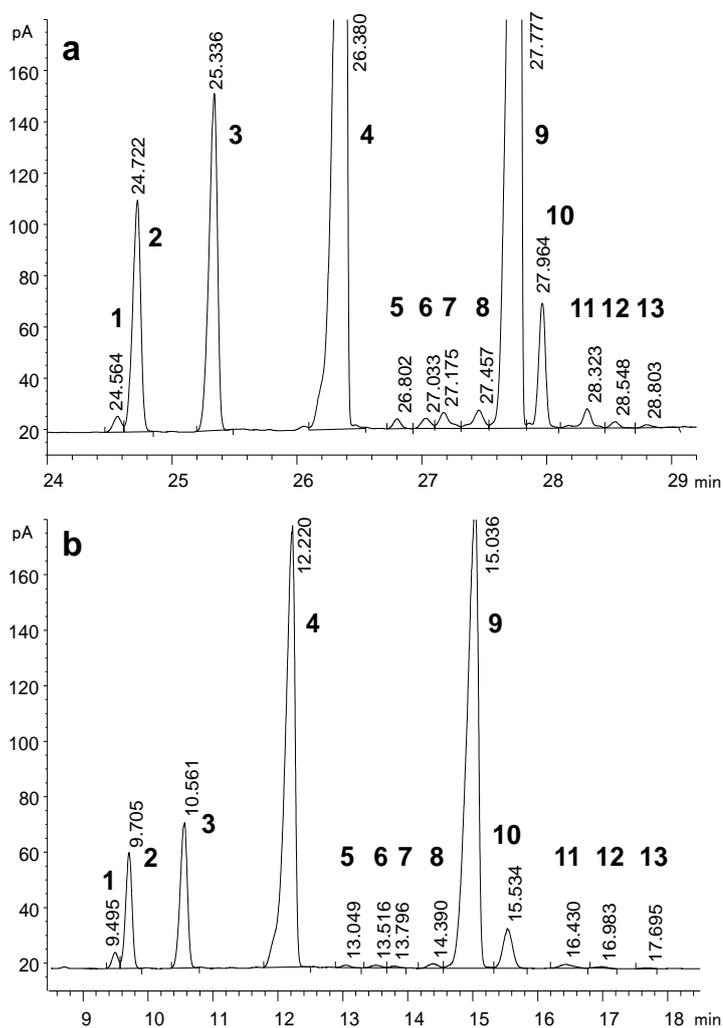
Los resultados se expresaron como valores medios seguidos de desviación estándar (n=5). De acuerdo con la prueba de la *t* de *student*, diferentes letras para un ácido graso dado muestran diferencias significativas entre los valores medios proporcionados por los dos métodos analíticos en cada aceite ( $p < 0,05$ ).

Para la separación de las fracciones de ésteres metílicos de ácidos grasos y fitoesteroles se utilizaron dos tipos de cartuchos de extracción en fase sólida, sílice (Si-1 g, 6 mL) y aminopropilo (NH<sub>2</sub>-500 mg, 3 mL) (Agilent Technologies). La eficacia de separación se evaluó mediante cromatografía en capa fina, que se realizó en placas de sílice (Merck, Darmstadt, Alemania). El eluyente utilizado fue hexano:éter dietílico (80:20 v/v) y las fracciones fueron reveladas con vapor de yodo.

El fraccionamiento con el cartucho de sílice no fue tan reproducible como el obtenido con la fase amino. Resultados similares han sido observados por Hopia *et al.* (1992) en el análisis de clases de lípidos en aceites comestibles. Estos autores sugirieron que las diferencias entre las dos columnas de extracción en fase sólida se debían probablemente a una mayor adsorción de humedad del aire sobre la sílice, que es ligeramente más polar que la fase amino. Se concluyó que la humedad tiene un efecto menor sobre la fase amino en comparación con la sílice.

#### **4.1.2 Optimización de condiciones cromatográficas en el análisis de fitoesteroles**

El tipo de inyección de muestra en el análisis de cromatografía de gases de fitoesteroles también fue evaluado. Se examinaron dos tipos, una inyección de *split* en caliente a través de un inyector *split-splitless* y una inyección de *split* en frío a través de un inyector de vaporización de temperatura programada (PTV, del inglés). Los cromatogramas obtenidos con el inyector PTV presentaron señales más intensas como consecuencia de un efecto de concentración de los analitos (Figura 14). La inyección de vaporización de temperatura programada ejerció, por tanto, una gran influencia sobre los fitoesteroles presentes en cantidades menores, lo que permitió una determinación más precisa. Como resultado, la inyección de *split* en frío fue el modo de inyección elegido. Con fines comparativos, también fue el modo de inyección utilizado en el método estándar.



**Figura 14.-** Cromatogramas de fitoesteroles obtenidos usando inyección de vaporización de temperatura programada (a) y un inyector de split en caliente (b). Asignación: 1, Colesterol; 2, Colestanol; 3, Brasicasterol; 4, Campesterol; 5, Estigmasterol; 6,  $\Delta$ 7-Campesterol; 7,  $\Delta$ -5,23-Estigmastadienol; 8, Clerosterol; 9,  $\beta$ -Sitosterol; 10,  $\Delta$ 5-Avenasterol; 11,  $\Delta$ -5,24-Estigmastadienol; 12,  $\Delta$ 7-Estigmasterol; 13,  $\Delta$ 7-Avenasterol.

### Identificación de fitoesteroles

La identificación de fitoesteroles se confirmó mediante espectrometría de masas.

Se evaluaron los fitoesteroles como compuestos puros en las condiciones experimentales mencionadas en el apartado 3.4.5. Los picos cromatográficos no presentaron solapamientos ocultos debido a la coelución con otros compuestos minoritarios. Los picos base, así como los fragmentos identificadores obtenidos para cada fitoesterol, se enumeran en la Tabla 15.

**Tabla 15.-** Características de espectrometría de masas de los fitoesteroles en el análisis de identificación por cromatografía gases-masas.

	PM <sup>a</sup>	PM Derivatizado	Pico Base	Identificador
Colesterol	386	458	368	329
Brasicasterol	398	470	380	365
Campesterol	400	472	382	343
Estigmasterol	412	484	255	394
$\Delta$ 7-Campesterol	400	472	472	367
Clerosterol	412	484	121	414
$\beta$ -Sitosterol	412	486	396	357
$\Delta$ 5-Avenasterol	412	484	296	386
$\Delta$ 5,24-Estigmastadienol	412	484	296	414
$\Delta$ 7-Estigmastenol	414	486	213	255
$\Delta$ 7-Avenasterol	412	484	343	253

<sup>a</sup>Peso Molecular

Los resultados mostraron que la fracción de fitoesterol no presentó otros compuestos que interfirieran en el análisis de cromatografía gaseosa. Como se ha observado en otros estudios analíticos, alcoholes alifáticos y dialcoholes triterpénicos presentes en concentraciones variables en la fracción insaponificable de aceites de frutos como los aceites de oliva, podrían interferir en el análisis de fitoesteroles por superposición de picos cromatográficos (Mathison & Holstege, 2013; Seçmeler & Güçlü Üstündağ, 2017). Por lo tanto, el procedimiento analítico desarrollado en el presente estudio es aplicable para el análisis de aceites de semillas, pero puede encontrar dificultades analíticas en muestras más complejas como los aceites de frutos oleaginosos, tales como los aceites de oliva y otros.

#### **4.1.3 Validación del método propuesto**

Para la validación del método se analizaron tres aceites vegetales diferentes y los resultados obtenidos fueron comparados con los proporcionados por los métodos oficiales utilizados para la determinación de la composición de ácidos grasos y la cuantificación de fitoesteroles en aceites, respectivamente.

##### *Composición de ácidos grasos*

La composición de ácidos grasos no mostró diferencias significativas en comparación con el método oficial (Tabla 16). Sólo se encontraron diferencias significativas para el ácido linoleico en el aceite de girasol cuando se aplicó la prueba de la *t de student*. El nivel relativo de ácido linoleico fue ligeramente mayor en el método propuesto. Sin embargo, la diferencia encontrada fue inferior al 0,4%, que es bastante inferior al valor de repetitividad del método estándar. De acuerdo con el método oficial, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones llevadas a cabo simultáneamente o en sucesión rápida con la misma muestra, por el mismo analista, en las mismas condiciones, no debe exceder en 0,5 g/100 g de muestra o el 10% del valor determinado, lo que sea mayor (IUPAC, 1992). La preparación de muestra en condiciones inertes redujo considerablemente la desviación estándar. El coeficiente de

variación fue menor o igual a 1,5% para aquellos ácidos grasos presentes en niveles superiores a 0,5%.

**Tabla 16.-** Composición de ácidos grasos (%) según el procedimiento estándar y el método propuesto.

	Aceite de colza		Aceite de girasol		Aceite de soja	
	Estándar	Propuesto	Estándar	Propuesto	Estándar	Propuesto
C16:0	4,42±0,00	4,43±0,01	5,99±0,02	5,97±0,01	10,73±0,0 1	10,72±0,0 3
C16:1	0,19±0,00	0,19±0,00	0,09±0,00	0,08±0,01	0,09±0,00	0,09±0,01
C18:0	1,83±0,03	1,81±0,03	3,61±0,06	3,57±0,04	3,59±0,03	3,57±0,05
C18:1	63,44±0,0 2	63,44±0,0 3	29,38±0,10	29,36±0,03	24,38±0,0 3	24,35±0,0 2
C18:2	19,16±0,0 1	19,17±0,0 2	59,56±0,02b	59,77±0,04a	53,83±0,0 6	53,90±0,1 0
C20:0	0,58±0,00	0,58±0,00	0,42±0,11	0,33±0,01	0,43±0,01	0,42±0,01
C18:3	8,28±0,01	8,28±0,02	0,11±0,03	0,09±0,00	6,04±0,01	6,05±0,01
C20:1	1,79±0,01	1,81±0,01	0,20±0,05	0,17±0,01	0,52±0,04	0,50±0,04
C22:0	0,31±0,01	0,30±0,03	0,66±0,00	0,66±0,00	0,39±0,02	0,42±0,06

Los resultados se expresaron como valores medios seguidos de desviación estándar (n=5). De acuerdo con la prueba de la *t* de *student*, las diferentes letras para un ácido graso dado muestran diferencias significativas entre los valores medios proporcionados por los dos métodos analíticos en cada aceite ( $p < 0,05$ ).

### *Fitoesteroles*

De forma similar a la composición de ácidos grasos, las concentraciones de fitoesteroles fueron similares a las obtenidas en el método oficial (Tabla 17). No se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos para los fitoesteroles principales, Brasicasterol, Campesterol Estigmasterol y  $\beta$ -Sitosterol, o para la cantidad total de fitoesteroles. Con excepción del clerosterol, se encontraron diferencias leves pero significativas para los fitoesteroles presentes en cantidades menores cuando se aplicó un modelo lineal general multivariado. Sin embargo, la prueba de Levene mostró significación, indicando que no se cumplía la hipótesis de varianzas iguales. La aplicación de un test no-paramétrico sólo mostró diferencias significativas entre los dos métodos para el  $\Delta 5,24$ -Estigmastadienol.

La repetitividad del método propuesto fue aceptable. El coeficiente de variación fue inferior al 10% para los principales fitoesteroles, así como para su cantidad total (Tabla 17). Resultados similares han sido obtenidos por Toivo *et al.* (1998), quienes propusieron una determinación de fitoesteroles basada también en una separación mediante extracción en fase sólida. El coeficiente de variación obtenido en el presente estudio para la cantidad total de fitoesteroles fue relativamente bajo en el aceite de colza y similar al encontrado en el método oficial (<1,5%). Tales resultados están de acuerdo con los obtenidos en la optimización de la preparación de la muestra, en los que se utilizaron dos aceites de colza (Tabla 13).

**Tabla 17.-** Análisis de fitoesteroles según el procedimiento estándar y el método propuesto.

	Aceite de colza		Aceite de girasol		Aceite de soja	
	Estándar	Propuesto	Estándar	Propuesto	Estándar	Propuesto
<b>Composición (%)</b>						
Colesterol*	41±5	37±3	nd	nd	18±6	12±2
Brasicasterol	806±4	821±20	nd	nd	nd	nd
Campesterol	3343±17	3293±45	412±14	417±40	533±7	538±48
Estigmasterol	31±8a	21±1b	344±5	362±38	499±5	531±53
Δ7-Campesterol*	45±5a	33±6b	64±12a	34±9b	nd	nd
Δ5,23-Estigmastadienol*	24±4b	48±2a	91±3	92±13	nd	nd
Clerosterol	40±6b	59±2a	44±2	36±14	nd	nd
β-Sitosterol	4077±72	4115±55	2656±84	2684±203	1642±54	1608±142
Δ5-Avenasterol*	281±6a	253±4b	179±4	184±15	41±9a	29±5b
Δ5,24-Estigmastadienol* <sup>·</sup> **	28±2b	57±5a	56±5b	76±7a	49±6	44±3
Δ7-Estigmasterol*	10±3b	36±12a	414±4b	494±31a	93±1b	105±6a
Δ7-Avenasterol*	7±2	8±1	172±2	198±25	43±3	48±5
<b>Total (mg/kg)</b>	<b>8732 ± 105</b>	<b>8781 ± 96</b>	<b>4434 ± 107</b>	<b>4577 ± 380</b>	<b>2917 ± 63</b>	<b>2916 ± 261</b>

Los resultados se expresaron como valores medios seguidos de desviación estándar (n=5). De acuerdo con la prueba de la *t* de Student, diferentes letras para un fitoesterol dado muestran diferencias significativas entre los valores medios proporcionados por los dos métodos analíticos en cada aceite ( $p < 0,05$ ). \* Diferencias significativas entre los métodos según un análisis de modelo lineal general multivariado ( $p < 0,05$ ). \*\* Diferencias significativas entre los métodos según la prueba no paramétrica conocida como la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes ( $p < 0,05$ ). nd, no detectado.

## 4.2 INFLUENCIA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

La producción comercial de los aceites de girasol se realiza mediante una extracción mecánica en prensa seguida de una extracción con el disolvente autorizado, hexano. En general, ambos aceites se mezclan y el aceite resultante se somete al proceso de refinación antes de ser comercializado. Sin embargo, el interés creciente de los consumidores por productos mínimamente procesados y carentes de aditivos ha favorecido la comercialización de alimentos de alto valor añadido que responden a estas características. En ese sentido, la extracción de aceites comestibles mediante presión mecánica permite obtener aceites que pueden ser comercializados como aceites especiales, bien como aceites vírgenes o *refinados libres de disolvente*.

En este apartado se estudia por separado la influencia de los procesos de extracción, por presión y, posteriormente, con disolvente, en las características fisicoquímicas de aceites de girasol de semillas modificadas genéticamente. A efectos comparativos, también se evalúa el aceite total obtenido mediante extracción con Soxhlet en el laboratorio. Los estudios se han realizado con tres muestras de semillas facilitadas por el Instituto de Agricultura Sostenible.

### 4.2.1 Rendimiento graso

Los procedimientos de extracción de aceite se han descrito en el apartado 3.2 y las cantidades de semillas recibidas de cada muestra se reflejan en el apartado 3.1.3.

El pretratamiento de las semillas se compone de dos operaciones fundamentales, calentamiento-acondicionamiento y molienda (Williams, 1997; Van Hoed *et al.*, 2010), y afecta al rendimiento de aceite. Todas las semillas del presente estudio recibieron el mismo pretratamiento a pesar de la diferencia morfológica que se apreciaban entre ellas, en cuanto a tamaño y rigidez de la cáscara. A las semillas se les adicionó agua en una proporción de 10% y se sometieron a 60°C durante 1 h. En este trabajo se empleó la semilla de girasol íntegra, sin descascarar.

En la Tabla 18 se recogen los resultados obtenidos para el contenido de humedad de las semillas, la riqueza grasa total, determinada mediante extracción con hexano en Soxhlet en el laboratorio, y rendimiento graso de los procesos de extracción con prensa seguida de extracción con disolvente en planta piloto.

Las semillas presentaron valores de humedad comprendidos entre 4,5 y 6,7%, siendo los más bajos los de la muestra GF-7. Se encontraron ligeras diferencias significativas entre las dos cosechas estudiadas para las semillas Control y GF-2, mostrando un contenido mayor las semillas pertenecientes a la cosecha de 2015. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas para las semillas GF-7. Los valores encontrados fueron similares a los que se recogen en la bibliografía consultada para semillas de girasol durante el almacenamiento. Así, los estudios de Aquino *et al.* (2019) mostraron un contenido de humedad de  $4,0\% \pm 0,10$  y los de Castro & Leite (2018) valores que oscilaron entre 5 y 10%.

Con respecto al rendimiento graso (Tabla 18), la extracción en prensa presentó valores comprendidos entre 21 y 31%, expresados sobre peso de semilla. En las muestras GF-7 se obtuvieron valores ligeramente superiores, con promedios de aproximadamente 30% frente al 23 y 25% obtenidos en el Control y GF-2, respectivamente. Según Gunstone (2002), la extracción mecánica del aceite de girasol puede alcanzar rendimientos comprendidos entre 70 y 80%. En el presente estudio, las semillas GF-2 y GF-7 presentaron valores comprendidos entre el 71 y 73% de la grasa total extraída de la semilla. No se encontraron diferencias significativas para el rendimiento graso en prensa entre cosechas.

En los pellets resultantes, el contenido de grasa obtenida con disolvente fue del mismo orden para las muestras Control y GF-7, con valores promedios de 16%, y ligeramente inferior para la muestra GF-2, con un 13%. La cantidad total de aceite extraído en los dos procedimientos, prensa y disolvente, fue coherente con los valores de riqueza grasa obtenidos en el laboratorio. De hecho, el contenido de aceite residual en la torta fue muy bajo, osciló entre 0,1-0,3%. Expresados sobre la cantidad total de aceite extraído, la grasa residual constituyó tan sólo el 0,2-0,5%, lo que indica que el proceso de extracción global fue efectivo.

**Tabla 18.-** Características de las semillas y rendimientos de los procesos de extracción de aceite.

	Control		GF-2		GF-7	
	2015	2017	2015	2017	2015	2017
<b>Humedad (%)</b>	6,7±0,15bC	5,5±0,18aC	6,2±0,13bB	5,11±0,18aB	4,5±0,12aA	4,6±0,17aA
<b>Riqueza grasa<sup>a</sup> (%)</b>	32,7±0,8aA	37,5±0,4bA	35,1±0,8aA	32,6±0,2bA	42,0±0,1aB	37,6±0,3bB
<b>Rendimiento graso (%)</b>						
Prensa	21,3±1,1aA	24,7±1,2aA	26,8±1,3aB	24,5±1,2aB	31,2±1,6aC	28,2±1,4aC
Disolvente <sup>b</sup>	16,4±1,6aB	14,8±1,5aB	14,1±1,4aA	12,3±1,2aA	18,2±1,8bB	14,8±1,5aB
Prensa + Disolvente <sup>c</sup>	34,2±1,7aA	35,8±1,6aA	37,1±1,7aA	33,8±1,5aA	43,7±2,0bB	38,8±1,8aB
<b>Grasa residual<sup>d</sup> (%)</b>	0,17±0,05aAB	0,24±0,02aAB	0,20±0,0aA	0,12±0,04aA	0,24±0,07aB	0,30±0,09aB

<sup>a</sup> Cantidad total de aceite obtenido mediante Soxhlet en el laboratorio. <sup>b</sup> Expresado sobre *pellets*. <sup>c</sup> Expresado sobre semillas. <sup>d</sup> Cantidad de aceite presente en la harina. Diferentes letras minúsculas indican diferencias entre cosechas y diferentes letras mayúsculas entre muestras ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.2 Acidez

En la Tabla 19 se presentan los resultados de acidez de los distintos aceites obtenidos mediante presión y, a continuación, extracción con hexano. En todos los casos, la acidez libre no superó el 2%. Los aceites de prensa presentaron menor acidez, con valores inferiores o iguales al 1%, mientras que los obtenidos mediante extracción con disolvente oscilaron entre 0,7 y 1,6%. Los menores valores de acidez encontrados para los aceites de prensa están de acuerdo con estudios previos (Van Hoed *et al.*, 2010; Aguirre *et al.*, 2014; Fernandez-Cuesta *et al.*, 2014b). Este hecho es característico de semillas de calidad, con un bajo grado de hidrólisis, y constituye un factor de gran interés para estudios de refinación, como se profundizará más adelante.

**Tabla 19.-** Acidez (%) del aceite extraído mediante prensado y posterior extracción con disolvente.

	Control		GF-2		GF-7	
	2015	2017	2015	2017	2015	2017
Prensa	0,15	1,00	0,26	0,99	0,10	1,00
Disolvente	0,71	1,42	0,84	1,64	0,59	1,55

Los resultados se expresan como valores medios. La repetitividad de la determinación de la acidez libre es inferior al 5%.

#### 4.2.3 Composición de ácidos grasos

En las Tablas 20-21 se presentan los resultados obtenidos para la composición de ácidos grasos de los aceites obtenidos mediante presión y con disolvente en las cosechas de 2015 y 2017, respectivamente.

La composición de ácidos grasos, así como el contenido y composición de fitoesteroles, fueron determinados por la nueva metodología puesta a punto en el presente trabajo de Tesis (apartado 3.4.6.1). A efectos comparativos se han incluido

también los resultados obtenidos para las muestras de aceite extraídas con Soxhlet en el laboratorio.

Un análisis global del conjunto total de datos mostró que las tres muestras de semillas presentaron aceites con composiciones de ácidos grasos similares y características de aceites de girasol (Tabla 4). Como era de esperar, predominaron dos ácidos insaturados, C18:1 y C18:2. Ambos constituyeron el 87-89% del conjunto de ácidos grasos, lo cual es coherente con los valores publicados en otros estudios (86-90%) (Nimet *et al.*, 2011; Roman *et al.*, 2013; Rai *et al.*, 2016; de Aquino *et al.*, 2019). El análisis global de datos no mostró diferencias significativas entre las tres muestras analizadas para estos dos ácidos grasos. Sin embargo, se apreciaron ligeras diferencias, pero significativas ( $p < 0,05$ ), para los ácidos grasos saturados C16:0, C18:0, C20:0, C22:0 y C24:0.

No se encontraron diferencias significativas en la composición de ácidos grasos entre los aceites de prensa y los obtenidos con disolvente. Tampoco se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los aceites obtenidos por los tres métodos de extracción, prensa, disolvente y Soxhlet. Por tanto, los resultados mostraron que los procesos de extracción no tuvieron una influencia significativa en la composición de ácidos grasos.

**Tabla 20.-** Composición de ácidos grasos (%) de los aceites de 2015.

	Control			GF-2			GF-7		
	Soxhlet	Prensa	Disolvente	Soxhlet	Prensa	Disolvente	Soxhlet	Prensa	Disolvente
<b>Ácidos grasos</b>									
C16:0	7,4±0,03	7,3±0,05	7,7±0,05	7,0±0,07	7,0±0,22	7,3±0,29	5,9±0,10	6,0±0,04	6,4±0,013
C16:1	0,2±0,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C18:0	4,3±0,04	4,3±0,02	4,3±0,01	2,5±0,06	2,5±0,16	2,6±0,15	3,9±0,07	3,9±0,03	4,0±0,03
C18:1	35,2±0,20	35,3±0,08	34,3±0,08	34,5±0,12	34,4±1,40	33,7±1,41	40,8±0,35	39,2±0,58	38,3±0,73
C18:2	51,4±0,21	51,8±0,13	52,4±0,04	54,8±0,21	55,0±1,33	55,5±1,29	47,9±0,39	49,6±0,58	49,9±0,65
C20:0	0,4±0,02	0,4±0,01	0,4±0,02	0,2±0,03	0,2±0,02	0,2±0,01	0,3±0,03	0,3±0,01	0,4±0,02
C18:3	0,2±0,01	nd	nd	0,2±0,01	nd	nd	0,2±0,02	nd	nd
C20:1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C22:0	0,7±0,02	0,7±0,01	0,7±0,02	0,5±0,03	0,6±0,03	0,5±0,01	0,7±0,08	0,7±0,02	0,7±0,02
C24:0	0,3±0,02	0,3±0,02	0,3±0,01	0,2±0,01	0,3±0,02	0,2±0,01	0,3±0,03	0,3±0,01	0,4±0,02

nd, no detectado. Los resultados se expresan como valores medios ± desviación estándar (n=3 para los aceites Control prensa y disolvente y n=4 para el resto).

**Tabla 21.-** Composición de ácidos grasos (%) de los aceites de 2017.

	Control			GF-2			GF-7		
	Soxhlet	Prensa	Disolvente	Soxhlet	Prensa	Disolvente	Soxhlet	Prensa	Disolvente
<b>Ácidos grasos</b>									
C16:0	6,9±0,06	7,0±0,01	7,3±0,02	6,6±0,11	6,5±0,01	6,8±0,03	7,1±0,15	7,1±0,01	7,4±0,00
C16:1	0,2±0,00	0,2±0,00	0,2±0,00	nd	nd	nd	nd	0,1±0,00	0,1±0,00
C18:0	3,6±0,01	3,6±0,01	3,6±0,01	3,0±0,05	3,0±0,01	3,2±0,01	4,0±0,02	4,1±0,03	4,1±0,01
C18:1	30,8±0,08	30,0±0,02	29,0±0,03	31,0±0,17	30,0±0,08	29,6±0,04	23,9±0,15	23,8±0,02	23,6±0,02
C18:2	57,2±0,10	57,9±0,05	58,5±0,06	58,7±0,23	59,5±0,09	59,3±0,07	64,0±0,10	63,6±0,02	63,3±0,02
C20:0	0,3±0,00	0,3±0,00	0,3±0,00	0,2±0,01	0,3±0,04	0,2±0,00	0,3±0,02	0,3±0,00	0,3±0,00
C18:3	nd	0,1±0,00	0,1±0,00	nd	nd	nd	nd	0,1±0,00	0,1±0,00
C20:1	0,2±0,00	0,2±0,00	0,2±0,00	nd	0,1±0,02	0,2±0,00	nd	0,2±0,00	0,2±0,00
C22:0	0,6±0,00	0,6±0,00	0,6±0,01	0,5±0,02	0,4±0,05	0,5±0,01	0,5±0,02	0,6±0,01	0,6±0,00
C24:0	0,3±0,00	0,3±0,00	0,3±0,00	nd	0,1±0,02	0,2±0,00	0,3±0,03	0,3±0,00	0,3±0,00

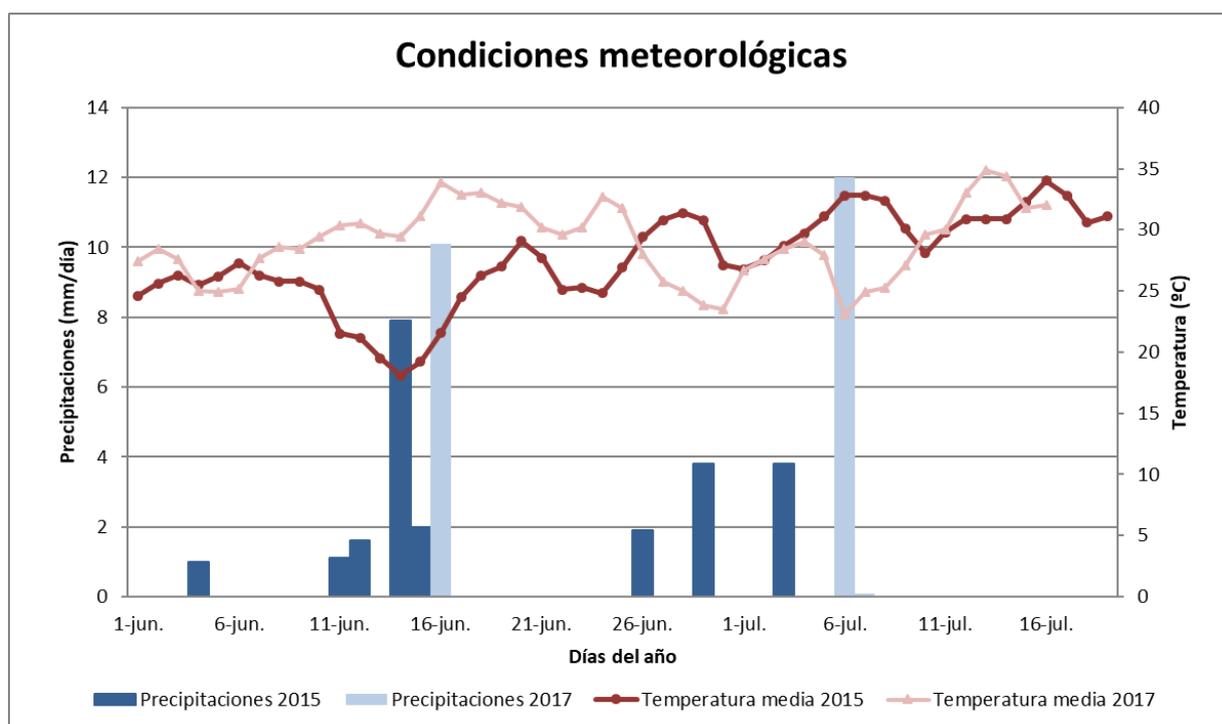
nd, no detectado. Los resultados se expresan como valores medios ± desviación estándar (n=4).

Sin embargo, se encontraron diferencias sustanciales entre aceites de semillas de diferentes cosechas, principalmente para los dos ácidos grasos más abundantes, C18:1 y C18:2. Las cantidades de C18:1 fueron más elevadas para los aceites de la cosecha 2015, con un promedio de 36,6% ( $\pm 2,6$ ) frente a 28,1% ( $\pm 3,2$ ) en 2017. Lo contrario ocurrió para el C18:2, con un promedio de 51,8% ( $\pm 2,8$ ) en 2015 frente a 60,2% ( $\pm 2,7$ ) en 2017. Dado que el factor cosecha presentó una elevada variabilidad, se aplicó análisis estadístico a los datos de cada cosecha por separado. Los resultados de este análisis mostraron ligeras diferencias para todos los ácidos grasos cuando se compararon las tres muestras, tanto en la campaña 2015 como en la 2017. Nuevamente no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los tres métodos de extracción, ni en 2015 ni en 2017

Las diferencias sustanciales encontradas entre aceites de diferentes cosechas podrían estar relacionadas con diferencias en las condiciones medioambientales durante el desarrollo de la semilla. En este sentido, diferencias en la temperatura y el estrés hídrico pueden tener consecuencias en la acumulación fisiológica de ácidos grasos (Roche *et al.*, 2006, 2016, 2019). Se ha observado que un aumento de la temperatura combinado con un déficit moderado de agua aumentó la relación C18:1/C18:2. El efecto de estos factores dependió, sin embargo, de la tipología del genotipo estudiado (girasol frente a girasol alto oleico). En aceites de girasol alto oleico, solamente la temperatura afectó la relación C18:1/C18:2 (Roche *et al.*, 2006).

En el presente estudio se han detectado diferencias de temperaturas entre las dos cosechas. La cosecha 2017 estuvo expuesta a temperaturas más elevadas, con un promedio de temperatura de 29,0°C frente a 27,5°C en 2015. También fueron más elevadas las máximas, 37,7°C frente a 36,6°C, y, especialmente, las temperaturas mínimas, 20,0°C frente a 17,4°C. En la Figura 15 puede observarse la distribución de las temperaturas registradas durante el tiempo de cultivo. Las principales diferencias se encuentran en el periodo inicial, donde claramente las temperaturas en 2017 fueron significativamente más elevadas. Sin embargo, a diferencia de otros estudios (Roche *et al.*, 2006), el cociente C18:1/C18:2 disminuyó notablemente en la cosecha 2017, de 0,71 en 2015 a 0,47.

También se han encontrado diferencias en las precipitaciones acontecidas entre ambas cosechas. Si bien en la cantidad total de precipitaciones no se observaron cambios sustanciales entre 2015 (0,47 mm/día) y 2017 (0,48 mm/día) (Tabla 11), sí se hallaron diferencias en la distribución de estas precipitaciones a lo largo del tiempo (Figura 15), pudiendo afectar de forma distinta en diferentes estadios de desarrollo de la semilla. En la cosecha 2015 las precipitaciones fueron más numerosas, pero menos abundantes que en 2017. En este sentido, Roche *et al.* (2019) observaron en semillas de cártamo que una disminución en las precipitaciones dio lugar a una disminución de los niveles de C18:2, mientras que no se observaron diferencias significativas en los niveles de C18:1.



**Figura 15.-** Condiciones meteorológicas en 2015 y 2017.

#### 4.2.4 Fitoesteroles

En las Tablas 22-23 se presentan los resultados obtenidos en el estudio de composición y contenido de fitoesteroles mayoritarios, en las cosechas 2015 y 2017, respectivamente.

Con respecto a la composición de las muestras estudiadas, el nivel promedio de  $\beta$ -Sitosterol en la muestra Control fue de 62,2% ( $\pm 2,2$ ). El perfil de fitoesteroles de la muestra Control es consistente con los obtenidos en otros estudios (Padley *et al.*, 1994; Fernández-Cuesta *et al.*, 2012b), donde se indica como mayoritario el  $\beta$ -Sitosterol, con un rango de 54,0 a 60,6% del total, y un contenido singular en otros fitoesteroles, como el  $\Delta 7$ -Estigmastenol (13,3-19,1%), Campesterol (7,9-10,9%), Estigmasterol (9,0-10,5%) y  $\Delta 7$ -Avenasterol (2,8-4,2%). Otros fitoesteroles detectados en concentraciones más bajas incluyeron  $\Delta 7$ -Campesterol, Clerosterol,  $\Delta 5$ -Avenasterol y  $\Delta 5,24$ -Estigmastadienol.

Los porcentajes encontrados de Campesterol y  $\Delta 7$ -Estigmastenol son los que caracterizan las líneas estudiadas en el presente trabajo. La muestra GF-2 se caracterizó por presentar cantidades de Campesterol muy elevadas. En promedio, GF-2 presentó 27,9% ( $\pm 2,5$ ) de Campesterol frente a 7,2% ( $\pm 0,7$ ) hallado en las otras dos muestras. La muestra GF-7 se caracterizó por un elevado contenido de  $\Delta 7$ -Estimastenol, con un valor relativo promedio de 26,4% ( $\pm 2,4$ ) frente a 7,4% ( $\pm 0,6$ ) y 16,6% ( $\pm 1,7$ ) hallados en la muestra GF-2 y en el Control, respectivamente. El aumento de los niveles de estos dos tipos de fitoesteroles en las semillas dio lugar a una disminución en los niveles del esteroles mayoritario,  $\beta$ -Sitosterol. Mientras que el nivel promedio de  $\beta$ -Sitosterol en el Control fue de 62,2% ( $\pm 2,2$ ), las cantidades relativas encontradas en GF-2 y GF-7 fueron 49,7% ( $\pm 1,1$ ) y 51,0% ( $\pm 2,5$ ), respectivamente.

En relación con la comparación de los procesos de extracción, al igual que en estudios previos (Aguirre *et al.*, 2014), no se encontraron diferencias sustanciales en la composición de fitoesteroles entre aceites extraídos con prensa y posterior extracción con disolvente. Sólo, en la muestra GF-7 sí se observaron ligeras diferencias para el Campesterol y el  $\Delta 7$ -Estigmastenol.

**Tabla 22.-** Composición y concentración total de fitoesteroles mayoritarios en los aceites de 2015.

	Control			GF-2			GF-7		
	Soxhlet	Prensa	Disolvente	Soxhlet	Prensa	Disolvente	Soxhlet	Prensa	Disolvente
<b>Composición (%)</b>									
Campesterol	7,6±0,10	7,8±0,52	8,4±0,15	29,0±1,37	31,2±1,10	26,7±0,62	6,8±0,15	6,9±0,26	8,0±0,37
Estigmasterol	7,4±0,35	6,7±0,11	10,4±0,32	7,4±0,19	7,5±0,40	9,7±0,24	9,2±0,09	8,9±0,26	10,5±0,26
β-Sitosterol	63,6±0,47	65,2±0,87	62,6±1,14	48,8±0,53	49,7±1,18	50,9±0,37	49,5±0,65	52,9±0,96	53,5±0,73
Δ5-Avenasterol	2,9±0,28	nd	nd	3,5±0,51	nd	nd	3,9±0,20	nd	nd
Δ7-Estigmastenol	15,0±0,90	16,6±0,44	14,6±0,75	7,3±0,72	7,2±0,59	8,3±0,91	25,8±0,65	26,8±0,72	24,0±1,04
Δ7-Avenasterol	3,6±0,06	3,7±0,05	4,0±0,14	3,9±0,08	4,4±0,18	4,4±0,22	4,6±0,20	4,4±0,18	4,0±0,24
<b>Total (mg/kg)</b>	3644±230b	3246±35a	5065±10c	4008±454b	2839±109a	4849±439c	4415±341b	4290±232a	5754±388c

nd, no detectado. Los resultados se expresan como valores medios ± desviación estándar (n=3 para los aceites Control prensa y disolvente y n=4 para el resto). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre extractos de una misma muestra de semilla ( $p<0,05$ ), según ANOVA de un factor y aplicando el test de Tukey para varianzas iguales o Games-Howell para varianzas desiguales.

**Tabla 23.-** Composición y concentración total de fitoesteroles mayoritarios en los aceites de 2017.

	Control			GF-2			GF-7		
	Soxhlet	Prensa	Disolvente	Soxhlet	Prensa	Disolvente	Soxhlet	Prensa	Disolvente
<b>Composición (%)</b>									
Campesterol	6,3±0,13	6,2±0,06	7,3±0,15	26,7±0,33	28,2±0,1	23,4±0,19	7,0±0,04	6,2±0,06	8,3±0,04
Estigmasterol	8,9±0,3	7,8±0,08	11,4±0,14	9,0±0,13	8,9±0,29	11,0±0,11	10,9±0,05	9,4±0,19	12,6±0,25
β-Sitosterol	61,7±0,98	61,2±0,4	57,9±0,2	49,7±0,17	47,5±0,07	50,9±0,35	49,2±0,14	46,6±1,1	48,1±0,09
Δ5-Avenasterol	1,5±0,03	1,6±0,04	1,7±0,04	3,3±0,04	3,7±0,07	3,3±0,03	0,9±0,05	0,9±0,03	1,5±0,05
Δ7-Estigmastenol	17,8±1,4	18,8±0,51	17,3±0,46	7,1±0,45	6,7±0,18	7,7±0,64	27,5±0,20	32,5±1,58	24,8±0,48
Δ7-Avenasterol	3,8±0,12	4,5±0,1	4,4±0,19	4,1±0,11	4,9±0,12	3,6±0,05	4,4±0,04	4,3±0,28	4,6±0,22
<b>Total (mg/kg)</b>	5370±347b	4476±136a	7272±343c	4666±124a	5225±203b	6678±387c	7177±214b	5284±200a	9249±669c

nd, no detectado. Los resultados se expresan como valores medios ± desviación estándar (n=4) Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre extractos de una misma muestra de semilla ( $p < 0,05$ ), según ANOVA de un factor y aplicando el test de Tukey para varianzas iguales o Games-Howell para varianzas desiguales.

Con respecto a la influencia del año de cosecha, las diferencias encontradas en la composición de fitoesteroles fueron bajas, aunque significativas ( $p < 0,05$ ). Para detectar dichas diferencias en cada una de las muestras de semillas se aplicó una prueba no paramétrica. En este estudio no se consideró al  $\Delta 5$ -Avenasterol, ya que, con excepción del aceite obtenido en Soxhlet en el laboratorio, no fue detectado en la campaña 2015. Los resultados de la muestra Control mostraron diferencias significativas en todos los casos excepto para el Campesterol. En la muestra GF-2 se observaron diferencias significativas entre cosechas excepto para el  $\beta$ -Sitosterol,  $\Delta 7$ -Estimastanol y  $\Delta 7$ -Avenasterol. Y, finalmente, en la muestra GF-7 se detectaron diferencias significativas sólo para el Estigmasterol.

En cuanto al contenido total de fitoesteroles, la muestra GF-7 presentó mayores concentraciones que las muestras Control y GF-2, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las dos últimas muestras, ni para la cosecha 2015 ( $p = 0,443$ ) ni para la de 2017 ( $p = 0,912$ ).

Los aceites obtenidos mediante extracción con disolvente presentaron mayores concentraciones de fitoesteroles totales que los obtenidos por prensa. Las cantidades encontradas en los aceites de disolvente estuvieron comprendidas entre 4849 y 9249 mg/kg, mientras que en los aceites de prensa entre 2839 y 5284 mg/kg. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en semillas de girasol (Aguirre *et al.*, 2014; Fernández-Cuesta *et al.*, 2014a) y también en otras semillas (Li *et al.*, 2007; Van Hoed *et al.*, 2010). Las mayores concentraciones de fitoesteroles totales en los aceites de disolvente pueden ser atribuidas a la mayor capacidad extractiva del disolvente, a pesar de su menor polaridad comparada con el aceite. En los aceites de prensa la concentración de fitoesteroles depende del contenido de aceite liberado, que actúa como un disolvente. Una vez que el aceite se satura éste no puede incorporar más fitoesteroles. Sin embargo, en la extracción con disolvente los fitoesteroles se van concentrando mediante el contacto continuo con disolvente fresco de un material que, de partida, ya ha perdido gran cantidad de aceite en el primer proceso de extracción.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los aceites obtenidos por prensa y los de Soxhlet en el laboratorio, ni en la cosecha 2015 ( $p = 0,111$ )

ni en la de 2017 ( $p=0,406$ ). Aun cuando las concentraciones de fitoesteroles totales fueron más elevadas en los aceites de disolvente, su contribución al aceite total no fue suficiente para aumentar significativamente los niveles presentes en los aceites de prensa. Por tanto, en cuanto al contenido total de fitoesteroles, los aceites de prensa constituyen una buena alternativa a los aceites resultantes de la mezcla prensa/disolvente. Además, estos últimos deben ser refinados, produciéndose como consecuencia del refinado pérdidas parciales de fitoesteroles (Verleyen *et al.*, 2002b; Ortega-García *et al.*, 2006; Aguirre *et al.*, 2012)

Los aceites de la cosecha 2017 presentaron claramente mayores concentraciones de fitoesteroles totales que los de la cosecha 2015. Las concentraciones halladas para los aceites de prensa estuvieron comprendidas entre 2839 y 4290 mg/kg en 2015 y entre 4476 y 5284 mg/kg en 2017. Asimismo, en los aceites de disolvente se encontraron concentraciones comprendidas entre 4849 y 5754 mg/kg y entre 6678 y 9249 mg/kg en 2015 y 2017, respectivamente. El factor cosecha tuvo, por tanto, una elevada influencia en el contenido total de fitoesteroles. Su contribución a la variabilidad total del conjunto de resultados fue mayor que la del tipo de semilla y similar a la del proceso de extracción.

De forma similar a lo observado para la composición de ácidos grasos, las notables diferencias halladas en el contenido total de fitoesteroles entre cosechas podrían ser atribuidas a las diferencias en las condiciones medioambientales durante el desarrollo de las semillas. Las mayores temperaturas registradas en 2017 en combinación con las diferencias comentadas en el registro de precipitaciones podrían explicar las cantidades más elevadas de fitoesteroles totales en los aceites de esta cosecha. En este sentido, Schaller (2003) sugirió que una mayor acumulación de fitoesteroles en el girasol puede ser una respuesta de las semillas a altas temperaturas, debido a su papel en la regulación de la fluidez y la permeabilidad de la membrana. Posteriormente, Roche *et al.* (2006) observaron que niveles elevados de fitoesteroles estaban relacionados con temperaturas cálidas y grave déficit de agua. En otro estudio, Jane Roche *et al.* (2010) afirmaron que niveles más altos de fitoesteroles totales se obtuvieron con la siembra tardía, registrándose temperaturas medias más altas durante la floración y la maduración de la semilla. Estos resultados coinciden con otros estudios

sobre semillas de cártamo (Roche *et al.*, 2019). Resultados similares han sido obtenidos en semillas de soja sometidas a temperaturas elevadas en invernadero (Vlahakis & Hazebroek, 2000) y en el campo (Yamaya *et al.*, 2007), mientras que no se ha observado ningún efecto de la temperatura en semillas de canola (Hamama *et al.*, 2003). Por otra parte, diferentes autores han informado que el estrés hídrico durante el desarrollo de la semilla mejora la acumulación de fitoesterol en las semillas de girasol (Roche *et al.*, 2006; Anastasi *et al.*, 2010).

Con objeto de comparar el contenido total de fitoesteroles en las semillas, se hizo una estimación a partir de las concentraciones de fitoesteroles totales halladas en los aceites de prensa y disolvente, por un lado, y de los rendimientos grasos, por otro. En la Tabla 24 se muestran los valores estimados. Las semillas GF-7 presentaron un contenido de fitoesteroles totales de aproximadamente un 50% más que el Control en la cosecha 2015 y próximo a un 30% más en la cosecha 2017. Los valores estimados para las semillas GF-2 fueron similares a los hallados en las semillas Control. Las cantidades totales de fitoesteroles estimadas en las semillas son coherentes con estudios genéticos previos. En este sentido, diferentes híbridos de girasol enriquecidos en fitoesteroles mostraron cantidades totales en un rango comprendido entre 1426 y 4710 mg/kg semillas (Fernández-Cuesta *et al.*, 2012a).

**Tabla 24.-** Contenidos estimados de fitoesteroles totales en aceite total (prensa+disolvente) y en semillas.

	Aceite total (mg/kg)		Semillas (mg/kg)	
	2015	2017	2015	2017
<b>Control</b>	3932	5343	1345	1913
<b>GF-2</b>	3397	5625	1260	1901
<b>GF-7</b>	4709	6367	2058	2470

Datos calculados a partir de los datos de las Tablas 18, 22 y 23. Los datos en el aceite han sido calculados considerando la mezcla integral entre el aceite crudo obtenido en prensa y el aceite crudo obtenido por disolvente.

#### 4.2.5 Tocoferoles

En la Tabla 25 se reflejan los resultados obtenidos para el contenido en estos compuestos en las muestras. Como era de esperar, el  $\alpha$ -tocoferol fue el tocoferol predominante hallado en los aceites estudiados. También se detectaron pequeñas cantidades de  $\beta$ -tocoferol. El  $\alpha$ -tocoferol constituyó el 96% del total de tocoferoles, lo cual es consistente con resultados obtenidos en otros estudios (Velasco *et al.*, 2002; Fernández-Cuesta *et al.*, 2012b; Ayerdi Gotor *et al.*, 2015).

Los valores hallados para el contenido total de tocoferol se encontraron entre los valores de Nolasco *et al.* (2004) (500 a 1200 mg/kg de aceite) y Velasco *et al.* (2002) (562-1872 mg/kg de aceite) (Tabla 25). Los valores más elevados fueron hallados en GF-2, 922 mg/kg ( $\pm 71$ ), seguidos de los aceites GF-7, 762 mg/kg ( $\pm 28$ ) y la muestra Control 512 mg/kg ( $\pm 14$ ). Los resultados de tocoferoles obtenidos en los aceites de prensa fueron similares a sus respectivos aceites de disolvente. Por otra parte, a diferencia del contenido total de fitoesteroles, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de tocoferol entre aceites de diferentes cosechas.

Algunos estudios realizados en aceites de soja (Almonor *et al.*, 1998) y girasol (Velasco *et al.*, 2002; Ayerdi Gotor *et al.*, 2006, 2015; Fernández-Cuesta *et al.*, 2012b) han mostrado claramente que los niveles de tocoferol dependieron del genotipo y de las condiciones climatológicas. Se observó un gran efecto de la temperatura. Se produjo una reducción en el contenido total de tocoferol cuando las plantas fueron expuestas a temperaturas más elevadas durante el desarrollo de las semillas (Ayerdi Gotor *et al.*, 2015).

**Tabla 25.-** Contenido de tocoferoles (mg/kg) de los aceites extraídos mediante prensado y posterior extracción con disolvente.

Cosecha	Control		GF-2		GF-7	
	Prensa	Disolvente	Prensa	Disolvente	Prensa	Disolvente
<b>2015</b>	524	492	870	1025	777	764
<b>2017</b>	515	517	881	912	722	784

Los resultados se expresaron como valores medios de 2 determinaciones. El coeficiente de variación fue de un 3%.

Sin embargo, a pesar de las diferencias en las condiciones climatológicas no se encontraron diferencias en el contenido total de tocoferoles entre las dos cosechas estudiadas en el presente trabajo de Tesis. Estos resultados, sin embargo, están de acuerdo con estudios en semillas de soja, donde los niveles totales de tocoferoles no se vieron afectados por diferentes temperaturas de crecimiento (Britz & Kremer, 2002).

#### 4.2.6 Elementos metálicos y otros elementos

En las Tablas 26-27 se recogen los resultados obtenidos para el análisis elemental de los aceites de 2015 y 2017, respectivamente. Los elementos mayoritarios fueron Ca, Fe, K, Mg, P, S y Na. Los niveles de Fe y Cu fueron consistentes con los encontrados en otros estudios (Lamas *et al.*, 2014). Por otra parte, los valores de algunos metales pesados como Zn, Cd y Pb estuvieron por debajo de los reportados por Ansari *et al.* (2009), cuyos rangos fueron 2,7-7,7 mg/kg, 1,7-6,2 mg/kg y 0,7-4,4 mg/kg para el Zn, Cd y Pb respectivamente. Los niveles de Cd y Pb, elementos altamente tóxicos incorporados por contaminación medioambiental, estuvieron en determinados aceites por debajo de los límites de detección en algunos casos, aunque en otros por encima del límite de 0,1 recogidos en el CODEX Stan 193-1995.

Se encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de muestra para el contenido de Ca, K, Mg y P, mientras que no se detectaron diferencias importantes para el resto de elementos analizados. Con excepción del Ca en la cosecha 2015, los niveles de estos cuatro elementos fueron más elevados en la muestra GF-7, seguida del Control y GF-2.

Los aceites de prensa presentaron claramente niveles de Ca, Mg y P más bajos que sus correspondientes aceites de disolvente (Tablas 26-27). Lo mismo ocurrió para el K. Concretamente, los aceites de prensa presentaron niveles de P comprendidos entre 9 y 36 mg/kg, mientras que en los aceites de disolvente los niveles oscilaron entre 263 y 585 mg/kg. Niveles tan elevados de P como los del presente trabajo han sido hallados en otros estudios (Lamas *et al.*, 2014, 2016). Estos resultados pueden ser atribuidos a la mayor capacidad de extracción del hexano que del propio aceite, como se ha comentado anteriormente para los fitoesteres..

**Tabla 26.-** Análisis elemental (mg/kg) de los aceites iniciales de la cosecha 2015, extraídos por prensa y disolvente.

	Control		GF-2		GF-7	
	Prensa	Disolvente	Prensa	Disolvente	Prensa	Disolvente
Al	1,2	nd	0,2	0,5	nd	nd
As	0,9	1,2	1,0	0,8	0,7	1,1
B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ba	0,4	1,0	0,4	0,7	0,4	0,9
Ca	31,8	202,8	24,1	99,6	21,9	158,9
Cd	nd	nd	0,1	nd	nd	nd
Co	nd	0,1	nd	0,2	0,2	0,1
Cr	nd	nd	nd	nd	0,4	nd
Cu	0,4	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4
Fe	7,0	4,5	3,1	2,6	4,4	4,3
K	7,6	75,6	7,2	38,9	4,8	95,0
Mg	6,7	134,7	5,8	60,4	4,6	107,6
Mn	nd	0,7	nd	0,3	nd	0,5
Na	3,0	2,5	7,6	2,9	nd	11,6
Ni	0,2	0,1	0,5	0,1	0,3	0,4
P	11,7	511,5	9,3	262,8	11,9	513,7
Pb	nd	0,2	0,2	0,1	0,1	nd
S	11,4	11,5	11,6	13,4	7,3	19,0
Sr	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1	0,3
V	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
Zn	4,7	1,9	0,8	1,9	1,4	2,9

**Tabla 27.-** Análisis elemental (mg/kg) de los aceites iniciales de la cosecha 2017, extraídos por prensa y disolvente.

	Control		GF-2		GF-7	
	Prensa	Disolvente	Prensa	Disolvente	Prensa	Disolvente
Al	1,5	1,8	1,2	1,9	1,3	2,3
As	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B	nd	nd	0,2	nd	nd	nd
Ba	0,2	0,7	0,4	0,4	0,2	1,0
Ca	78,5	217,0	58,6	173,6	106,9	305,4
Cd	nd	nd	0,1	nd	nd	0,1
Co	0,2	0,1	nd	nd	nd	nd
Cr	0,1	0,1	nd	0,1	0,1	0,2
Cu	1,1	0,5	0,2	0,5	0,3	1,1
Fe	6,0	22,7	4,6	23,5	5,8	32,0
K	6,7	61,0	7,3	31,0	6,4	95,4
Mg	11,6	114,1	6,3	63,7	14,4	158,2
Mn	0,1	0,8	0,1	0,5	0,2	1,1
Na	4,0	6,6	2,9	9,8	6,1	9,2
Ni	0,2	nd	0,1	0,1	0,1	0,2
P	27,3	404,2	15,4	295,6	36,4	585,1
Pb	nd	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4
S	13,0	17,9	6,6	12,3	14,3	15,0
Sr	0,1	0,5	0,1	0,3	0,1	0,7
V	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Zn	1,0	2,5	0,6	1,5	1,5	4,6

En cuanto a los minerales de interés nutricional, Cu, Fe y Zn, no se encontraron diferencias sustanciales entre los aceites de prensa y disolvente, salvo para el Fe en la cosecha 2017, donde los aceites de disolvente presentaron claramente niveles más elevados

Por otra parte, los aceites de la cosecha 2017 presentaron mayores niveles de Ca que los correspondientes a la cosecha 2015. También se observó lo mismo para el Mg y el P, con excepción de los aceites extraídos con disolvente de la muestra Control. Asimismo, las concentraciones de Fe fueron más elevadas en las muestras de la cosecha 2017 extraídas con disolvente, siendo similares en los aceites de prensa.

#### **4.2.7 Comparación con las características exigidas en el Codex Alimentarius para aceites vírgenes**

En esta Tesis se han estudiado por separado los procesos de extracción por presión y extracción con disolvente con el objeto de establecer la viabilidad del aceite de presión como *aceite virgen*, ya que supondría un valor añadido para comercializar ambos aceites de forma independiente.

Los aceites de prensa del presente estudio cumplen con la definición de *aceite virgen*, ya que se han obtenido sin modificar el aceite, por procedimientos mecánicos y por aplicación únicamente de calor, en el acondicionamiento de las semillas. Cabría la posibilidad de considerarlos incluso *aceites prensados en frío*, ya que las semillas no han sido tostadas previamente a la extracción (Matthäus & Spener, 2008). El color, olor y sabor son los característicos del aceite de girasol, y se encuentra exento de sabores extraños.

En la Tabla 28 se recogen las especificaciones exigidas en el Codex Alimentarius (2015) para aceites vírgenes de girasol y los correspondientes resultados experimentales, expresados como valores medios de las dos cosechas, para cada una de las muestras estudiadas. Los valores exigidos para metales pesados se han tomado de la Norma General del Codex para los Contaminantes y las Toxinas presentes en los Alimentos y Piensos (CODEX STAN 193-1995).

Considerando la composición de ácidos grasos, las tres muestras podrían ser incluidas en la categoría de *aceite de girasol*, ya que el contenido en ácidos oleico (<33%) y linoleico (< 56%) no alcanzan los límites establecidos para *medio oleico*.

Si bien los contenidos en **esteroles y tocoferoles totales** de las muestras cumplen con las especificaciones para un *aceite de girasol*, presentan una composición especial en esteroles, explicada anteriormente, salvo la muestra Control como era de esperar. En este caso se requeriría una adecuación de la norma, como ocurrió en el caso de los aceites de alto contenido en ácido esteárico (BOE, 2010).

Al ser obtenidos en pequeña escala, se ha cuidado la obtención y, por tanto, los aceites cumplen con las especificaciones de calidad en cuanto a Materia volátil a 105°C inferior al 0,2% e impurezas insolubles inferior al 0,05% (datos no mostrados), así como a la acidez, que fue inferior al 1% en todos los casos.

Las mayores dificultades para poder comercializar estos aceites para consumo directo se podrían presentar debidas al contenido de metales. Los valores medios se quedan al límite o se superan para todas las muestras, salvo para el arsénico.

Como ya se ha comentado, las diferencias significativas en el contenido de metales se deben al método de extracción, más que a la influencia de la cosecha o a la variedad. Aun cuando el número de muestras estudiadas es bajo para poder establecer conclusiones, habría que extremar la vigilancia durante el cultivo para evitar la contaminación del aceite con trazas metálicas incorporadas a partir de fertilizantes y fitosanitarios, si se pretende una comercialización directa de estos aceites.

**Tabla 28.-** Principales características de composición y calidad exigidas en el Codex Alimentarius para aceites vírgenes de girasol y valores medios obtenidos en las muestras.

	CODEX STAN 210-1999			Muestras		
	Girasol	Alto Oleico	Medio Oleico	Control	GF-2	GF-7
<b>Ácidos grasos (%)</b>						
C16:0	5,0-7,6	2,6-5,0	4,0-5,5	7,2	6,8	6,6
C16:1	nd-0,3	nd-0,1	nd-0,05	0,1	0	0,1
C18:0	2,3-4,0	2,0-4,0	3,0-5,0	4	2,8	4
C18:1	14,0-39,4	75,0-90,7	43,1-71,8	32,5	32,2	31,1
C18:2	48,3-74,0	2,1-17,0	18,7-45,3	54,8	57,3	56,6
C18:3	nd-0,3	nd-0,3	nd-0,5	0,1	0	0,1
C20:0	0,1-0,5	0,2-0,5	0,2-0,4	0,4	0,3	0,3
C20:1	nd-0,3	0,1-0,5	0,2-0,3	0,1	0,1	0,1
C22:0	0,3-1,5	0,5-1,6	0,6-1,1	0,7	0,5	0,7
C24:0	nd-0,5	nd-0,5	0,3-0,4	0,3	0,2	0,3
<b>Esteroles (%)</b>						
Campesterol	6,5-13,0	5,0-13,0	9,1-9,6	7	29,7	6,5
Estigmasterol	6,0-13,0	4,5-13,0	9,0-9,3	7,2	8,2	9,1
$\beta$ -Sitosterol	50-70	42,0-70	56-58	63,2	47,6	49,7
$\Delta$ 5-Avenasterol	nd-6,9	1,5-6,9	4,8-5,3	0,8	1,8	0,4
$\Delta$ 7-Estigmastenol	6,5-24,0	6,5-24,0	7,7-7,9	17,7	6,9	29,6
$\Delta$ 7-Avenasterol	3,0-7,5	nd-9,0	4,3-4,4	4,1	4,6	4,3
<b>Esteroles Totales (mg/kg)</b>	2400-5000	1700-5200		3861	4032	4787
<b>Tocoferoles Totales (mg/kg)</b>	450-1120	450-1120	509-741	520	876	750
<b>Características de calidad</b>						
Acidez* (% oleico)	$\leq 2$	$\leq 2$	$\leq 2$	0,6	0,6	0,6
Hierro (mg/kg)	$\leq 5$	$\leq 5$	$\leq 5$	6,5	3,9	5,1
Cobre (mg/kg)	$\leq 0,4$	$\leq 0,4$	$\leq 0,4$	0,8	0,4	0,4
Plomo** (mg/kg)	$\leq 0,1$	$\leq 0,1$	$\leq 0,1$	nd	0,2	0,3
Arsénico** (mg/kg)	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$	0,5	0,5	0,4

\* El CODEX STAN 210-1999 indica Índice de Acidez Máx 4 meq KOH/kg

\*\* Valores recogidos en el CODEX STAN 193-1995

#### **4.2.8 Volátiles**

El objetivo del trabajo recogido en este capítulo es caracterizar los compuestos volátiles en los aceites de las distintas líneas de girasol estudiadas y evaluar el efecto que los procesos de extracción ejercen en los mismos.

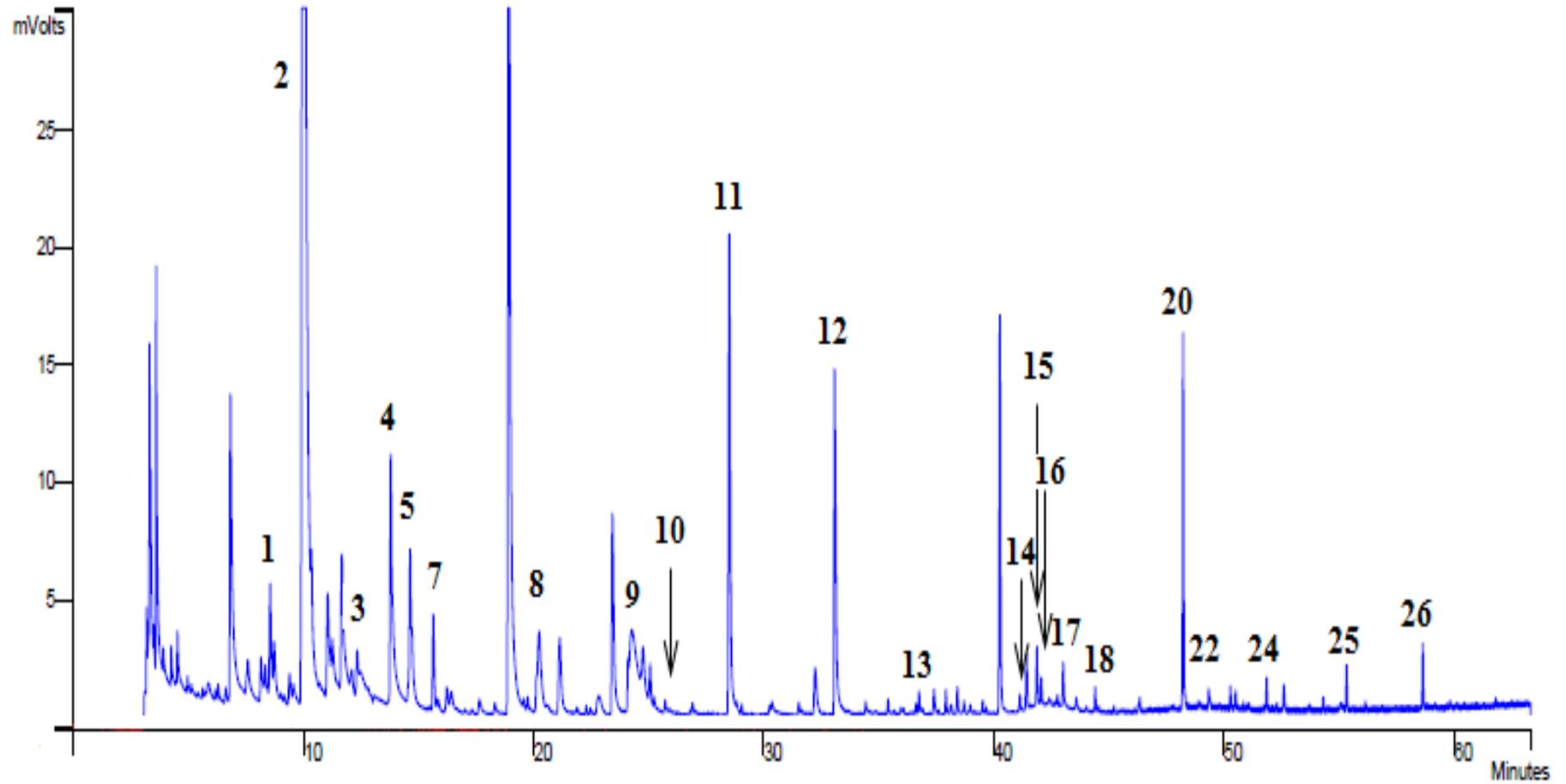
La aceptación de los aceites dependerá en gran medida de su perfil aromático. Por tanto, es de gran interés conocer los compuestos volátiles que contribuyen en el aroma para poder diferenciar aceites de nuevas variedades de los aceites de semillas no modificadas.

En la Tabla 29 se presentan los compuestos volátiles detectados en los aceites y en la Figura 16 un cromatograma representativo de un aceite crudo de prensa. Los compuestos detectados ya han sido identificados en plantas de girasol (Etievant *et al.*, 1984).

**Tabla 29.-** Compuestos volátiles detectados en las muestras de aceites crudos obtenidos mediante extracción por presión y posterior extracción con disolvente.

N ° Pico	Tr	Fórmula
1	8,6	Pentanal
2	10,2	(1S,5S)-2,6,6-Trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno ( $\alpha$ -Pineno)
3	12,3	2,2-Dimetil-3-metilenbicyclo[2.2.1]heptano (Canfeno)
4	13,8	Hexanal
5	14,7	6,6-Dimetil-2-metilenbicyclo[3.1.1]heptano (1- $\beta$ -Pineno)
6	15,1	3-Pentanol
7	15,7	1-Isopropil-4-metilenbicyclo[3.1.0]hexano (Sabineno)
8	20,3	1-Metil-4-isopropilciclohexeno (Limoneno)
9	24,3	3-Octanona
10	25,7	4-Isopropiltolueno ( <i>p</i> -Cimeno)
11	28,5	1-Hexanol
12	33,1	Ácido acético
13	36,7	Pentadecano
14	41,1	Acetato de 1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol (Bornil acetato)
15	41,9	(1aR,7R,7aR,7bS)-1,1,7,7a-Tetrametil-2,3,5,6,7,7b-hexahidro-1aH-ciclopropa[a]naftaleno (Calareno)
16	42,1	Hexadecano
17	43,0	Oxolan-2-ona ( $\gamma$ -Butirolactona)
18	44,4	Ácido pentanoico
19	47,8	1-Heptadeceno
20	48,3	Ácido hexanoico
21	48,7	<i>cis</i> -2-Nonadeceno
22	49,4	Octadecano
23	50,5	1-Octadeceno
24	51,9	Ácido heptanoico
25	55,4	Ácido octanoico
26	58,7	Ácido nonanoico

Tr., tiempo de retención.



**Figura 16.-** Cromatograma representativo de un aceite de prensa crudo. Para la asignación de picos ver Tabla 29.

Se pueden dividir en tres grupos, terpenoides ( $\alpha$ -Pineno, Canfeno, 1- $\beta$ -Pineno, Sabineno, Limoneno, *p*-Cimeno, Bornil acetato y Calareno), los compuestos de oxidación lipídica (Pentanal, Hexanal, 3-Pentanol, 3-Octanona, 1-Hexanol, Ácido acético,  $\gamma$ -Butirolactona, Ácido pentanoico, Ácido hexanoico, Ácido heptanoico, Ácido octanoico y Ácido nonanoico) (van Ruth *et al.*, 1999; Keszler *et al.*, 2000; Choe & Min, 2006) e hidrocarburos alifáticos (alcanos y alquenos) que podrían provenir de reacciones oxidativas y/o del disolvente de extracción. Los monoterpenos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, canfeno y limoneno fueron los más abundantes en las muestras analizadas (Tabla 30). El mecanismo de la síntesis de terpenoides y/o la liberación de estructuras en semillas secas aún se desconoce (Pichersky *et al.*, 2006; Botnick *et al.*, 2012).

Algunas muestras también presentaron contenidos relevantes de hexanal, 1-hexanol y ácidos orgánicos cortos, como acético, pentanoico o hexanoico (Tabla 30). Algunos de estos compuestos se han descrito como productos derivados del 13-hidroperóxido del ácido linoleico durante el proceso de degradación oxidativa del aceite (Keszler *et al.*, 2000; Choe & Min, 2006). Los ácidos grasos insaturados son particularmente susceptibles a la oxidación y es bien conocido que algunos de los compuestos de oxidación secundarios son aldehídos volátiles, como *E*-2-heptenal, con umbrales de olores muy bajos y responsables del desagradable olor rancio.

Choe & Min (2006) y Keszler *et al.* (2000) propusieron un mecanismo de reacción de la oxidación del 13-hidroperóxido del ácido linoleico para explicar la formación del 2,4-decadienal y ácido octanoico, hepteno, 2-heptenal, heptanona, heptanal, ácido heptanoico, 2-nonenal y 2,4-nonadienal, pentano, pentanol, pentanal y ácido pentanoico, hexanal y ácido hexanoico. Todos estos compuestos fueron hallados en las muestras analizadas del presente estudio (Tabla 30).

**Tabla 30.-** Contenido de compuestos volátiles ( $\mu\text{g/g}$ ) encontrados en los aceites crudos.

	Control				GF-2				GF-7			
	Prensa		Disolvente		Prensa		Disolvente		Prensa		Disolvente	
	2015	2017	2015	2017	2015	2017	2015	2017	2015	2017	2015	2017
Pentanal	0,0	1,0	0,1	0,4	nd	0,2	0,1	0,3	0,0	0,2	0,0	0,2
$\alpha$ -Pino	24,4	77,7	13,9	29,3	2,3	13,0	5,1	23,0	1,1	9,9	2,8	9,3
Canfeno	0,6	1,7	0,4	0,7	0,0	0,1	nd	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2
Hexanal	0,3	0,2	0,8	1,1	0,2	0,6	1,0	0,9	0,1	0,5	0,6	0,9
1- $\beta$ -Pino	0,7	2,4	0,6	1,3	0,1	0,4	1,7	0,8	0,1	0,3	nd	0,4
3-Pentanol	nd	nd	0,4	0,1	nd	nd	nd	0,2	nd	nd	0,2	0,1
Sabineno	0,3	0,6	0,3	0,5	0,1	0,1	0,0	0,3	nd	0,3	0,1	0,3
Limoneno	0,7	1,7	1,5	0,6	0,1	0,3	1,4	0,4	0,1	0,2	0,3	0,2
3-Octanona	1,0	4,0	1,4	0,5	0,0	0,5	nd	0,9	0,1	0,4	0,1	0,7
<i>p</i> -Cimeno	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	nd	0,1
1-Hexanol	0,1	0,2	1,3	3,1	0,1	0,8	2,0	8,0	0,2	0,9	2,5	7,0
Ác. Acético	0,4	0,6	0,5	0,5	0,3	0,6	1,3	1,2	0,0	0,7	0,2	1,0
Pentadecano	0,1	0,2	0,2	0,2	nd	0,0	nd	0,1	nd	0,0	nd	0,1
Bornil acetato	nd	0,4	0,8	0,5	nd	0,0	nd	0,2	nd	0,0	nd	0,1
Calareno	0,0	0,1	0,6	0,3	0,1	0,1	0,3	0,5	0,1	0,1	1,0	0,6
Hexadecano	0,2	0,4	0,8	0,7	nd	0,0	0,1	0,4	nd	0,0	nd	0,3
$\gamma$ -Butirolactona	0,4	0,2	1,2	0,5	0,0	0,1	0,3	0,6	0,0	0,0	0,7	0,6
Ác. Pentanoico	0,2	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,2	0,5	nd	0,0	0,3	0,3
1-Heptadeceno	0,0	0,1	0,1	0,0	nd	nd	nd	0,0	nd	nd	nd	nd
Ác. Hexanoico	0,3	0,3	0,6	1,0	0,1	0,3	1,5	2,5	0,0	0,1	0,4	1,8
<i>cis</i> -2-Nonadecano	nd	0,0	0,0	0,0	nd	nd	nd	0,0	nd	nd	nd	nd
Octadecano	0,0	0,0	0,3	0,1	nd	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,4	0,4
1-Octadeceno	0,0	nd	0,2	0,1	nd	0,0	0,2	0,5	0,0	0,0	0,4	0,4
Ác. Heptanoico	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
Ác. Octanoico	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2
Ác. Nonanoico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2	0,2	0,0	0,1	0,0	0,2
<b>Total (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>29,7</b>	<b>92,4</b>	<b>26,4</b>	<b>41,9</b>	<b>3,4</b>	<b>17,4</b>	<b>15,9</b>	<b>42,3</b>	<b>1,9</b>	<b>13,8</b>	<b>10,0</b>	<b>25,3</b>

---

Coeficiente de variación del método <6%. nd, no detectado.

En cuanto al contenido total de compuestos volátiles, se encontró que las muestras GF-2 y GF-7 presentaron mayores concentraciones que la muestra Control, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre GF-2 y GF-7 cuando se analizó el conjunto total de datos (Tabla 30). Los compuestos volátiles que presentaron significación ( $p < 0,05$ ) cuando se compararon los tres tipos de semillas fueron  $\alpha$ -Pino, Canfeno, Sabineno y Limoneno. GF-2 mostró cantidades significativamente más elevadas de estos cuatro compuestos que las otras dos muestras, mientras que GF-7 presentó cantidades intermedias de  $\alpha$ -Pino y en el Control se encontraron cantidades intermedias de Canfeno (Tabla 30).

El análisis estadístico aplicado para evaluar diferencias entre cosechas mostró claramente que el contenido total de compuestos volátiles fue significativamente más elevado en la cosecha 2017. Se encontraron diferencias significativas para  $\alpha$ -pino, sabineno y pentanal, cuyas cantidades fueron más elevadas en la cosecha 2017. Mientras que el pentanal es un compuesto de oxidación, los otros dos compuestos corresponden a volátiles diferenciadores del tipo de semilla, como se ha comentado anteriormente.

No se encontraron diferencias significativas en el contenido total de compuestos volátiles entre los aceites de prensa y los aceites de disolvente. No obstante, sí se encontraron diferencias significativas para los siguientes compuestos: calareno, hexanal, Penten-3-ol, 1-Hexanol,  $\gamma$ -Butirolactona, Ácido hexanoico, Ácido nonanoico, Hexadecano, Octadecano y 1-Octadeceno. Los aceites obtenidos con disolvente presentaron cantidades más elevadas de todos estos compuestos relacionados con la rancidez que los aceites de prensa.

El Calareno es un terpenoide característico de la semilla de girasol (Bocci & Frega, 1996) y el conjunto formado por Hexanal, Penten-3-ol, Hexan-1-ol,  $\gamma$ -Butirolactona, Ácido hexanoico y Ácido nonanoico corresponde a compuestos derivados de oxidación lipídica (Keszler *et al.*, 2000; Choe & Min, 2006). Las cantidades significativamente más elevadas de estos compuestos en los aceites de disolvente pueden atribuirse a la mayor capacidad extractiva del hexano que del propio aceite, a pesar de su menor polaridad. En la extracción por presión la solubilidad de los

componentes menores depende de la cantidad y polaridad del aceite. Sin embargo, en la extracción con disolvente los componentes se van concentrando mediante el contacto continuado con disolvente fresco de un material que, de partida, ya ha perdido gran cantidad de aceite.

El mayor contenido de compuestos volátiles de oxidación en los aceites de disolvente también puede ser atribuido al progreso de la oxidación en los pellets hasta que éstos son extractados con disolvente. Durante la molienda y extracción en prensa se liberan enzimas lipolíticas y oxidativas que inician el proceso oxidativo. El aumento de temperatura por fricción dentro del expeller acentúa la oxidación. Todos los compuestos generados, tanto primarios como secundarios, son extraídos posteriormente por el hexano. Estos resultados están en concordancia con lo referido por Bredvan *et al.* (2000), que indican que los aceites de girasol obtenidos por extracción con hexano presentaron un mayor deterioro inicial que los obtenidos por prensado.

Por otra parte, los compuestos hexadecano, octadecano y 1-octadeceno son compuestos que por su naturaleza podrían estar presentes en el hexano de extracción, de aquí que se encontraran como compuestos residuales en los aceites obtenidos por disolvente. Mientras que el Octadecano y el 1-Octadeceno no fueron detectados en los aceites de prensa o presentaron niveles por debajo de los límites de cuantificación, no ocurrió lo mismo con el hexadecano. Los niveles de hexadecano hallados en la mayoría de los aceites de prensa estuvieron por debajo de los límites de detección o cuantificación; no obstante, los aceites GF-2 mostraron cantidades significativas, aunque bastante más bajas que sus correspondientes aceites de disolvente.

### 4.3 INFLUENCIA DEL PROCESO DE REFINACIÓN

Como es sabido, el proceso de refinación permite la transformación de aceites crudos en aceites aptos para el consumo mediante la eliminación de componentes que confieren color, olor y sabor, compuestos nocivos y otros que provocan rancidez y disminuyen, por tanto, el periodo de vida útil. La refinación también permite modificar la apariencia de los aceites para que sean aceptados por los consumidores, mediante la eliminación de ciertos componentes como las ceras y triglicéridos saturados que imparten turbidez. Es por ello que cada aceite de los obtenidos para este estudio se ha procesado en función de sus características, mediante refinación química o física, adaptando las distintas etapas del proceso.

#### 4.3.1 Selección del proceso

Los aceites de este estudio presentaron niveles de fosfolípidos, medidos de forma indirecta mediante el contenido en fósforo, elevados (Tablas 26-27). Los aceites de prensa de 2015 con valores próximos a los niveles requeridos en la etapa de desodorización (< 10 mg/kg) constituyeron una excepción. Por tanto, estos últimos fueron sometidos a refinación física en dos etapas, decoloración y desodorización.

En la Tabla 31 se muestran los valores de P obtenidos en los aceites directamente decolorados con 0,1% de Trisyl y 1% de tierra Tonsil 278 FF. En todos los casos el nivel de P disminuyó por debajo del límite (<10 mg/kg) requerido para el refinado físico (Jahani *et al.*, 2008).

Los niveles de los aceites de prensa de 2017 superaron el límite de 10 mg/kg, presentando un rango de 15-36 mg/kg. Por otra parte, las cantidades de P halladas en los aceites de disolvente fueron, como era de esperar, mucho más elevadas, con cantidades que oscilaron entre 263 y 514 mg/kg en 2015 (Tabla 26) y entre 296 y 585 mg/kg en 2017 (Tabla 27). Estos datos están de acuerdo con los encontrados en aceites crudos de girasol en otros estudios (~500 mg/kg) (Lamas *et al.*, 2014, 2016).

El mismo tratamiento de decoloración utilizado en los aceites de 2015 fue aplicado a los aceites de prensa de 2017 (Tabla 32). Los resultados mostraron, sin embargo, que el tratamiento no fue efectivo para reducir los niveles de P por debajo de 10 mg/kg. Se aplicaron diferentes tratamientos adicionales, utilizando un tipo de tierra diferente (Tonsil 114 FF) y distintas proporciones de Trisyl y tierra decolorante, y los resultados no mejoraron.

**Tabla 31.-** Influencia de la etapa de decoloración en los aceites de prensa de 2015.

	Control		GF-2		GF-7	
	Inicial	Tratado <sup>a</sup>	Inicial	Tratado <sup>a</sup>	Inicial	Tratado <sup>a</sup>
Al	1,2	nd	0,2	0,3	nd	nd
As	0,9	0,5	1,0	nd	0,7	0,1
B	nd	0,6	nd	1,3	nd	1,1
Ba	0,4	0,5	0,4	0,6	0,4	0,6
Ca	31,8	47,0	24,1	8,4	21,9	37,5
Cd	nd	nd	0,1	0,1	nd	0,1
Co	nd	nd	nd	nd	0,2	nd
Cr	nd	0,1	nd	0,1	0,4	0,1
Cu	0,4	0,1	0,5	0,1	0,4	0,1
Fe	7,0	2,0	3,1	2,5	4,4	2,1
K	7,6	2,6	7,2	5,1	4,8	4,9
Mg	6,7	4,6	5,8	5,1	4,6	5,4
Mn	nd	0,1	nd	0,1	nd	0,1
Na	3,0	22,8	7,6	27,4	nd	28,0
Ni	0,2	0,2	0,5	0,1	0,3	0,2
<b>P</b>	<b>11,7</b>	<b>4,2</b>	<b>9,3</b>	<b>3,7</b>	<b>11,9</b>	<b>5,9</b>
Pb	nd	nd	0,2	0,1	0,1	0,1
S	11,4	10,1	11,6	5,8	7,3	18,2
Sr	0,1	nd	0,1	nd	0,1	nd
V	0,1	nd	0,1	0,1	0,1	nd
Zn	4,7	4,6	0,8	0,6	1,4	1,6

<sup>a</sup>aceite decolorado con 0,1 Trisyl y 1% de tierra Tonsil 278 FF.

**Tabla 32.-** Influencia de la etapa de decoloración en los aceites de prensa de 2017.

Elementos (mg/kg)	Control		GF-2		GF-7			
	Inicial	Tratado <sup>a</sup>	Inicial	Tratado <sup>a</sup>	Inicial	Tratado <sup>a</sup>	Tratado <sup>b</sup>	Tratado <sup>c</sup>
Al	1,5	0,8	1,2	1,4	1,3	0,8	0,6	1,5
As	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	nd
B	nd	14,1	0,2	23,3	nd	14,1	6,7	11,3
Ba	0,2	0,1	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	0,3
Ca	78,5	21,2	58,6	35,6	106,9	39,9	27,5	49,2
Cd	nd	nd	0,1	nd	nd	0,1	nd	nd
Co	0,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cr	0,1	nd	nd	0,1	0,1	nd	nd	nd
Cu	1,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,6	0,2
Fe	6,0	1,3	4,6	1,6	5,8	1,4	0,9	1,8
K	6,7	3,8	7,3	1,7	6,4	5,2	3,9	2,4
Mg	11,6	12,2	6,3	7,5	14,4	13,0	11,8	11,3
Mn	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
Na	4,0	3,6	2,9	4,2	6,1	5,6	3,6	4,9
Ni	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>P</b>	<b>27,3</b>	<b>24,2</b>	<b>15,4</b>	<b>10,7</b>	<b>36,4</b>	<b>30,1</b>	<b>28,9</b>	<b>24,4</b>
Pb	nd	nd	0,2	nd	0,4	nd	nd	0,1
S	13,0	12,2	6,6	12,3	14,3	11,8	11,3	14,2
Sr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1
V	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Zn	1,0	0,5	0,6	0,6	1,5	2,6	0,5	0,8
<b>Clorofilas (mg/kg)</b>	<b>2,7</b>	<b>1,0</b>	<b>1,5</b>	<b>1,1</b>	<b>6,9</b>	<b>3,1</b>	<b>2,5</b>	<b>1,4</b>

<sup>a</sup>aceite decolorado con 0,1 Trisyl y 1% de tierra Tonsil 278 FF. <sup>b</sup>aceite decolorado con 0,1 Trisyl y 1% de tierra Tonsil 114 FF. <sup>c</sup>aceite decolorado con 0,2 Trisyl y 2% de tierra Tonsil 114 FF.

Para la eliminación de fosfolípidos en estos casos se requeriría aplicar una etapa de desgomado ácido (Verleyen *et al.*, 2002b), lo que permitiría reducir sus niveles en más del 90% (Lamas *et al.*, 2014). Por tanto, se decidió que, a diferencia de los aceites de prensa de 2015, estos aceites debían ser refinados mediante refinación química, constituida por desgomado, neutralización, decoloración y desodorización.

Si bien la mayor parte de fosfolípidos son retirados en el desgomado, la decoloración permite reducir el contenido de P remanente a niveles adecuados. Por tanto, para una correcta eliminación de P mediante refinación química se examinaron además diferentes tratamientos en la etapa de decoloración, utilizando diferentes proporciones de Trisyl y tierra Tonsil 114 FF. La Tabla 33 muestra los resultados obtenidos para los aceites GF-7, prensa y disolvente, después de aplicar los diferentes tratamientos de decoloración en los aceites, previamente desgomados y neutralizados. Como se puede observar, los tratamientos más efectivos para reducir los niveles de P fueron el *tratamiento d* para los aceites extraídos por presión, con valores de P de 0,9 mg/kg, y el *tratamiento g* para los aceites extraídos con disolvente, con valores de 33,6 mg/kg.

La presencia de metales traza constituye un factor importante sobre la calidad de los aceites (Pehlivan *et al.*, 2008), ya que pueden actuar como agentes pro-oxidantes. Por ello, el proceso de refinación debería disminuir sus contenidos. Tras los procesos de decoloración estudiados, todos los elementos analizados disminuyeron su concentración, en mayor o menor medida, para cada uno de los aceites (Tablas 31-33).

En cuanto al Ca y Mg, complejados en su mayor parte por fosfolípidos, los niveles disminuyeron entre 70 y 90% y entre 87 y 93%, respectivamente (Tabla 33). Resultados similares han sido obtenidos por otros autores, con pérdidas de aproximadamente el 90% para ambos elementos en la etapa de desgomado ácido (Zufarov *et al.*, 2008). Como se puede observar, los tratamientos directos de decoloración en los aceites no neutralizados no fueron suficientes para reducir eficazmente los niveles de Ca y Mg (Tabla 32). Por tanto, para estos aceites, una posibilidad que evitaría la refinación química podría ser el desgomado enzimático, no

contemplado en este estudio, que permite reducir los contenidos de Ca y Mg en 80 y 90%, respectivamente (Lamas *et al.*, 2014).

**Tabla 33.-** Análisis elemental y contenido en clorofilas de los aceites GF-7 de 2017 obtenidos por prensa y disolvente después de ser sometidos a desgomado, neutralización y diferentes tratamientos de decoloración.

Elementos (mg/kg)	GF-7 Prensa		GF-7 Disolvente				
	Inicial	Tratado <sup>d</sup>	Inicial	Tratado <sup>d</sup>	Tratado <sup>e</sup>	Tratado <sup>f</sup>	Tratado <sup>g</sup>
Al	1,3	1,4	2,3	1,9	1,0	0,6	0,4
As	nd	0,1	nd	nd	0,1	nd	nd
B	nd	0,1	nd	0,1	0,3	0,3	0,1
Ba	0,2	0,1	1,0	0,6	0,1	0,1	0,1
Ca	106,9	39,2	305,4	95,5	31,1	40,7	31,0
Cd	nd	nd	0,1	nd	nd	nd	nd
Co	nd	nd	nd	0,1	nd	nd	nd
Cr	0,1	nd	0,2	nd	nd	nd	nd
Cu	0,3	0,3	1,1	0,4	0,1	0,2	0,2
Fe	5,8	1,7	32,0	10,7	3,9	4,0	2,9
K	6,4	3,5	95,4	6,1	3,6	3,4	3,0
Mg	14,4	1,0	158,2	19,8	12,7	15,1	11,4
Mn	0,2	nd	1,1	0,2	0,1	0,2	0,1
Na	6,1	3,6	9,2	14,1	13,2	13,9	12,2
Ni	0,1	nd	0,2	0,1	nd	0,4	nd
<b>P</b>	<b>36,4</b>	<b>0,9</b>	<b>585,1</b>	<b>62,6</b>	<b>39,2</b>	<b>47,1</b>	<b>33,6</b>
Pb	0,4	nd	0,4	0,4	0,3	0,1	0,1
S	14,3	10,5	15,0	7,3	14,8	14,8	11,5
Sr	0,1	nd	0,7	0,2	0,1	0,1	0,1
V	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	nd
Zn	1,5	0,5	4,6	1,9	0,8	0,8	0,8
<b>Clorofilas (mg/kg)</b>	<b>6,9</b>	<b>0,8</b>	<b>21,2</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>

<sup>d</sup>aceite decolorado con 0,2 Trisyl y 1% de tierra Tonsil 114 FF. <sup>e</sup>aceite decolorado con 0,3 Trisyl y 1% de tierra Tonsil 114 FF. <sup>f</sup>aceite decolorado con 0,2 Trisyl y 1,5% de tierra Tonsil 114 FF. <sup>g</sup>aceite decolorado con 0,2 Trisyl y 2% de tierra Tonsil 114 FF.

El contenido en Fe, de gran acción pro-oxidativa, también disminuyó considerablemente tras los tratamientos de decoloración. Los aceites tratados presentaron niveles de Fe  $\leq 3$  mg/kg.

Los niveles de clorofilas disminuyeron considerablemente en la etapa de decoloración. Por ejemplo, los contenidos se redujeron en un 80% cuando se aplicó directamente la decoloración en los aceites crudos (Tabla 32). Como era de esperar, la eliminación de clorofilas mejoró cuando se aplicaron previamente las etapas de desgomado y neutralización (Tabla 33). Los valores disminuyeron en 88% para el aceite GF-7 extraído por prensa y en 92% para el extraído con disolvente. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Kreps *et al.* (2014), que observaron reducciones de clorofilas de 4,3 a 3,6 mg/kg durante el desgomado ácido y de hasta el 96% en la decoloración. Finalmente, estos autores indicaron que durante la desodorización los niveles de clorofilas disminuyeron ligeramente, a valores inferiores a 0,25 mg/kg.

### **4.3.2 Refinación Física**

#### *4.3.2.1 Ácidos grasos*

En la Tabla 34 se presentan los resultados obtenidos para la composición de ácidos grasos de los aceites refinados mediante refinación física. A efectos comparativos, también se han incluido los resultados de los aceites crudos.

Los resultados obtenidos indicaron que las composiciones de ácidos grasos de los aceites refinados cumplieron con las características establecidas para los aceites refinados de girasol en la Reglamentación Técnico-Sanitaria de aceites vegetales comestibles (Real decreto 478/2007).

Como era de esperar, no se observaron cambios sustanciales en la composición de ácidos grasos entre los aceites refinados y los crudos. Sólo se observaron diferencias en la muestra GF-7 que, aunque significativas ( $p < 0,05$ ), fueron muy pequeñas.

**Tabla 34.-** Influencia del proceso de refinación física en la composición de ácidos grasos (%) de los aceites de prensa de 2015.

	GF-2		GF-7	
	Inicial	Refinado	Inicial	Refinado
<b>Ácidos grasos</b>				
C16:0	7,1±0,03	7,1±0,05	6,1±0,02	6,0±0,06
C16:1	nd	nd	nd	nd
C18:0	2,9±0,03	3,0±0,10	4,3±0,03a	4,7±0,11b
C18:1	34,7±0,15	35,0±0,68	39,6±0,15a	40,0±0,18b
C18:2	54,5±0,12	54,1±0,68	49,0±0,10b	48,3±0,21a
C20:0	0,3±0,02	0,3±0,01	0,4±0,00b	0,3±0,03a
C18:3	nd	nd	nd	nd
C20:1	nd	nd	nd	nd
C22:0	0,4±0,02	0,4±0,04	0,5±0,00	0,5±0,01
C24:0	0,2±0,01	0,2±0,01	0,2±0,01	0,2±0,02

Los resultados se expresan como valores medios  $\pm$  desviación estándar (n=4 para los aceites de prensa inicial y refinado de la muestra GF-2, n=3 para los aceites iniciales y n=6 para los refinados de la muestra GF-7). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre extractos de una misma muestra de semilla ( $p<0,05$ ), según el test de la *t* de *student*.

#### 4.3.2.2 Fitoesteroles

El efecto de la refinación física sobre la composición y contenido total de fitoesteroles se ilustra en la Tabla 35.

No se hallaron diferencias significativas en el contenido total de fitoesteroles entre los aceites crudos y refinados (Tabla 35). Según Verleyen *et al.* (2002b) la principal pérdida de fitoesteroles en la refinación física tiene lugar durante la etapa de desodorización y depende principalmente de la temperatura. Los resultados del presente trabajo pueden ser atribuidos a las condiciones suaves utilizadas en la etapa de decoloración, utilizando una tierra no activada con ácido (278 FF), y a la aplicación de condiciones controladas y óptimas de temperatura y vacío en la desodorización.

Con respecto a la composición de fitoesteroles, tampoco se observaron cambios significativos como consecuencia del proceso de refinación física. Los resultados confirman que las condiciones seleccionadas para la decoloración no fueron suficientemente drásticas para originar cambios en la composición debidos a la deshidratación de los  $\Delta 5$ -esteroles o la formación de isómeros de los  $\Delta 7$ -esteroles, reacciones para las que son necesarias temperaturas superiores a los 100°C y tierras decolorantes con elevada actividad (Biedermanm *et al.*, 1996; Kamal-Eldin, 1998). En cuanto a la etapa de desodorización, se ha descrito que los fitoesteroles  $\Delta 5$  insaturados, así como los 4-desmetilesteroles, tienen una mayor volatilidad y destilarían preferentemente (Van Hoed *et al.*, 2006).

**Tabla 35.-** Influencia del proceso de refinación física en la composición y concentración total de fitoesteroles de los aceites de prensa de 2015.

	GF-2		GF-7	
	Inicial	Refinado	Inicial	Refinado
<b>Composición (%)</b>				
Campesterol	29,5±0,46	29,6±0,43	6,4±0,22	6,5±0,08
Estigmasterol	7,5±0,24	7,4±0,19	8,8±0,27	8,4±0,18
β-Sitosterol	47,9±0,78	48,3±0,49	49,3±0,29	49,6±0,31
Δ5-Avenasterol	3,3±0,12	3,3±0,11	1,2±0,09	1,2±0,04
Δ7-Estigmastenol	7,8±0,69	7,5±0,48	29,7±0,42	30,0±0,28
Δ7-Avenasterol	4,0±0,34	3,9±0,35	4,6±0,18	4,4±0,14
<b>Concentración total (mg/kg)</b>	3387±145	3285±56	4056±53	3818±232

Los resultados se expresan como valores medios ± desviación estándar (n=3 para los valores de los aceites iniciales de ambas muestras y n=4 para los refinados).

#### 4.3.2.3 Tocoferoles

De forma similar a lo encontrado para el contenido total de fitoesteroles, tampoco se encontraron pérdidas significativas en el contenido de tocoferoles como consecuencia del proceso de refinación física (Tabla 36). Este hecho nuevamente indica que las condiciones utilizadas en la decoloración y desodorización fueron condiciones óptimas. Las pérdidas encontradas en otros estudios por refinación física han sido del 20-25%, localizadas básicamente en la etapa de desodorización (Alpaslan *et al.*, 2001; Tasan & Demirci, 2005; Kreps *et al.*, 2014).

**Tabla 36-** Influencia de la refinación física en el contenido de tocoferol (mg/kg) en aceites de prensa de 2015.

	GF-2	GF-7
<b>Crudos</b>	881	722
<b>Refinados</b>	861	702

Los resultados se expresaron como valores medios de 2 determinaciones. El coeficiente de variación fue de un 3%.

### 4.3.3 Refinación Química

#### 4.3.3.1 Ácidos grasos

Del mismo modo que en el caso de la refinación física, no se observaron cambios sustanciales en la composición de ácidos grasos entre los aceites refinados por refinación química y los crudos, ni en los aceites de prensa (Tabla 37), ni en los de disolvente (Tabla 38). Sólo se observaron ligeras diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), en mayor medida para los aceites extraídos por prensa y particularmente en los ácidos grasos mayoritarios, C18:1 y C18:2.

**Tabla 37.-** Influencia del proceso de refinación química en la composición de ácidos grasos (%) de los aceites de prensa de 2017.

	Control		GF-2		GF-7	
	Inicial	Refinado	Inicial	Refinado	Inicial	Refinado
<b>Ácidos grasos</b>						
C16:0	7,0±0,01	7,0±0,01	6,5±0,01a	6,6±0,00b	7,1±0,01a	7,2±0,01b
C16:1	0,2±0,00	0,2±0,00	nd	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00
C18:0	3,6±0,01b	3,5±0,02a	3,0±0,01b	2,9±0,01a	4,1±0,03	4,1±0,01
C18:1	30,0±0,02a	30,3±0,06b	30,0±0,08a	30,3±0,03b	23,8±0,02a	24,4±0,02b
C18:2	57,9±0,05b	57,7±0,09a	59,5±0,09b	59,1±0,05a	63,6±0,02b	62,8±0,02a
C20:0	0,3±0,00	0,3±0,01	0,3±0,04b	0,2±0,00a	0,3±0,00	0,3±0,00
C18:3	0,1±0,00	0,1±0,01	nd	0,1±0,01	0,1±0,00	0,1±0,01
C20:1	0,2±0,00a	0,1±0,01b	0,1±0,02	0,2±0,00	0,2±0,00	0,2±0,01
C22:0	0,6±0,00	0,6±0,01	0,4±0,05b	0,5±0,01a	0,6±0,01	0,6±0,01
C24:0	0,3±0,00	0,3±0,01	0,1±0,02	0,1±0,02	0,3±0,00	0,3±0,01

Los resultados se expresan como valores medios  $\pm$  desviación estándar (n=4 para los valores de los aceites iniciales y n=3 para los aceites refinados). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre extractos de una misma muestra de semilla ( $p < 0,05$ ), según el test de la *t* de *student*.

**Tabla 38.-** Influencia del proceso de refinación química en la composición de ácidos grasos (%) de los aceites de disolvente de 2017.

	Control		GF-2		GF-7	
	Inicial	Refinado	Inicial	Refinado	Inicial	Refinado
<b>Ácidos grasos</b>						
C16:0	7,3±0,0b	7,2±0,01a	6,8±0,03	6,7±0,03	7,4±0,00	7,4±0,04
C16:1	0,2±0,00	0,2±0,01	nd	0,1±0,00	0,1±0,00	0,1±0,00
C18:0	3,6±0,01b	3,5±0,01a	3,2±0,01	3,1±0,04	4,1±0,01	4,0±0,10
C18:1	29,0±0,03a	29,3±0,01b	29,6±0,04b	27,9±0,07a	23,6±0,02a	24,4±0,20b
C18:2	58,5±0,06	58,5±0,01	59,3±0,07	59,3±0,09	63,3±0,02	62,7±0,38
C20:0	0,3±0,00	0,3±0,00	0,2±0,00	0,2±0,00	0,3±0,00	0,3±0,01
C18:3	0,1±0,00	0,1±0,01	nd	0,1±0,01	0,1±0,00	0,1±0,00
C20:1	0,2±0,00	0,2±0,00	0,2±0,00	0,2±0,00	0,2±0,00	0,2±0,01
C22:0	0,6±0,01b	0,5±0,01a	0,5±0,01	0,5±0,01	0,6±0,00	0,6±0,02
C24:0	0,3±0,00	0,3±0,00	0,2±0,00	0,2±0,01	0,3±0,00	0,3±0,01

Los resultados se expresan como valores medios  $\pm$  desviación estándar (n=4 para los valores de los aceites iniciales y n=3 para los aceites refinados). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre extractos de una misma muestra de semilla ( $p < 0,05$ ), según el test de la *t* de *student*.

#### 4.3.3.2 Fitoesteroles

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Aguirre, 2012), se ha evaluado la influencia de las distintas etapas del proceso de refinación sobre el contenido en fitoesteroles y se han establecido las condiciones óptimas de refinación para minimizar las pérdidas. Por tanto, en este trabajo sólo se compararon los aceites crudos con los obtenidos en la última etapa de refinación.

Como era de esperar, se observaron importantes pérdidas en el contenido total de fitoesteroles tras el proceso de refinación química (Tablas 39-40). Las pérdidas encontradas en los aceites de prensa oscilaron entre 13 y 32%, mientras que en los aceites de disolvente oscilaron entre el 19 y 31%. Por tanto, los aceites de prensa y disolvente presentaron el mismo comportamiento o respuesta a las condiciones del proceso de refinación química.

Las pérdidas de fitoesteroles fueron coherentes con estudios llevados a cabo por otros autores. Verleyen *et al.* (2002b) y Verhé *et al.* (2006) encontraron pérdidas de hasta un 30%, localizadas principalmente en la etapa de neutralización. Las pérdidas de fitoesteroles han sido atribuidas a la inclusión de estos componentes en los jabones producidos, desempeñando un papel importante la concentración de álcali y la temperatura de neutralización (Ruiz-Méndez *et al.*, 2011).

No se han encontrado referencias sobre el impacto de la etapa de decoloración en los fitoesteroles totales de aceites de girasol, aunque sí en otros aceites vegetales, en los que el contenido total de fitoesteroles disminuyó significativamente. En este sentido, se han encontrado pérdidas de 9% en aceite de semilla de algodón (El-Mallah *et al.*, 2011), 1,3% en maíz, 8% en soja y 18,5% en colza (Ferrari *et al.*, 1996).

Con respecto a la composición de fitoesteroles, sólo se encontraron ligeras diferencias, pero significativas ( $p < 0,05$ ), entre los aceites crudos y los refinados, como consecuencia del proceso de refinación química.

**Tabla 39.-** Influencia del proceso de refinación química en la composición y concentración total de fitoesteroles de los aceites de prensa de 2017.

	Control		GF-2		GF-7	
	Inicial	Refinado	Inicial	Refinado	Inicial	Refinado
<b>Composición (%)</b>						
Campesterol	6,2±0,06	6,1±0,27	28,2±0,1b	26,5±0,39a	6,2±0,06a	6,5±0,01b
Estigmasterol	7,8±0,08b	7,1±0,33a	8,9±0,29b	7,7±0,19a	9,4±0,19	9,4±0,17
β-Sitosterol	61,2±0,44	62,6±1,17	47,5±0,07b	46,3±0,74a	46,6±1,1a	48,8±0,16b
Δ5-Avenasterol	1,6±0,04	nd	3,7±0,07b	2,6±0,11a	0,9±0,03	nd
Δ7-Estigmastenol	18,8±0,51	20,3±1,03	6,7±0,18a	12,6±1,24b	32,5±1,58	30,9±0,33
Δ7-Avenasterol	4,5±0,1b	3,9±0,19a	4,9±0,12b	4,2±0,05a	4,3±0,28	4,5±0,11
<b>Total (mg/kg)</b>	4476±136b	3897±225a	5225±203b	3533±63a	5284±200b	4547±298a

Los resultados se expresan como valores medios ± desviación estándar (n=4 para los valores de los aceites iniciales y n=3 para los refinados). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre extractos de una misma muestra de semilla ( $p<0,05$ ), según el test de la *t* de student..

**Tabla 40.-** Influencia de la refinación química en la composición y concentración total de fitoesteroles de los aceites de disolvente de 2017.

	Control		GF-2		GF-7	
	Inicial	Refinado	Inicial	Refinado	Inicial	Refinado
<b>Composición (%)</b>						
Campesterol	7,3±0,15	7,2±0,25	23,4±0,19	23,2±0,15	8,3±0,04	8,5±0,19
Estigmasterol	11,4±0,14b	10,7±0,15a	11,0±0,11b	10,2±0,17a	12,6±0,25b	11,2±0,08a
β-Sitosterol	57,9±0,2a	58,9±0,38b	50,9±0,35a	52,7±0,58b	48,0±0,09	48,1±0,26
Δ5-Avenasterol	1,7±0,04	nd	3,3±0,03b	2,5±0,13a	1,5±0,05b	1,2±0,03a
Δ7-Estigmastenol	17,3±0,46a	18,8±0,22b	7,7±0,64	7,6±0,48	24,8±0,48a	26,4±0,09b
Δ7-Avenasterol	4,4±0,19	4,3±0,27	3,6±0,05a	3,9±0,18b	4,6±0,22	4,7±0,14
<b>Total (mg/kg)</b>	7272±343b	5858±310a	6678±387b	4602±238a	9249±669b	6610±458a

Los resultados se expresan como valores medios ± desviación estándar (n=4 para los valores de los aceites iniciales y n=3 para los refinados). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre extractos de una misma muestra de semilla ( $p < 0,05$ ), según el test de la *t* de *student*.

#### 4.3.3.3 Tocoferoles

El contenido de tocoferoles también disminuyó con la refinación química, aunque en proporciones inferiores a los fitoesteroles. Las pérdidas encontradas estuvieron entre el 5 y 10% del contenido inicial de tocoferoles (Tabla 41). Estos resultados están de acuerdo con estudios previos, donde se registraron pérdidas comprendidas entre el 5 y 15% aproximadamente (Alpaslan *et al.*, 2001; Tasan & Demirci, 2005; Talal *et al.*, 2013; Ergönül & Köseoğlu, 2014; Ayerdi Gotor & Rhazi, 2016). Aunque el contenido total de tocoferoles disminuye gradualmente durante todo el proceso, es conocido que la etapa de mayor influencia es la desodorización (Ayerdi Gotor & Rhazi, 2016).

**Tabla 41-** Influencia de la refinación química en el contenido de tocoferol (mg/kg) en los aceites de 2017.

	Control		GF-2		GF-7	
	Prensa	Disolvente	Prensa	Disolvente	Prensa	Disolvente
<b>Crudos</b>	515	517	881	912	722	784
<b>Refinados</b>	489	480	810	871	679	713

Los resultados se expresaron como valores medios de 2 determinaciones. El coeficiente de variación fue de un 3%.

#### 4.3.3.4 Volátiles

Se han encontrado escasos estudios sobre el perfil de volátiles en aceites refinados de girasol. Por ello se consideró pertinente ampliar los estudios de componentes volátiles también en los aceites refinados y examinar la influencia de las diferentes etapas del proceso de refinación.

En las Tablas 42-43 se muestran los resultados obtenidos para los aceites de prensa y disolvente de 2017. Como se puede observar en la etapa de neutralización se encontraron notables pérdidas de componentes, de 33-66% en los aceites de prensa y de

43-75% en los aceites de disolvente. El  $\alpha$ -Pino, compuesto mayoritario y diferenciador de la semilla de girasol, disminuyó entre 32 y 59% (Bendini *et al.*, 2011).

**Tabla 42.-** Contenido de compuestos volátiles ( $\mu\text{g/g}$ ) encontrados en los aceites de prensa (cosecha 2017) durante las etapas de refinación.

	CONTROL				GF-2				GF-7			
	INICIAL	NEUTRO.	DECOL.	DESOD.	INICIAL	NEUTRO.	DECOL.	DESOD.	INICIAL	NEUTRO.	DECOL.	DESOD.
Pentanal	0,2	0,1	0,1	nd	1,0	0,4	nd	nd	0,2	0,1	nd	nd
$\alpha$ -Pinenol	9,9	6,7	0,9	0,0	77,9	31,8	26,1	0,0	12,9	6,2	2,5	0,0
Canfeno	0,2	0,1	1,7	nd	1,7	1,2	10,1	nd	0,1	nd	0,6	nd
Hexanal	0,5	1,0	83,4	0,0	0,2	1,1	230,4	0,0	0,6	0,3	14,5	nd
1- $\beta$ -Pinenol	0,3	0,2	nd	nd	2,4	1,1	nd	nd	0,4	0,1	nd	nd
3-Pentanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sabineno	0,3	0,1	nd	nd	0,6	0,2	nd	nd	0,1	0,1	nd	nd
Limoneno	0,2	0,2	nd	0,0	1,7	0,8	nd	0,0	0,3	nd	0,1	nd
3-Octanona	0,4	nd	nd	nd	4,0	1,2	nd	nd	0,5	nd	nd	nd
<i>p</i> -Cimeno	0,0	0,1	0,2	nd	0,2	0,1	1,8	nd	0,0	nd	0,0	nd
1-Hexanol	0,9	1,5	2,6	nd	0,2	0,1	3,2	nd	0,8	0,4	0,5	nd
Ác. acético	0,7	0,2	1,3	0,0	0,6	0,5	3,4	0,1	0,6	0,4	1,3	0,1
Pentadecano	0,0	0,0	0,0	nd	0,2	0,1	0,5	nd	0,0	nd	nd	nd
Bornil acetato	0,0	0,0	0,0	nd	0,4	0,2	0,2	nd	0,0	nd	nd	nd
Calareno	0,1	nd	0,1	nd	0,1	0,0	1,9	0,0	0,1	nd	nd	nd
Hexadecano	0,0	0,0	nd	nd	0,4	0,0	nd	nd	0,0	nd	nd	nd
$\gamma$ -Butirolactona	0,0	0,1	0,1	nd	0,2	0,2	1,1	nd	0,1	0,1	0,0	nd
Ác. pentanoico	0,0	nd	nd	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1-Heptadeceno	nd	nd	nd	nd	0,1	0,0	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Ác. Hexanoico	0,1	0,1	0,9	nd	0,3	0,8	3,6	0,1	0,3	0,5	0,5	0,1
<i>cis</i> -2-Nonadecano	nd	nd	nd	nd	0,0	0,0	0,0	nd	nd	nd	nd	nd
Octadecano	0,0	0,1	0,2	nd	0,0	0,0	0,1	nd	0,0	nd	0,0	nd
1-Octadeceno	0,0	0,1	0,1	nd	nd	nd	nd	nd	0,0	nd	nd	nd
Ác. heptanoico	0,0	nd	0,1	0,0	0,1	0,1	0,4	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
Ác. octanoico	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,7	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
Ác. nonanoico	0,1	0,1	0,3	0,0	0,1	0,1	1,3	0,0	0,1	0,2	0,4	0,0
<b>Total (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>13,8</b>	<b>10,6</b>	<b>92,1</b>	<b>0,1</b>	<b>92,6</b>	<b>40,3</b>	<b>285,0</b>	<b>0,3</b>	<b>17,4</b>	<b>8,6</b>	<b>20,8</b>	<b>0,2</b>

Coefficiente de variación del método <6%. NEUTRO., neutralización, DECOL., decoloración, DESOD., desodorización. nd, no detectado.

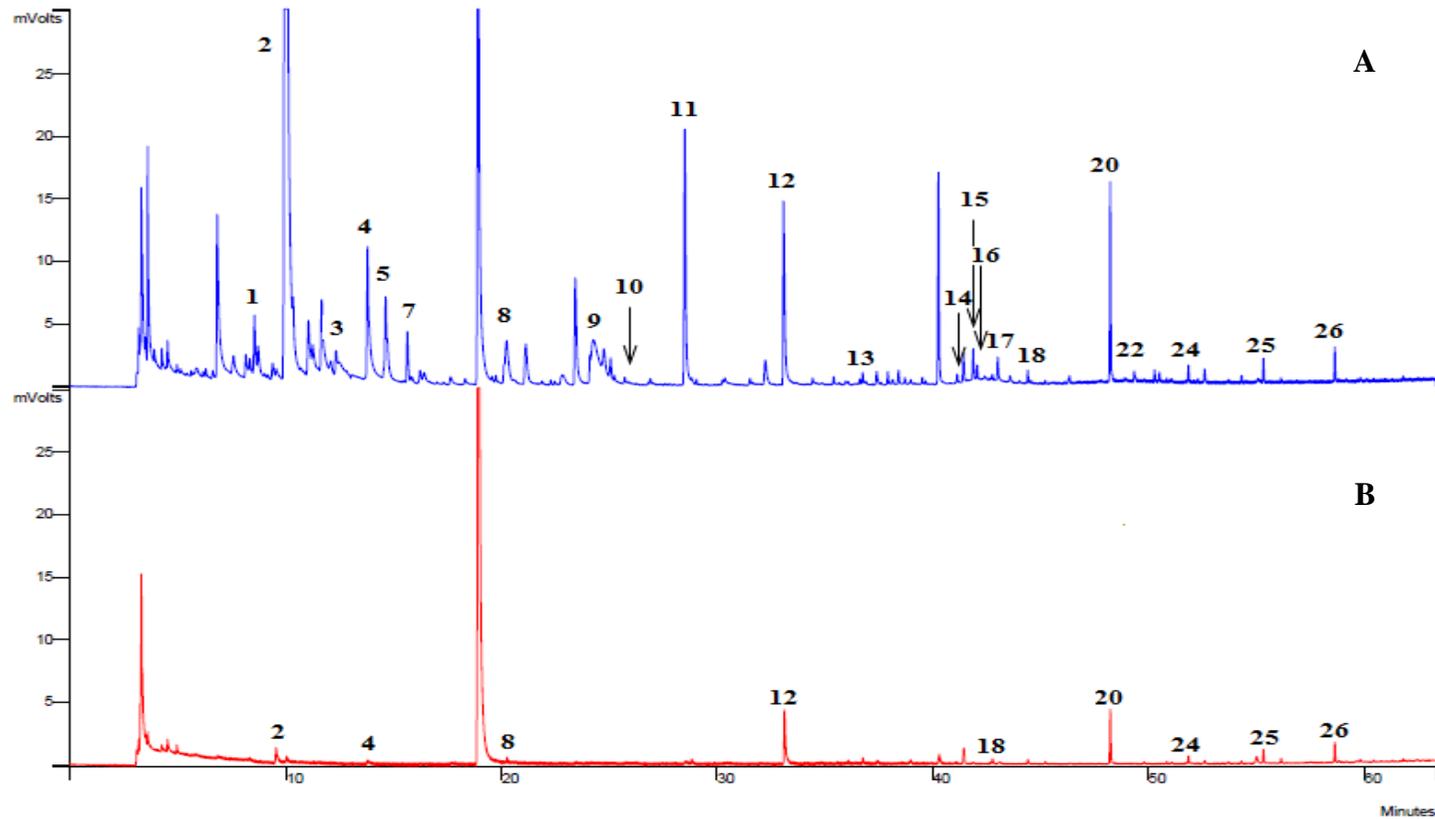
**Tabla 43.-** Contenido de compuestos volátiles ( $\mu\text{g/g}$ ) encontrados en los aceites de disolvente (cosecha 2017) durante las etapas de refinación.

	CONTROL				GF-2				GF-7		
	INICIAL	NEUTRO.	DECOL.	DESOD.	INICIAL	NEUTRO.	DECOL.	DESOD.	INICIAL	NEUTRO.	DESOD.
Pentanal	0,2	0,1	nd	nd	0,4	0,2	nd	nd	0,3	0,1	nd
$\alpha$ -Pinoeno	9,3	4,4	0,6	0,0	29,3	16,4	3,5	0,0	23,0	10,5	nd
Canfeno	0,2	0,1	1,3	nd	0,7	0,7	4,9	nd	0,2	0,3	nd
Hexanal	0,9	0,5	196,1	0,0	1,1	1,1	156,4	0,0	0,9	1,3	0,0
1- $\beta$ -Pinoeno	0,4	0,1	nd	nd	1,3	0,7	nd	nd	0,8	0,3	nd
3-Pentanol	0,1	nd	nd	nd	0,1	nd	nd	nd	0,2	0,0	nd
Sabineno	0,3	0,0	nd	nd	0,5	0,2	nd	nd	0,3	0,1	nd
Limoneno	0,2	0,1	nd	0,0	0,6	0,4	nd	nd	0,4	0,2	nd
3-Octanona	0,7	nd	nd	nd	0,5	0,8	nd	nd	0,9	nd	nd
<i>p</i> -Cimeno	0,1	0,0	0,1	nd	0,2	0,1	1,4	nd	0,1	0,1	nd
1-Hexanol	7,0	0,3	2,4	nd	3,1	0,9	3,1	nd	8,0	1,3	nd
Ác. acético	1,0	0,1	1,2	0,0	0,5	0,2	2,3	0,0	1,2	0,4	0,1
Pentadecano	0,1	0,0	nd	nd	0,2	0,1	0,2	nd	0,1	0,0	nd
Bornil acetato	0,1	0,0	nd	nd	0,5	0,3	0,1	nd	0,2	0,1	nd
Calareno	0,6	nd	nd	nd	0,3	nd	nd	nd	0,5	nd	nd
Hexadecano	0,3	nd	nd	nd	0,7	0,3	nd	nd	0,4	0,1	nd
$\gamma$ -Butirolactona	0,6	0,0	nd	nd	0,5	0,3	0,6	nd	0,6	0,1	nd
Ác. pentanoico	0,3	0,0	nd	nd	0,2	0,0	0,1	nd	0,5	0,0	nd
1-Heptadeceno	nd	nd	nd	nd	0,0	0,0	0,0	nd	0,0	nd	nd
Ác. Hexanoico	1,8	0,1	2,2	0,0	1,0	0,8	2,2	0,0	2,5	0,3	0,0
<i>cis</i> -2-Nonadecano	nd	nd	nd	nd	0,0	nd	nd	nd	0,0	nd	nd
Octadecano	0,4	0,0	nd	nd	0,1	0,0	0,1	nd	0,2	0,1	nd
1-Octadeceno	0,4	0,0	nd	nd	0,1	0,1	0,2	nd	0,5	0,1	nd
Ác. heptanoico	0,1	0,0	0,1	nd	0,1	0,1	0,3	0,0	0,1	0,1	0,0
Ác. octanoico	0,2	0,0	0,3	0,0	0,1	0,1	0,7	0,0	0,2	0,1	0,0
Ác. nonanoico	0,2	0,1	0,7	0,0	0,1	0,1	0,8	0,0	0,2	0,1	0,1
<b>Total (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	25,3	6,2	205,1	0,1	41,9	24,0	176,5	0,2	42,3	15,5	0,2

Coefficiente de variación del método <6%. NEUTRO., neutralización, DECOL., decoloración, DESOD., desodorización. nd, no detectado.

En la etapa de decoloración aumentó drásticamente el contenido total de volátiles debido a la formación de hexanal, derivado de la descomposición de compuestos de oxidación lipídica (Keszler *et al.*, 1998).

Finalmente, como era de esperar, el contenido total de componentes volátiles disminuyó prácticamente en su totalidad en la etapa de desodorización, lo que demuestra claramente que las condiciones aplicadas fueron apropiadas. En la Figura 17 se presentan cromatogramas representativos de los cambios encontrados tras el proceso de refinación, donde se puede apreciar la ausencia de compuestos volátiles de oxidación lipídica (Hexanal).



**Figura 17.-** Influencia de la refinación en el perfil de compuestos volátiles. A, aceite virgen. B, aceite refinado. Para la asignación de picos ver Tabla 29.

## **5 CONCLUSIONES**

---



1.- Se ha desarrollado y validado un método analítico exacto y preciso para determinar de forma rápida la composición de ácidos grasos y fitoesteroles en aceites de semillas crudos y refinados. Las principales ventajas del método son:

- i. Los procedimientos de preparación de muestra de las dos determinaciones se realizan simultáneamente mediante metilación del aceite y separación por extracción en fase sólida de dos fracciones formadas, respectivamente, por los ésteres metílicos de ácidos grasos y los fitoesteroles.
- ii. Ambas fracciones se analizan mediante cromatografía gaseosa y detector de ionización de llama de acuerdo con los métodos estándar.
- iii. El método permite reducir la cantidad de muestra, disminuir el consumo de disolventes y acortar considerablemente el tiempo total de análisis.

2.- A partir de tres variedades de semillas con composición modificada de fitoesteroles, ricas en esteroides totales, en Campesterol ó  $\Delta 7$ -Estigmastenol, se han obtenido aceites de prensa con composiciones de ácidos grasos similares a las de los aceites extraídos posteriormente con disolvente y características de aceites de girasol alto linoleico.

3.- Los contenidos totales de fitoesteroides hallados en los aceites de prensa fueron elevados, similares a los encontrados en la mezcla prensa/disolvente, aunque inferiores a los de disolvente. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de tocoferoles.

4.- El análisis de componentes volátiles mostró diferencias entre las tres variedades de semillas estudiadas. Concretamente, se encontraron diferencias en las cantidades de  $\alpha$ -Pino, Canfeno, Sabineno y Limoneno. Por otra parte, el proceso de extracción no modificó el contenido de estos compuestos. Sin embargo, los niveles de componentes volátiles de oxidación lipídica hallados en los aceites de prensa fueron significativamente más bajos que los de disolvente.

5.- Los resultados obtenidos de dos cosechas distintas han mostrado claramente diferencias sustanciales en la composición de ácidos grasos, en la cantidad total de fitoesteroides y también en el contenido total de volátiles de los aceites, no así en la

composición de fitoesteroles, ni tampoco en los contenidos de tocoferoles. Los aceites de la cosecha 2017 presentaron un cociente C18:1/C18:2 más elevado que los aceites de 2015, cantidades totales de fitoesteroles notablemente más altas, así como también de compuestos volátiles.

6.- Los aceites de prensa presentaron una acidez baja, inferior o igual a 1% (sobre oleico). Sin embargo, los niveles de elementos contaminantes, Fe, Cu, Pb y As, fueron próximos o superiores al límite establecido en el *Codex Alimentarius* para *aceites vírgenes de girasol*. Por tanto, para reducir los niveles de estos contaminantes los aceites obtenidos deben ser refinados.

7.- Debido a sus bajos contenidos en fosfolípidos, determinados de forma indirecta a partir de los niveles de fósforo, los aceites de prensa de 2015 pudieron ser refinados físicamente, aplicando sólo decoloración y desodorización. Sin embargo, junto con los extraídos con disolvente, los aceites de prensa de 2017 tuvieron que ser refinados mediante refinación química, constituida por desgomado, neutralización, decoloración y desodorización.

8.- El proceso de refinación física no modificó la composición de ácidos grasos de los aceites, ni tampoco el contenido total de fitoesteroles o de tocoferoles.

9.- Los contenidos totales de fitoesteroles y de tocoferoles disminuyeron con la refinación química, con pérdidas de hasta aproximadamente un 30% para los primeros y de hasta el 15% para los segundos.

10.- El análisis de componentes volátiles mostró que la etapa de decoloración tuvo una gran influencia en la oxidación del aceite, dando lugar a un aumento en el contenido total de volátiles debido a la formación de hexanal, derivado de la descomposición de compuestos de oxidación lipídica. Este compuesto debe ser eliminado completamente en la etapa de desodorización, así como sus posibles precursores, para evitar el desarrollo de la rancidez durante el almacenamiento del aceite refinado.

## **6 BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abedi, E., Sahari, M. A., Barzegar, M., & Azizi, M. H. (2016). Designing of high voltage electric field for soybean and sunflower oil bleaching. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 173-180.
- Abidi, S. L. (2001). Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 935(1-2), 173-201.
- Abu Mweis, S. S., Marinangeli, C. P., Frohlich, J., & Jones, P. J. (2014). Implementing phytosterols into medical practice as a cholesterol-lowering strategy: overview of efficacy, effectiveness, and safety. *Canadian Journal of Cardiology*, 30(10), 1225-1232.
- Aguirre, M. R. (2012). *Evaluación de fitoesteroles en aceites de semillas de girasol modificadas genéticamente* (Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla).
- Aguirre, M. R., Ruiz-Méndez, M. V., Velasco, L., & Dobarganes, M. C. (2012). Free sterols and steryl glycosides in sunflower seeds with high phytosterol contents. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(10), 1212-1216.
- Aguirre, M. R., Velasco, J., & Ruiz-Méndez, M. V. (2014). Characterization of sunflower oils obtained separately by pressing and subsequent solvent extraction from a new line of seeds rich in phytosterols and conventional seeds. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 21(6), D605.
- Akterian, S. (2009). Modelling and evaluating the batch deodorization of sunflower oil. *Journal of Food Engineering*, 91(1), 29-33.
- Almonor, G. O., Fenner, G. P., & Wilson, R. F. (1998). Temperature effects on tocopherol composition in soybeans with genetically improved oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(5), 591-596.
- Alpaslan, M., Tepe, S., & Simsek, O. (2001). Effect of refining processes on the total and individual tocopherol content in sunflower oil. *International Journal of Food Science & Technology*, 36(7), 737-739.
- Amelotti, G. (1987). Effects of the interesterification for physical refining of some olive oils (I). *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 64, 223-226.
- Anastasi, U., Santonoceto, C., Giuffrè, A. M., Sortino, O., Gresta, F., & Abbate, V. (2010). Yield performance and grain lipid composition of standard and oleic sunflower as affected by water supply. *Field Crops Research*, 119(1), 145-153.
- Ansari, R., Kazi, T. G., Jamali, M. K., Arain, M. B., Wagan, M. D., Jalbani, N., ... & Shah, A. Q. (2009). Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. *Food Chemistry*, 115(1), 318-323.
- Antonopoulos, K., Valet, N., Spiratos, D., & Siragakis, G. (2006). Olive oil and pomace olive oil processing. *Grasas y Aceites*, 57(1), 56-67.

- Anushree, S., André, M., Guillaume, D., & Frédéric, F. (2017). Stearic sunflower oil as a sustainable and healthy alternative to palm oil. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(3), 18.
- Aparicio-Ruiz, R., García-González, D. L., Morales, M. T., Lobo-Prieto, A., & Romero, I. (2018). Comparison of two analytical methods validated for the determination of volatile compounds in virgin olive oil: GC-FID vs GC-MS. *Talanta*, 187, 133-141.
- AOCS (2011). Official Method Ca 6a-40. *En Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 6th Edition, 2nd Printing*; AOCS Press, Champaign, IL.
- Awad, A. B., Roy, R., & Fink, C. S. (2003).  $\beta$ -sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Oncology Reports*, 10(2), 497-500.
- Ayerdi Gotor, A. A., Berger, M., Labalette, F., Centis, S., Daydé, J., & Calmon, A. (2015). Variability and relationships between fatty acids, tocopherols and phytosterols content in sunflower cultivars (*Helianthus annuus*) from a three years multi-local study. *International Journal of Experimental Botany*, 84, 14-25.
- Ayerdi Gotor, A., Berger, M., Labalette, F., Centis, S., Daydé, J., & Calmon, A. (2006). Variabilité des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule. Partie I-Tocophérols. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 13(2-3), 206-212.
- Ayerdi Gotor, A., Berger, M., Labalette, F., Centis, S., Daydé, J., & Calmon, A. (2016). Oleic conversion effect on the tocopherol and phytosterol contents in sunflower oil. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 83(2), 319-324.
- Balchen, S., Gani, R., & Adler-Nissen, J. (1999). Deodorization principles-stripping efficiency in cross-flow and counter-current operations. *Inform*, 10(3), 245-255.
- Barbagallo, C. M., Cefalù, A. B., Noto, D., & Averna, M. R. (2015). Role of nutraceuticals in hypolipidemic therapy. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2, 22.
- Basti, M., Bastl, L., Jovanovi, J. J., & Spitteller, G. (1978). Hydrocarbons and other weakly polar unsaponifiables in some vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55(12), 886-891.
- Bäumler, E. R., Carrín, M. E., & Carelli, A. A. (2016). Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 178, 190-197.
- Behrman, E. J., & Gopalan, V. (2005). Cholesterol and plants. *Journal of Chemical Education*, 82(12), 1791.

- Bendini, A., Barbieri, S., Moradi, L., Palagano, R., Valli, E., & Toschi, T. G. (2014). Quality evaluation of sunflower and hazelnut cold-pressed oils by a sensory approach. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 91(2), 103-115.
- Bendini, A., Barbieri, S., Valli, E., Buchecker, K., Canavari, M., & Toschi, T. G. (2011). Quality evaluation of cold pressed sunflower oils by sensory and chemical analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(11), 1375-1384.
- Biedermann, M., Grob, K., Mariani, C., & Schmidt, J. P. (1996). Detection of desterolized sunflower oil in olive oil through isomerized  $\Delta^7$ -sterols. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202(3), 199-204.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Blogdon, D. 2000. Commercial production of phytosterols. *Inform*, 11, 47.
- Bocci, F., & Frega, N. (1996). Analysis of the volatile fraction from sunflower oil extracted under pressure. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(6), 713-716.
- Bockisch, M. (1998). Oil purification. *Fats and Oils Handbook*, 613-626.
- Bogdanor, J. M., & Price, A. L. (1994). Novel synthetic silica adsorbents for refining of edibleoils. *Oil-Mill-Gazetteer*, 99, 32-34.
- Bondioli, P., Cortesi, N., & Mariani, C. (2008). Identification and quantification of steryl glucosides in biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(2), 120-126.
- Botnick, I., Xue, W., Bar, E., Ibdah, M., Schwartz, A., Joel, D. M., ... & Lewinsohn, E. (2012). Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. *Molecules*, 17(9), 10159-10177.
- Brevedan, M. I. V., Carelli, A. A., & Crapiste, G. H. (2000). Changes in composition and quality of sunflower oils during extraction and degumming. *Grasas y Aceites*, 51(6), 417-423.
- Britz, S. J., & Kremer, D. F. (2002). Warm temperatures or drought during seed maturation increase free  $\alpha$ -tocopherol in seeds of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6058-6063.
- Broughton, R., Ruíz-Lopez, N., Hassall, K. L., Martínez-Force, E., Garcés, R., Salas, J. J., & Beaudoin, F. (2018). New insights in the composition of wax and sterol esters in common and mutant sunflower oils revealed by ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 269, 70-79.

- Brufau, G., Canela, M. A., & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28(4), 217-225.
- Carelli, A. A., Ceci, L. N., & Crapiste, G. H. (2002a). Phosphorus-to-phospholipid conversion factors for crude and degummed sunflower oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(12), 1177-1180.
- Carelli, A. A., Frizzera, L. M., Forbito, P. R., & Crapiste, G. H. (2002b). Wax composition of sunflower seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(8), 763-768.
- Carola, C. (1969). Refining plants for olive and olive husk oils. I. Degumming and deacidification with alkalies. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*.
- Carr, R. A. (1997). Oil Seeds Processing. *Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum oils*, 101-120.
- Carretero, A. S., Carrasco-Pancorbo, A., Cortacero, S., Gori, A., Cerretani, L., & Fernández-Gutiérrez, A. (2008). A simplified method for HPLC-MS analysis of sterols in vegetable oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(12), 1142-1149.
- Castro, C. D., & Leite, R. D. C. (2018). Main aspects of sunflower production in Brazil. *Embrapa Soja-Artigo em Periódico Indexado (ALICE)*.
- Cert, A., Lanzón, A., Carelli A. A., & Albi T. (1994). Formation of stigmasta-3,5-diene in vegetable oils. *Food Chemistry*, 49, 287-293.
- Cert, A., & Moreda, W. (2000). Algorithms for the detection of hazelnut oil in olive oil. *Grasas y Aceites*, 51(3), 143-149.
- Chalapud, M. C., Bäumlner, E. R., & Carelli, A. A. (2017). Characterization of waxes and residual oil recovered from sunflower oil winterization waste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(2), 1500608.
- Chen, S. S., Chen, C. M., Cheng, C. C., & Chou, S. S. (1999). Determination of copper in edible oils by direct graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 7(3).
- Cheng, M. H., Rosentrater, K. A., Sekhon, J., Wang, T., Jung, S., & Johnson, L. A. (2019). Economic Feasibility of Soybean Oil Production by Enzyme-Assisted Aqueous Extraction Processing. *Food and Bioprocess Technology*, 12(3), 539-550.
- Cherif, A. O. (2012). Phytochemicals components as bioactive foods. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*, 113-124.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186.

- Cioni, P. L., Flamini, G., Caponi, C., Ceccarini, L., & Morelli, I. (2005). Analysis of volatile fraction, fixed oil and tegumental waxes of the seeds of two different cultivars of *Helianthus annuus*. *Food Chemistry*, *90*(4), 713-717.
- CODEX ALIMENTARIUS. 1995. Norma General del CODEX para los Contaminantes y las Toxinas presentes en los Alimentos y Pisos. CODEX STAN 193-1995, pp 1-48.
- CODEX ALIMENTARIUS. 2015. Norma para Aceites Vegetales Especificados. CODEX STAN 210-1999, enmienda 2015, pp 1-14.
- Corrêa, R. C., Peralta, R. M., Bracht, A., & Ferreira, I. C. (2017). The emerging use of mycosterols in food industry along with the current trend of extended use of bioactive phytosterols. *Trends in Food Science & Technology*, *67*, 19-35.
- Cunha, S. S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. (2006). Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1128*(1-2), 220-227.
- de Aquino, D. S., Fanhani, A., Stevanato, N., & da Silva, C. (2019). Sunflower oil from enzymatic aqueous extraction process: Maximization of free oil yield and oil characterization. *Journal of Food Process Engineering*, e13169.
- de Figueiredo, A. K., Fernández, M. B., & Nolasco, S. M. (2019). Extraction of high stearic high oleic sunflower oil (HSHO): Effect of dehulling and hydrothermal pretreatment. *Journal of Food Process Engineering*, *240*, 49-55.
- De Greyt, W. F. J. (2013). Edible oil refining: Current and future technologies. *Edible Oil Processing*, 127-151.
- De Greyt, W., & Kellens, M. (2000). Refining practice. *Edible Oil Processing*, 79-128.
- Delgado, R. M., Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (2016). Antagonism between lipid-derived reactive carbonyls and phenolic compounds in the Strecker degradation of amino acids. *Food Chemistry*, *194*, 1143-1148.
- Delgado, R. M., Zamora, R., & Hidalgo, F. J. (2015). Contribution of phenolic compounds to food flavors: Strecker-type degradation of amines and amino acids produced by o- and p-diphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(1), 312-318.
- Denise, J. (1983). *Le raffinage des corps gras*. Westhoek-Editions.
- Dijkstra, A. J., & Van Opstal, M. (1989). The total degumming process. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *66*(7), 1002-1009.

- Doshi, K., Trivedi, Y., Ray, P., & Singh, P. S. (2019). Degumming of crude vegetable oil by membrane separation: Probing structure-performance and stability of PVDF membranes. *Separation Science and Technology*, 54(3), 360-369.
- Dufourc, E. J. (2008). The role of phytosterols in plant adaptation to temperature. *Plant Signaling & Behavior*, 3(2), 133-134.
- Dumont, M. J., & Narine, S. S. (2008). Characterization of soapstock and deodorizer distillates of vegetable oils using gas chromatography. *Lipid Technology*, 20(6), 136-138.
- EFSA (2008). Consumption of food and beverages with added plant sterols in the European Union. *The Efsa J*, 133, 1-21.
- El-Mallah, M. H., El-Shami, S. M., Hassanien, M. M. M., & Abdel-Razek, A. G. (2011). Effect of chemical refining steps on the minor and major components of cottonseed oil. *Agricultural and Biology Journal of North America* 2, 341-349.
- Ergönül, P. G., & Köseoğlu, O. (2014). Changes in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -and  $\delta$ -tocopherol contents of mostly consumed vegetable oils during refining process. *CyTA-Journal of Food*, 12(2), 199-202.
- Etievant, P. X., Azar, M., Pham-Delegue, M. H., & Masson, C. J. (1984). Isolation and identification of volatile constituents of sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(3), 503-509.
- European Commission (2017) Oilseeds and protein crops market situation; Committee for the Common Organisation of Agricultural Markets; Agriculture and Rural Development.
- FAO (2008). Phytosterols, phytosterols and their esters: chemical and technical assessment. [Citado 2012.05.28]. Disponible en: <http://www.fao.org>
- Federación Europea de Industrias Oleícolas (FEDIOL, 2018). Datos recuperados de: <https://www.fediol.eu/data/Stat%20seeds%202018.pdf>
- Ferdosh, S., Haque Akanda, M. J., Ghafoor, K., Ali, M. E., Kamaruzzaman, B. Y., Shaarani, S., & Islam Sarker, M. Z. (2018). Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health: a review. *Separation Science and Technology*, 53(14), 2206-2223.
- Ferguson, J. J., Stojanovski, E., MacDonald-Wicks, L., & Garg, M. L. (2016). Fat type in phytosterol products influence their cholesterol-lowering potential: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Progress in Lipid Research*, 64, 16-29.
- Fernández-Cuesta, Á., Aguirre-González, M. R., Ruiz-Méndez, M. V., & Velasco, L. (2012a). Validation of a method for the analysis of phytosterols in sunflower seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(3), 325-331.

- Fernández-Cuesta, A., Jan, C. C., Fernández-Martínez, J. M., & Velasco, L. (2014b). Variability for seed phytosterols in sunflower germplasm. *Crop Science*, 54(1), 190-197.
- Fernández-Cuesta, A., Nabloussi, A., Fernández-Martínez, J. M., & Velasco, L. (2012b). Tocopherols and phytosterols in sunflower seeds for the human food market. *Grasas y Aceites*, 63(3), 321-327.
- Fernández-Cuesta, A., Velasco, L., & Fernández-Martínez, J. M. (2011). Phytosterols in the seeds of wild sunflower species. *Helia*, 34(55), 31-38.
- Fernández-Cuesta, Á., Velasco, L., & Ruiz-Méndez, M. V. (2014a). Novel safflower oil with high  $\gamma$ -tocopherol content has a high oxidative stability. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(7), 832-836.
- Fernández-Moya, V., Martínez-Force, E., & Garcés, R. (2005). Oils from improved high stearic acid sunflower seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5326-5330.
- Ferrari, R. A., Esteves, W., Mukherjee, K. D., & Schulte, E. (1997). Alteration of sterols and steryl esters in vegetable oils during industrial refining. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4753-4757.
- Ferrari, R. A., Schulte, E., Esteves, W., Brühl, L., & Mukherjee, K. D. (1996). Minor constituents of vegetable oils during industrial processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(5), 587-592.
- Frankel, E. N. (2012). Free radical oxidation. En Frankel EN (ed) *Lipid Oxidation*, 2<sup>nd</sup> edn. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp 15-24.
- Galvin, J. B. (1997). Toxicity data for commercial hexane and hexane isomers.
- Gandul-Rojas, B., Cepero, M. R. L., & Mínguez-Mosquera, M. I. (1999). Chlorophyll and carotenoid patterns in olive fruits, *Olea europaea* cv. Arbequina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2207-2212.
- García-Llatas, G., Mejía E, Cilla A., Alegría A & Lagarda M. J. (2015). Estimation of plant sterol intake in a resident population of the Valencian community (Spain). En *Phytosterols: Food Sources, Functions and health Benefits*. D. Garner (ed) Nova Publishers (New York, USA). Pp 185-205.
- Genovese, A., Caporaso, N., Villani, V., Paduano, A., & Sacchi, R. (2015). Olive oil phenolic compounds affect the release of aroma compounds. *Food Chemistry*, 181, 284-294.
- Gözek, K., Yücel, Ü., İlim, M., Aysal, P., & Tunçbilek, A. Ş. (1999). 14C-dimethoate residues in olive oil during oil processing. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 34(3), 413-429.

- Grob, K., Biedermann, M., Bronz, M., & Schmid, J. P. (1994). Recognition of mild deodorization of edible oils by the loss of volatile components. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 199(3), 191-194
- Grompone, M. A. (2005). Sunflower oil. *Bailey's industrial oil and fat products*.
- Guillen, M. D., & Goicoechea, E. (2008). Formation of oxygenated  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehydes and other toxic compounds in sunflower oil oxidation at room temperature in closed receptacles. *Food Chemistry*, 111(1), 157-164.
- Günç Ergönül, P., & Nergiz, C. (2015). The effect of different filter aid materials and winterization periods on the oxidative stability of sunflower and corn oils. *CyTA-Journal of Food*, 13(2), 174-180.
- Gunstone, F. D. (2005). Vegetable Oils, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Six Volume Set. Ed. Fereidoon Shahidi.
- Gunstone, F. D. (Ed.). (2002). *Vegetable oils in food technology*. Blackwell.
- Gupta, M. K. (1998). NuSun: The future generation of oils. *International news on fats, oils and related materials*, 9(12).
- Gupta, M. K. (2002). Sunflower oil. *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*, 128.
- Gutfinger, T., & Letan, A. (1974). Quantitative changes in some unsaponifiable components of soya bean oil due to refining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(9), 1143-1147.
- Hamama, A. A., Bhardwaj, H. L., & Starner, D. E. (2003). Genotype and growing location effects on phytosterols in canola oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(11), 1121-1126.
- Hamilton, R. J. (1983). chemistry of rancidity in foods. *Rancidity in Foods/edited by JC Allen and RJ Hamilton*.
- Haraldsson, G. (1983). Degumming, dewaxing and refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(2Part1), 251-256.
- Hartmann, M. A. (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science*, 3(5), 170-175.
- Hendriks, H. F. J., Weststrate, J. A., Van Vliet, T., & Meijer, G. W. (1999). Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(4), 319.
- Hendrix, B. (1990). Neutralization I. Theory and practice of conventional caustic (NaOH) refining. *Edible Fats and Oils Processing: basic principles and modern practices. Illinois (USA): American Oil Chemists' Society*, 449.

- Herchi, W., Harrabi, S., Sebei, K., Rochut, S., Boukhchina, S., Pepe, C., & Kallel, H. (2009). Phytosterols accumulation in the seeds of *Linum usitatissimum* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(10), 880-885.
- Hopia, A. I., Piironen, V. I., Koivistoinen, P. E., & Hyvönen, L. E. (1992). Analysis of lipid classes by solid-phase extraction and high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(8), 772-776.
- USDA, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Gráfico tomado de <https://www.usda.gov/>
- Hussin, F., Aroua, M. K., & Daud, W. M. A. W. (2011). Textural characteristics, surface chemistry and activation of bleaching earth: A review. *Chemical Engineering Journal*, 170(1), 90-106.
- Iafelice, G., Verardo, V., Marconi, E., & Caboni, M. F. (2009). Characterization of total, free and esterified phytosterols in tetraploid and hexaploid wheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2267-2273.
- IUPAC (1992) Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7<sup>th</sup> edn. International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell Scientific, Oxford.
- Jahani, M., Alizadeh, M., Pirozifard, M., & Qudsevali, A. (2008). Optimization of enzymatic degumming process for rice bran oil using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1892-1898.
- Jiménez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A. B., & Saura-Calixto, F. (2006). Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3462-3471.
- Jonker, D., Van der Hoek, G. D., Glatz, J. F. C., Homan, C., Posthumus, M. A., & Katan, M. B. (1985). Combined determination of free, esterified and glycosylated plant sterols in foods. *Nutrition Reports International*, 32, 943-952.
- Kamal-Eldin, A., Määtä, K., Toivo, J., Lampi, A. M., & Piironen, V. (1998). Acid-catalyzed isomerization of fucosterol and  $\Delta$  5-avenasterol. *Lipids*, 33(11), 1073-1077.
- Keszler, Á., Héberger, K., & Gude, M. (1998). Identification of volatile compounds in sunflower oil by headspace SPME and ion-trap GC/MS. *Journal of High Resolution Chromatography*, 21(6), 368-370.
- Keszler, Á., Kriska, T., & Németh, A. (2000). Mechanism of volatile compound production during storage of sunflower oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 5981-5985.
- Kochhar, S. P. (1983). Influence of processing on sterols of edible vegetable oils. *Progress in Lipid Research*, 22(3), 161-188.

- Kreps, F., Vrbiková, L., & Schmidt, Š. (2014). Influence of industrial physical refining on tocopherol, chlorophyll and beta-carotene content in sunflower and rapeseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(11), 1572-1582.
- Krist, S., Stuebiger, G., Bail, S., & Unterweger, H. (2006). Detection of adulteration of poppy seed oil with sunflower oil based on volatiles and triacylglycerol composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6385-6389.
- Kumar, S. J., Prasad, S. R., Banerjee, R., Agarwal, D. K., Kulkarni, K. S., & Ramesh, K. V. (2017). Green solvents and technologies for oil extraction from oilseeds. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 9
- Laakso, P. (2005). Analysis of sterols from various food matrices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(6), 402-410.
- Lacoste, F., Dejean, F., Griffon, H., & Rouquette, C. (2009). Quantification of free and esterified sterol glucosides in vegetable oils and biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(8), 822-828.
- Lagarda, M. J., García-Llatas, G., & Farré, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1486-1496.
- Laitinen, K., Gylling, H., Kaipiainen, L., Nissinen, M. J., & Simonen, P. (2017). Cholesterol lowering efficacy of plant stanol ester in a new type of product matrix, a chewable dietary supplement. *Journal of functional foods*, 30, 119-124.
- Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rubio-Senent, F., Gómez-Carretero, A., & Fernández-Bolanos, J. (2011). New hydrothermal treatment of alperujo enhances the content of bioactive minor components in crude pomace olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1115-1123.
- Lamas, D. L., Constenla, D. T., & Raab, D. (2016). Effect of degumming process on physicochemical properties of sunflower oil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 138-143.
- Lamas, D. L., Crapiste, G. H., & Constenla, D. T. (2014). Changes in quality and composition of sunflower oil during enzymatic degumming process. *LWT-Food Science and Technology*, 58(1), 71-76.
- Leeson, P., & Flöter, E. (2002). Solidification behaviour of binary sitosterol esters mixtures. *Food Research International*, 35(10), 983-991.
- Li, T. S., Beveridge, T. H., & Drover, J. C. (2007). Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chemistry*, 101(4), 1633-1639.
- Lin, X., Ma, L., Racette, S. B., Anderson Spearie, C. L., & Ostlund Jr, R. E. (2009). Phytosterol glycosides reduce cholesterol absorption in humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(4), G931-G935.

- Liu, J. J., Gasmalla, M. A. A., Li, P., & Yang, R. (2016). Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 184-193.
- Lu, B., Zhang, Y., Wu, X. & Shi, J. (2007) Separation and determination of diversiform phytosterols in food materials using supercritical carbon dioxide extraction and ultraperformance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 588: 50–63.
- Lutjohann, D. (2004). Sterol autoxidation: from phytosterols to oxyphytosterols. *British Journal of Nutrition*, 91(1), 3-4.
- MacKay, D. S., & Jones, P. J. (2011). Phytosterols in human nutrition: Type, formulation, delivery, and physiological function. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(12), 1427-1432.
- Mag, T. K. (1990). Bleaching-theory and practice. *Edible Fats and Oils Processing: basic principles and modern practices*. American Oil Chemists' Society Press, Champaign, 107-116.
- Mahmood-Fashandi, H., Ghavami, M., Gharachorloo, M., Abbasi, R., & Mousavi Khaneghah, A. (2017). Using of Ultrasonic in Degumming of Soybean and Sunflower Seed Oils: Comparison with the Conventional Degumming. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12799.
- Maki, K. C., Lawless, A. L., Reeves, M. S., Kelley, K. M., Dicklin, M. R., Jenks, B. H., ... & Brooks, J. R. (2013). Lipid effects of a dietary supplement softgel capsule containing plant sterols/stanols in primary hypercholesterolemia. *Nutrition*, 29(1), 96-100.
- Mannarino, M. R., Ministrini, S., & Pirro, M. (2014). Nutraceuticals for the treatment of hypercholesterolemia. *European Journal of Internal Medicine*, 25(7), 592-599.
- Martínez-Force, E., & Garcés, R. (1999). New oilseed varieties with modified fatty acid composition in the oil. *Trends in Agronomy*, 2, 13-21.
- Martini, S., & An, M. C. (2000). Determination of wax concentration in sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(10), 1087-1093.
- Martin-Polvillo, M., Albi, T., & Guinda, A. (1994). Determination of trace elements in edible vegetable oils by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(4), 347-353.
- Mastrobattista, G., & Gabriele, F. (1992). Valutazione di una nuova tecnica di raffinazione su oli di sansa. *Industrie Alimentari*, 31(304), 447-449.
- Matthäus, B., & Spener, F. (2008) What we know and what we should know about virgin oils—a general introduction. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(7), 597-601.

- Mathison, B., & Holstege, D. (2013). A rapid method to determine sterol, erythrodiol, and uvaol concentrations in olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(19), 4506-4513.
- McPherson, T. B., Ostlund, R. E., Goldberg, A. C., Bateman, J. H., Schimmoeller, L., & Spilburg, C. A. (2005). Phytosterol tablets reduce human LDL-cholesterol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(7), 889-896.
- Meister, K. (2002). *Facts About "Functional Foods"*. Am Cncl on Science, Health.
- Mena, C., Cabrera, C., Lorenzo, M. L., & Lopez, M. C. (1996). Cadmium levels in wine, beer and other alcoholic beverages: possible sources of contamination. *Science of the Total Environment*, 181(3), 201-208.
- Miettinen, T. A. (2001). Phytosterols—what plant breeders should focus on. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 895-903.
- Moreau, R. A. (2015). Composition of plant sterols and stanols in supplemented food products. *Journal of AOAC International*, 98(3), 685-690. 809-815.
- Moreau, R. A., Nyström, L., Whitaker, B. D., Winkler-Moser, J. K., Baer, D. J., Gebauer, S. K., & Hicks, K. B. (2018). Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 70, 35-61.
- Moreau, R. A., Powell, M. J., & Singh, V. (2003). Pressurized liquid extraction of polar and nonpolar lipids in corn and oats with hexane, methylene chloride, isopropanol, and ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(11), 1063-1067.
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytosterols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41(6), 457-500.
- Murui, T., & Siew, Y. H. (1997). Effect of refining process on the content of steryl glycosides and alcohols in palm oil. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 46(6), 683-686.
- Naudet, M., & Hautfenne, A. (1985). Standard method for the determination of total sterols in fats and oils (including results of a collaborative study). *Pure and Applied Chemistry*, 57(6), 899-904.
- Naz, S., Sherazi, S. T. H., & Talpur, F. N. (2011). Changes of total tocopherol and tocopherol species during sunflower oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(1), 127-132.
- Nimet, G., Da Silva, E. A., Palú, F., Dariva, C., dos Santos Freitas, L., Neto, A. M., & Cardozo Filho, L. (2011). Extraction of sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil with supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical propane: Experimental and modeling. *Chemical Engineering Journal*, 168(1), 262-268.

- Nolasco, S. M., Aguirrezábal, L. A. N., & Crapiste, G. H. (2004). Tocopherol oil concentration in field-grown sunflower is accounted for by oil weight per seed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(11), 1045-1051.
- Ontanón, I., Culleré, L., Zapata, J., Villanueva, B., Ferreira, V., & Escudero, A. (2013). Application of a new sampling device for determination of volatile compounds released during heating olive and sunflower oil: sensory evaluation of those identified compounds. *European Food Research and Technology*, 236(6), 1031-1040.
- Ortega-García, J., Gámez-Meza, N., Noriega-Rodriguez, J. A., Dennis-Quiñonez, O., García-Galindo, H. S., Angulo-Guerrero, J. O., & Medina-Juárez, L. A. (2006). Refining of high oleic safflower oil: effect on the sterols and tocopherols content. *European Food Research and Technology*, 223(6), 775-779
- Ostlund, R. E. (2002). Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 533-549.
- Ouyang, J. M., Daun, H., Chang, S. S., & HO, C. T. (1980). Formation of carbonyl compounds from *p*-carotene during palm oil deodorization. *Journal of Food Science*, 45(5), 1214-1217.
- Padley F. B., Gunstone F. D. & Harwood J. L. (1994). Occurrence and characteristics of oils and fats, en Gunstone F. D., Harwood J. L., Padley F. B (Eds.) *The Lipid Handbook*. Chapman & Hall, London, pp. 47-223.
- Paquot, C. (2013). *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. Elsevier.
- Paquot, C., & Hautfenne, A. (1987). *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*, 7th edn.: Blackwell, Oxford, 1987 (ISBN 0632-015861).
- Patterson, H. B. W. (1992). *Bleaching and Purifying Fats and Oils. Theory and practice*. American Oil Chemists' Society., Champaign, Illinois, USA, pp 44-46.
- Pehlivan, E., Arslan, G., Gode, F., Altun, T., & Özcan, M. M. (2008). Determination of some inorganic metals in edible vegetable oils by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). *Grasas y Aceites*, 59(3), 239-244.
- Pérez, E. E., Bäumlér, E. R., Crapiste, G. H., & Carelli, A. A. (2019). Effect of Sunflower Collets Moisture on Extraction Yield and Oil Quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(2), 1800234.
- Perretti, G., Finotti, E., Adamuccio, S., Della Sera, R., & Montanari, L. (2004). Composition of organic and conventionally produced sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(12), 1119-1123.

- Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Toivo, J. I., Swank, M. A., & Simpkins, A. H. (2002). Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(2), 123-142.
- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762), 808-811.
- Piironen, V., & Lampi, A. M. (2004). *Occurrence and Levels of Phytosterols in Foods* (pp. 1-32). Marcel Dekker: New York, NY, USA.
- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., & Lampi, A. M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 939-966.
- Pokorny, J., Kalinova, L., & Dysseler, P. (1995). Determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oils: Results of a collaborative study and the standardized method (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 67(10), 1781-1787.
- Premović, T. Đ., Dimić, E. B., Takači, A. A., & Romanić, R. S. (2010). Influence of impurities and hull content in material for pressing on sensory quality cold-pressed sunflower oil. *Acta Periodica Technologica*, 41, 69-76.
- Rai, A., Mohanty, B., & Bhargava, R. (2016). Supercritical extraction of sunflower oil: A central composite design for extraction variables. *Food Chemistry*, 192, 647-659.
- Rass, M., Schein, C., & Matthäus, B. (2008). Virgin sunflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(7), 618-624.
- Read, S. M., & Bacic, T. (2002). Prime time for cellulose. *Science*, 295(5552), 59-60.
- Ribeiro, S. A., Nicacio, A. E., Zanqui, A. B., Biondo, P. B., Abreu-Filho, B. A. D., Visentainer, J. V., ... & Matsushita, M. (2016). Application of enzymes in sunflower oil extraction: antioxidant capacity and lipophilic bioactive composition. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(5), 834-840.
- Roche, J., Alignan, M., Bouniols, A., Cerny, M., Mouloungui, Z., & Merah, O. (2010). Sterol concentration and distribution in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) during seed development. *Food Chemistry*, 119(4), 1451-1456.
- Roche, J., Bouniols, A., Mouloungui, Z., Barranco, T., & Cerny, M. (2006). Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), 287-297.
- Roche, J., Mouloungui, Z., Cerny, M., & Merah, O. (2016). Fatty acid and phytosterol accumulation during seed development in three oilseed species. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(8), 1820-1826.

- Roche, J., Mouloungui, Z., Cerny, M., & Merah, O. (2019). Effect of Sowing Dates on Fatty Acids and Phytosterols Patterns of *Carthamus tinctorius* L. *Applied Sciences*, 9(14), 2839.
- Roman, O., Heyd, B., Broyart, B., Castillo, R., & Maillard, M. N. (2013). Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 52(1), 49-59.
- Rudkowska, I. (2010). Plant sterols and stanols for healthy ageing. *Maturitas*, 66(2), 158-162.
- Ruiz-Méndez, M. V., Aguirre-González, M. R., & Marmesat, S. (2013). Olive oil refining process. En *Handbook of Olive Oil* (pp. 715-738). Springer, Boston, MA.
- Ruiz-Méndez, M., Aguirre-González, M. R., & Dobarganes, M. C. (2011). Influence of neutralization stage conditions on soapstock phytosterol content.
- Ruiz-Méndez M.V., Velasco J. and Márquez-Ruiz G. (2015) "Recovery of Phytosterols from Refining By-Products of Vegetable Oils". En *Phytosterols: Food Sources, Functions and Health Benefits*. Ed. Deanna Garner. Nova Science Publishers, pp.12.
- Sahu, S., Ghosh, M., & Bhattacharyya, D. K. (2018). Isolation of the unsaponifiable matter (squalene, phytosterols, tocopherols,  $\gamma$ -oryzanol and fatty alcohols) from a fatty acid distillate of rice bran oil. *Grasas y Aceites*, 69(3), 262.
- Salas, J. J., Bootello, M. A., & Garcés, R. (2015). Food Uses of Sunflower Oils. In *Sunflower* (pp. 441-464). *American Oil Chemists' Society Press*.
- Sánchez-Muníz, F.J. & Cuesta, C. Sunflower Oil. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Second Edition*; Caballero, B., Ed.; Caballero, B., Ed.; Academic Press: New York, 2003; pp 5672–5680.
- Saraiva, D., da Conceição Castilho, M., do Rosário Martins, M., da Silveira, M. I. N., & Ramos, F. (2011). Evaluation of phytosterols in milk and yogurts used as functional foods in Portugal. *Food Analytical Methods*, 4(1), 28-34.
- Schaller, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research*, 42(3), 163-175.
- Schaller, H. (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 465-476.
- Schrack, K., Mayer, U., Martin, G., Bellini, C., Kuhnt, C., Schmidt, J., & Jürgens, G. (2002). Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 31(1), 61-73.

- Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., & Lampi, A. M. (2008). Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(2), 152-161.
- Sciancalepore, V. (1981). The influence of processing on the content and composition of free and esterified sterols in sunflower seed oil. *Oli Grassi Deriv*, 17, 11-12.
- Seçmeler, Ö., & Güçlü Üstündağ, Ö. (2017). A rapid in-house validated GC-FID method for simultaneous determination of lipophilic bioactives in olive oil: Squalene,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -sitosterol. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(1), 1500420.
- Segers, J. C., & Van der Sande, R. L. K. M. (1990). Degumming—theory and practice. En *World Conference Proc. Edible Fats and Oils Processing: Basic Principles and Modern Practices* (pp. 88-93).
- Shaghaghi, M. A., Abumweis, S. S., & Jones, P. J. (2013). Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols/stanols provided in capsule and tablet formats: results of a systematic review and meta-analysis. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(11), 1494-1503.
- Shanahan, C., & de Lorimier, R. (2013). Smart prevention—health care cost savings resulting from the targeted use of dietary supplements. *Frost & Sullivan*, 1-125.
- Sierksma, A., Weststrate, J. A., & Meijer, G. W. (1999). Spreads enriched with plant sterols, either esterified 4, 4-dimethylsterols or free 4-desmethylsterols, and plasma total-and LDL-cholesterol concentrations. *British Journal of Nutrition*, 82(4), 273-282.
- Sjöberg, P. (1991). Deodorization technology. *Lipid Technol*, 3, 52-57.
- Sorrentino, A. P. (2008). OTC Product: Centrum Cardio. *Journal of the American Pharmacists Association*, 48(4), e103-e104.
- Sujith Kumar, M. S., Mawlong, I., & Singh, D. (2017). Phytosterol recovery from oilseeds: Recent advances. *Journal of Food Process Engineering*, 40(3), e12466.
- Suliman, T. E. M. A., Jiang, J., & Liu, Y. F. (2013). Chemical refining of sunflower oil: effect on oil stability, total tocopherol, free fatty acids and colour. *International Journal of Engineering, Science & Technology*, 5(2), 449-454.
- Tasan, M., & Demirci, M. (2005). Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 251-254.
- Taylor, D. R. (1993). Adsorptive bleaching. In *Proceedings of the World Conference on Oilseed Technology and Utilization* (pp. 311-319). American Oil Chemists' Society Press, Champaign, IL.

- Toivo, J., Piironen, V., Kalo, P., & Varo, P. (1998). Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid-phase extraction in sample preparation. *Chromatographia*, 48(11-12), 745-750.
- Trautwein, E. A., & Demonty, I. (2007). Phytosterols: natural compounds with established and emerging health benefits. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 14(5), 259-266.
- Trautwein, E. A., Duchateau, G. S., Lin, Y., Mel'nikov, S. M., Molhuizen, H. O., & Ntanos, F. Y. (2003). Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(3-4), 171-185.
- Tüzen, M. (2003a). Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 80(1), 119-123.
- Tüzen, M. (2003b). Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, 74(3), 289-297.
- Ubhayasekera, S. J., & Dutta, P. C. (2009). Sterols and oxidized sterols in feed ingredients obtained from chemical and physical refining processes of fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(6), 595-604.
- Uriarte, P. S., Goicoechea, E., & Guillen, M. D. (2011). Volatile components of several virgin and refined oils differing in their botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1871-1884.
- van Duijn, G. (2016). Fate of contaminants during the refining process of vegetable oils and fats: A calculation model. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(3), 353-360.
- Van Hoed, V., Ali, C. B., Slah, M., & Verhé, R. (2010). Quality differences between pre-pressed and solvent extracted rapeseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(11), 1241-1247.
- Van Hoed, V., Depaemelaere, G., Ayala, J. V., Santiwattana, P., Verhé, R., & De Greyt, W. (2006). Influence of chemical refining on the major and minor components of rice brain oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(4), 315-321.
- Van Hoed, V., Zyaykina, N., De Greyt, W., Maes, J., Verhé, R., & Demeestere, K. (2008). Identification and occurrence of steryl glucosides in palm and soy biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(8), 701.
- van Ruth, S. M., Roozen, J. P., Posthumus, M. A., & Jansen, F. J. H. (1999). Volatile composition of sunflower oil-in-water emulsions during initial lipid oxidation: influence of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4365-4369.
- Velasco, L., & Ruiz-Méndez, M. V. (2015). Sunflower Oil Minor Constituents. En *Sunflower* (pp. 297-329). American Oil Chemists' Society Press.

- Velasco, L., Fernández-Martínez, J. M., Garcia-Ruiz, R., & Domínguez, J. (2002). Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids. *The Journal of Agricultural Science*, 139(4), 425-429.
- Velasco, L., Pérez-Vich, B., & Fernández-Martínez, J. M. (2004). Novel variation for the tocopherol profile in a sunflower created by mutagenesis and recombination. *Plant Breeding*, 123(5), 490-492.
- Verhé, R., Verleyen, T., Van Hoed, V., & De Greyt, W. (2006). Influence of refining of vegetable oils on minor components. *Journal of Oil Palm Research*, 4, 168-179.
- Verleyen, T., Forcades, M., Verhé, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., & De Greyt, W. (2002a). Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(2), 117-122.
- Verleyen, T., Sosinska, U., Ioannidou, S., Verhé, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., & De Greyt, W. (2002b). Influence of the vegetable oil refining process on free and esterified sterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(10), 947-953.
- Verleyen, T., Szulczewska, A., Verhé, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., & De Greyt, W. (2002c). Comparison of steradiene analysis between GC and HPLC. *Food Chemistry*, 78(2), 267-272.
- Vlahakis, C., & Hazebroek, J. (2000). Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: effects of genetics, planting location, and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(1), 49-53.
- Weingärtner, O., Böhm, M., & Laufs, U. (2009). Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. *European Heart Journal*, 30(4), 404-409.
- Williams, M.A. (1997). Preparation of oil-bearing materials for extraction. En: *Technology and Solvent for Extracting Oilseeds and non petroleum oils*. P.J. Wan y P.J. Wakely (Eds) American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, USA, pp 121-136.
- Woodgate, D., Chan, C. H., & Conquer, J. A. (2006). Cholesterol-lowering ability of a phytosterol softgel supplement in adults with mild to moderate hypercholesterolemia. *Lipids*, 41(2), 127-132.
- Yamaya, A., Endo, Y., Fujimoto, K., & Kitamura, K. (2007). Effects of genetic variability and planting location on the phytosterol content and composition in soybean seeds. *Food Chemistry*, 102(4), 1071-1075.
- Zambelli, A., León, A., & Garcés, R. (2015). Mutagenesis in sunflower. In *Sunflower* (pp. 27-52). American Oil Chemists' Society Press.

- Zamora, R., Olmo, C., Navarro, J. L., & Hidalgo, F. J. (2004). Contribution of phospholipid pyrrolization to the color reversion produced during deodorization of poorly degummed vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4166-4171.
- Zawistowski, M., Gopalakrishnan, S., Ding, J., Li, Y., Grimm, S., & Zöllner, S. (2010). Extending rare-variant testing strategies: analysis of noncoding sequence and imputed genotypes. *The American Journal of Human Genetics*, 87(5), 604-617.
- Zlatanov, M. D., Angelova-Romova, M. J., Antova, G. A., Dimitrova, R. D., Momchilova, S. M., & Nikolova-Damyanova, B. M. (2009). Variations in fatty acids, phospholipids and sterols during the seed development of a high oleic sunflower variety. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(9), 867-875.
- Zufarov, O., Schmidt, S., & Sekretár, S. (2008). Degumming of rapeseed and sunflower oils. *Acta Chimica Slovaca*, 1(1), 321-328.