



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD

TESIS DOCTORAL

INFLUENCIA DEL COMPONENTE GENÉTICO
Y EL PROCESO DE EXTRACCIÓN SOBRE LA
FRACCIÓN ESTERÓLICA DEL ACEITE DE
OLIVA VIRGEN Y SU CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE

PRESENTADA POR:
ONEJDA KYÇYK

DIRIGIDA POR:
DR. D. JOSÉ JUAN GAFORIO MARTÍNEZ
DR. D. GABRIEL BELTRÁN MAZA
DR. D. ANTONIO JIMÉNEZ MÁRQUEZ

JAÉN, 24 DE FEBRERO DE 2014

ISBN 978-84-8439-998-8

Los trabajos de investigación que se exponen en esta Memoria Doctoral han sido realizados en el Centro IFAPA “Venta de Llano” y en Departamento de Inmunología en la Universidad de Jaén, bajo la dirección de los Doctores Dr. José Juan Gaforio Martínez, Dr. Gabriel Beltrán Maza y Dr. Antonio Jiménez Márquez.

Dr. José Juan Gaforio Martínez

Dr. Gabriel Beltrán Maza

Dr. Antonio Jiménez Márquez.

La presente Memoria de Tesis ha sido realizada gracias a la beca pre doctoral concedida por la MAEC–AECID, y la financiación con cargo a fondos del Proyecto INIA–FEDER RTA2010-00013-C02-01.

AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizado mi tesis doctoral, tengo la obligación de enfrentarme al capítulo más complicado de este trabajo, que no es otro que el de los agradecimientos. He de sintetizar en unas breves líneas mi sentida y sincera gratitud hacia las personas que me han ayudado. Sin ellas, hubiese sido del todo imposible afrontar con éxito la elaboración de este proyecto, en la que tanta ilusión he puesto. Estos últimos años de mi vida han sido para mí, unos de los más importantes, intensos y fascinantes de mi trayectoria profesional. En este tiempo he tenido la enorme suerte y satisfacción de conocer y de trabajar con personas que me han ayudado de una forma y otra en la consecución de un esfuerzo de investigación, que se recoge en el presente documento de tesis doctoral, y a las que les estoy profundamente agradecido.

De forma muy especial, quiero dejar constancia de mi agradecimiento a mis directores Dr. Gabriel Beltrán Maza, Dr. José Juan Gaforio Martínez y Dr. Antonio Jiménez Márquez, a los que nunca podré corresponder como merecería tantos años de conocimiento y sabiduría empleados en mi formación. Me gustaría agradecerle la gran oportunidad que me han dado y la confianza que han depositado en mí en el decurso de esta tesis doctoral.

También quisiera darle las gracias al personal del IFAPA Centro “Venta del Llano” en especial a los directores Dr. Ángel García-Ortiz, Dr. José Antonio García Mesa y Francisco Manuel Sánchez Arenas, gracias por permitir a llevar a cabo mi sueño.

Me gustaría dar las gracias de una manera muy especial al personal del Laboratorio de “Venta del Llano” (Maite, Mari Carmen, Gloria, Octavia y Rita) por su inestimable ayuda durante todo este período y, lo más importante, por ofrecerme su amistad y todos los momentos agradables.

Gracias también a todos compañeros de administración a Lola y Juan Carlos (a la calbeza), a mí querida Josefina, Laura, Isabel, Manuela,

i y a Carmen. Os agradezco a todos ustedes por compartir conmigo todos los días la risa y la amistad.

Quería seguir con mis agradecimientos para los técnicos Conchi y Juan Cano y, los investigadores Dr. Marino, Dra. Mari Paz y Dra. Toñi, la amistad que habéis demostrado gracias a vuestra presencia he aprendido cosas nuevas.

A los becarios del centro Elena Guzmán, Abir, Abraham, Aymen, por compartir conmigo la misma ansia para terminar la tesis y realizar nuestro futuro en la investigación.

A continuación quería dar gracias a dos personas muy especiales a Micaela y Alfonso, a ellos dos le debo las horas de tarde y sobre todo la amistad tan sincera.

Me gustaría agradecer también al personal de mantenimiento a Miguel y Alfonso por su ayuda y disponibilidad que han demostrado cada vez que lo necesitaba. Además me gustaría dar gracias a personal del campo Rogelio, Ginés, Juan Torres, Sebastián, Eugenio, José, Paco y Justo.

A mis amigos, que han sabido disculpar mis ausencias y siempre han tenido una palabra de ánimo. Estoy absolutamente convencida de que si de algo puedo presumir en esta vida es de los grandes amigos que tengo, lo que me hace sentir una persona muy afortunada. Por estar siempre a lado e implicados en este trabajo resolviendo dudas o revisando, una y otra vez ante mi insistencia, distintas partes de la tesis, muy especialmente a Gema, Maika, Yosra, y Elena.

También quería agradecer a mi amiga Angjelina por su amistad y bondad gracias por estar allí siempre cuando he necesitado con su apoyo o incluso con un consejo (Do të jem gjithmon mirënjohëse je albañola me e mirë që kam njohur. Faleminderit Mike).

AGRADECIMIENTOS

No quería olvidar en estos agradamientos a dos personas muy especiales para mí a María Caro y Juan Pereira, gracias para ofrecerme vuestro hogar y sentirme como en casa. Os debo mucho a los dos.

A mi familia política, a los suegros, a los cuñados y a las cuñadas por el apoyo durante estos años.

Pero mi mayor agradecimiento se lo debo a mis padres, mis dos hermanas (Ana y Aurora), los cuñados y mis dos sobrinos (Jurgen y Dejvi), por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de la vida, hayan sido buenas o malas, y especialmente por enseñarme a luchar por lo que quiero y a terminar lo que he empezado. Sin ellos nunca habría terminado esta Tesis Doctoral. Babi Mami ju dua shumë. Shumë faleminderit.

Y por último mí agradecimiento le doy a mi pequeña familia a mi marido Bojken y a mi hijo Eneas, a los dos les debo mucho, sin ellos no sabría qué hacer, la presencia de ellos me dio fuerzas a seguir a luchar en este camino de mi vida.

Al final, esta tesis lo dedico a una persona muy especial que seguramente estaría muy orgulloso. "Me mungon shumë vëllaço".

¡Gracias mis amores!

ÍNDICE GENERAL

I.	ÍNDICE DE TABLAS	vi
II.	ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
III.	NOMENCLATURA.....	xxi
IV.	RESUMEN	xxvi
V.	SUMMARY	xxxii
VI.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	xxxviii
VII.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	1
	VII. 1. Historia y Aspectos generales sobre los esteroides	3
	VII.2. La biosíntesis de los esteroides	8
	VII. 3. Formación de los esteroides en el fruto del olivo	10
	VII. 4. Esteroides en el aceite de oliva virgen.....	13
	VII. 5. Influencia de los factores agronómicos en la composición de la fracción esteróica del aceite de oliva.....	15
	VII. 6. Influencia de los factores tecnológicos en la composición de la fracción esteróica del aceite de oliva.....	19
	VII. 6.1. Operaciones preliminares	20
	VII. 6.2. La preparación de la pasta	21
	VII. 6.3. Separación de la fase sólida– líquida	25
	VII. 6.4. Separación de la fase líquida	27
	VII. 6.5. Almacenamiento del aceite	28
	VII.7. La calidad de aceite de Oliva.....	29
	VII. 8. La adulteración de aceite de Oliva	35
	VII. 9. Efectos bioactivos de los esteroides.....	37
	VII. 9.1. Efectos de los esteroides sobre la disminución del colesterol en LDLs	37
	VII.9.2. Efectos de los esteroides vegetales sobre aterosclerosis...39	

VII.9.3. Otros efectos biológicos de los esteroides	40
VII.9.3.1. Efectos sobre el cáncer	40
VII. 9.3.2. Efectos sobre las propiedades de membrana	41
VII. 9.3.3. La actividad antioxidante de los esteroides.....	42
VII. 9.3.4. Efectos sobre el sistema inmunitario.....	43
VIII. RESULTADOS.....	79
VIII.1. Capítulo I. Variabilidad intraespecifica de la composición y contenido total de la fracción de esteroides del aceite de oliva virgen.....	81
VIII.2. Capítulo II. Influencia de las condiciones de molienda del fruto en el contenido de esteroides del aceite de oliva virgen.	84
VIII.3. Capítulo III. Influencia de las condiciones de preparación de la pasta en el contenido de esteroides del aceite de oliva virgen.	120
VIII.4. Capítulo IV. Evaluación de la actividad antioxidante de los fitoesteroides del aceite de oliva virgen extra.....	149
IX. DISCUSIÓN GENERAL	185
X. CONCLUSIONES	199
XI. BIBLIOGRAFÍA	204

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla. VII.7.1. Composición de los esteroides en el aceite de oliva. Reglamento CE n.º 1989/03.....	34
Tabla. VII 8.1. El perfil de los esteroides de algunos aceites vegetales y el aceite de oliva según los límites establecidos.....	36
Tabla. VIII.1.1. Área de origen de las 43 variedades de olivo analizadas del Banco de Germoplasma Mundial de Olivo de Córdoba.....	53
Tabla. VIII.1.2. Composición del suelo del Banco de Germoplasma Mundial de Olivo de Córdoba.....	54
Tabla. VIII.1.3 a. Composición de la fracción esteróica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.....	59
Tabla. VIII.1.3 a. Composición de la fracción esteróica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.....	60
Tabla. VIII.1.3 b. Composición de la fracción esteróica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.....	61
Tabla. VIII.1.3 b. Composición de la fracción esteróica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.....	62
Tabla. VIII.1.4. Contenido de esteroides totales de los aceites de 43 variedades de olivo cultivadas en el Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.....	67

Tabla. VIII.1.4 a. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.....	72
Tabla. VIII.1.4 a. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.....	73
Tabla. VIII.1.4 b. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.....	74
Tabla. VIII.1.4 b. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.....	75
Tabla. VIII.2.1. Influencia del grado de molienda (mm) y de la velocidad de giro de los martillos (rpm) en el contenido en esteroides del aceite de oliva extraído con molino Listello.....	94
Tabla. VIII.2.2. Porcentaje de variabilidad explicada por las condiciones de molienda en contenido de esteroides presentes en el aceite de oliva virgen.....	96
Tabla. VIII.2.3. Influencia del grado de molienda (mm) y de la velocidad de giro de los martillos (rpm) en el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen extraído con molino de criba Perforada.....	103
Tabla. VIII.2.4. Porcentaje de variabilidad explicada por las condiciones del molino de Criba Perforada para algunos esteroides presentes en el aceite de oliva virgen.....	104

Tabla. VIII.2.5. Efecto del tipo de molienda en la composición de la fracción esterólica del aceite de oliva virgen.....	109
Tabla. VIII.2.6 Porcentaje de variabilidad explicada por el tipo de molino y la velocidad de giro de los martillos para algunos esteroides presentes en el aceite de oliva virgen.....	112
Tabla. VIII.3.1a. Efecto de las condiciones de preparación de la pasta: grado de molienda, tiempo y temperatura del batido en el contenido de los esteroides mayoritarios y el contenido total de esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.....	130
Tabla. VIII.3.1b. Efecto de las condiciones de preparación de la pasta: grado de molienda, tiempo y temperatura del batido en el contenido de los esteroides minoritarios del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.....	131
Tabla. VIII.3.2. Porcentaje de variabilidad explicada por las condiciones de preparación de la pasta para algunos esteroides presentes en el aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.....	133
Tabla. VIII.3.3. Efecto del grado de la molienda en el contenido de esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.....	134
Tabla. VIII.3.4. Influencia de la temperatura de batido de la pasta en el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.....	136
Tabla. VIII.3.5. Influencia del tiempo del batido de la pasta de aceituna en el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.....	136

- Tabla. VIII 3.6. Efecto de la interacción de la temperatura y el tiempo de batido de la pasta en el contenido en Colesterol, 24-Metilencolesterol, del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.....137
- Tabla. VIII 3.7. Efecto de la interacción de la temperatura y el tiempo de batido de la pasta en el contenido en β -Sitosterol y Esteroles Totales del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.....138
- Tabla. VIII.3.8. Influencia de interacción entre el grado de molienda y la temperatura del batido en el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.....139
- Tabla. VIII.3.9. Efecto de la interacción entre el grado de molienda y del tiempo del batido para el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.....140
- Tabla. VIII 4.1. Porcentaje de actividad captadora de radicales libre de los principales esteroides del aceite de oliva (β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol) medida mediante reducción del radical DPPH. α -Tocoferol fue usado como antioxidante de referencia.....164
- Tabla. VIII.4.2. Porcentaje de actividad captadora de radicales libre (β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol) medido mediante la decoloración del ABTS +. Trolox fue usado como antioxidante de referencia.....166
- Tabla. VIII.4.3. Actividad antioxidante (expresado con porcentaje de inhibición de la cadencia) de los esteroides del aceite de

oliva evaluado mediante el método blanqueamiento de β – Caroteno.....	169
Tabla. VIII 4.4 Composición esterólica del aceite de oliva utilizado en ensayo.....	172

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. VII.1.1. Enumeración de los átomos de carbono en la molécula de un esteroide Moss (1989).....	4
Figura VII.1. 2 (a y b). Esquema de los esteroides principales en plantas (Ostlund et al., 2002).....	6
Figura VII.1.3. Modificaciones del grupo 3 β -hidroxilo de los esteroides vegetales (Oliver et al., 2005).....	7
Figura. VII.2.1. Ruta isoprenoide de las plantas. Biosíntesis de los esteroides por la ruta de mevalonato (Verpoorte, 2000).....	9
Figura. VII.2.2. Ruta de biosíntesis de los esteroides en la planta a través del precursor de cicloartenol (Arnqvist, 2007).....	10
Figura. VII.3.1. Ruta de biosíntesis de los esteroides (Piironen et al., 2000).....	12
Figura. VII.5.1. Concentración de los esteroides principales y esteroides totales durante la maduración del fruto (Koutsafakis, et al., 2000).....	16
Figura. VII.5.2. Variación concentraciones de los esteroides principales y esteroides totales en diferentes altitudes (Ferrero y Aparicio 1991).....	17
Figura VII.5.3. Concentraciones de los esteroides principales y esteroides totales en seco y recaído (Stefanoudaki et al., 2001).....	18
Figura VII.5.4. Concentraciones de los esteroides principales y totales de algunos de variedades de Extremadura (Sánchez et al., 2004).....	19

Figura. VII.6.1.1. Influencia del tiempo de almacenamiento del fruto en la acidez y el contenido de esteroides totales y Estigmasterol del aceite de oliva (Gutiérrez et al., 2000).....	21
Figura. VII.6.2.1. Influencia de diferentes temperaturas en el contenido de Estigmasterol y Δ^5 -Avenasterol (Koutsaftakis et al., 1999).....	24
Figura VII.6.2.2. Influencia de diferentes tiempos de batido en el contenido de Estigmasterol y Δ^7 Estigmastanol (Guillaume et al., 2012).....	25
Figura. VII.6.1. Influencia de diferentes tipos de extracción en el contenido de esteroides en el aceite de oliva Salvador et al., (2003).....	26
Figura. VIII.1.1 Análisis de Componentes principales (PC 1 y PC 2) de los esteroides del aceite de oliva virgen de 43 variedades de Banco de Germoplasma de Córdoba.....	68
Figura. VIII.2.1 Influencia de grado de molienda en el contenido de Campesterol, Clerosterol y Sitostanol en el aceite de oliva virgen obtenido mediante molino Listello (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....	97
Figura. VIII.2.2. Influencia de la velocidad de giro en el contenido en Estigmasterol, Δ^5 , 24-Estigmastadienol, Δ^7 -Estigmastanol y Δ^7 -Aveasterol en el aceite de oliva virgen obtenido mediante molino Listello (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....	97

Figura. VIII.2.3. Interacción entre el grado de molienda y la velocidad de giro de los martillos del molino Listello para el contenido de Campesterol, Estigmasterol, Δ^7 -Estigmastanol y Uvaol del aceite de oliva virgen (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....99

Figura. VIII.2.4. Efecto de la interacción entre la velocidad de giro y grado de la molienda en el contenido en Clerosterol, Δ^5 , 24-Estigmastadienol y Δ^7 -Avenasterol del aceite de oliva virgen obtenido con molino de Listello (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....100

Figura. VIII.2.5. Efecto de la interacción del grado de la molienda y velocidad de giro en el contenido en β -Sitosterol y Esteroles Totales del aceite de oliva virgen obtenido con molino de Listello (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....101

Figura. VIII.2.6. Influencia de grado de molienda en el contenido en Colesterol, Δ^5 ,24-Estigmastadienol y Δ^7 -Estigmastanol en el aceite de oliva virgen obtenido mediante el empleo de molino Criba Perforada (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....105

Figura. VIII.2.7 Efecto de la velocidad de giro de los martillos en el contenido de los esterole mayoritarios y esterole totales de aceite de oliva virgen extraído con molino de Criba Perforada (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....106

Figura. VIII.2.8. Interacción entre el grado de molienda y la velocidad de giro de los martillos del molino de Criba Perforada para el contenido de Campesterol, Estigmasterol, Δ^5 -Avenasterol, Δ^5 24-Estigmastadienol, Δ^7 -Estigmastanol

y Esteroles Totales del aceite de oliva virgen (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....	107
Figura. VIII.2.9. Diferencia significativa del contenido de Estigmasterol del aceite de oliva virgen obtenido por dos tipos de molino (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....	110
Figura. VIII.2.10. Efecto de la velocidad de giro de los martillos en el contenido en esteroles del aceite de oliva virgen obtenidos empleando los molinos de Listello y Criba Perforada (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....	111
Figura. VIII.2.11. Efecto de la interacción entre el tipo de molino y la velocidad de giro de los martillos en el contenido en Estigmasterol del aceite de oliva virgen extra (Test de Tukey $p \leq 0.05$).....	113
Figura. VIII.4.1. Estructura química de los principales esteroles del aceite de oliva.....	153
Figura. VIII.4.2. Actividad captadora de radicales libres del β -Sitosterol, Δ^5 Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol mediante el método ORAC.....	168
Figura. VIII.4.3. Capacidad quelante de metal de los esteroles, a) β -Sitosterol, b) Δ^5 -Avenasterol, c) Campesterol y b) Estigmasterol y frente a las diferentes concentraciones de CuSo_4	171
Figura. VIII.4.4. Efecto de la fortificación de un aceite de oliva con diferentes concentraciones de esteroles en la estabilidad (valores medios \pm SD).....	173

NOMENCLATURA

ABTS	2'2 azino-bis (3 – etilbenzotiazdino – 6 ácido sulfúrico).
DPHH	2'2 difenil 1 – picrihidrozilo
C	Carbono
C ₂₄	Carbono en la posición 24
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
CoA	Coenzima A
SMT1	metil transferasa tipo 1
SMT2	metil transferansa tipo 2
rpm	rotulaciones por minuto
Fc	Fuerza centrifuga
Tn	Toneladas
COI	Consejo Internacional de Olivo
CE	Comunidad Europeo
HPLC	Cromatografía liquida de alta eficacia
Al ₂ O ₃	Oxido de Aluminio
LDL	Lipoproteína de baja densidad
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
HLD	Lipoproteína de alta densidad
PUFA	Ácidos grasos polinsaturados
IFAPA	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía
FID	Detector de ionización de llama
PC	Componente Principal
ANOVA	Análisis de la variancia
ORAC	La capacidad absorbente del radical de oxigeno
CU+	Cobre
TROLOX	6–hidroxi–2'5'7'8–tetrametilcromo–2ácido carboxilo
AAPH	2'2 azobis– (-2 –metilpropionamide) dihidroclorid)

BHT	2.6 – di – tert – butil – 4 – metilfenol
H [•]	Hidrogeno
UV-Vis	Ultravioleta Visible
TEAC	Numero de radical libre consumido por una molécula de antioxidante.

RESUMEN

El trabajo de investigación desarrollado tiene como objetivo el estudio del contenido de esteroides en el aceite de oliva virgen extra y el análisis de la variabilidad de estos compuestos en base a factores varietales; factores industriales, como la molienda y batido; y su relación con aspectos nutricionales.

Este estudio de investigación se ha abordado en diferentes etapas y metodologías analíticas. La variabilidad de esteroides se ha determinado mediante varios estudios. Se ha evaluado el contenido de la fracción esteroídica en 43 aceites procedentes de las variedades del Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba.

Los resultados demuestran que existe variabilidad en cuanto al contenido de estos compuestos en los aceites de oliva vírgenes extra estudiados y que ello es dependiente de la variedad de aceituna. En el 72% de los aceites analizados, el contenido total e individual de esteroides se encuentra dentro de los límites establecidos por el Reglamento de la Unión Europea. Por el contrario, un 28% de los aceites estudiado presentan valores inferiores a los establecidos en el Reglamento.

Del total de aceites estudiados, hemos detectado que el 43% de ellos presentan esteroides minoritarios (Brassicasterol, 24-Metilencolesterol y Sitostanol) cuyo contenido se encuentran a niveles de traza o, incluso, ausentes.

En el estudio realizado para ver el efecto que produce la variación del grado de molienda y las condiciones de batido sobre los contenidos de esteroides en el aceite de oliva virgen, hemos demostrado que, las condiciones de preparación de la pasta influyen de manera significativa en el contenido final de esteroides presentes en el aceite de oliva virgen obtenido.

Hemos determinado que, las condiciones de molienda: tipo de molino, velocidad de giro de los martillos y diámetro de criba, son factores importantes que condicionan, de forma significativa, el contenido total de estos compuestos en los aceites obtenidos, de tal forma que, obtenemos los mayores contenidos de la fracción esteróica en las condiciones de molienda menos agresivas. Se obtienen mayores contenidos de estos compuestos con diámetro de criba más elevado y velocidades de giro de los martillos bajas en el caso de la Criba Perforada y para la Criba Listello con velocidades de martillos media-alta.

En cuanto a las condiciones del batido (temperatura y tiempo), hemos determinado que, el contenido de esteroides en el aceite de oliva virgen aumenta cuando la pasta de aceituna se bate a bajas temperaturas (20°C), mientras que, los tiempos de batidos altos reducen dicho contenido.

Hemos estudiado también la capacidad antioxidante de estos compuestos utilizando distintos métodos analíticos; ABTS, DPPH, ORAC, blanqueamiento del beta-caroteno, estabilidad oxidativa de los

aceites y, la actividad quelante del Cu⁺ y, los resultados nos muestran una moderada capacidad antioxidante de estos compuestos. En alguno de estos análisis (ORAC) hemos detectado una cierta actividad prooxidante de los esteroides. En la evaluación del β -Sitosterol y Campesterol, no se detecta ninguna actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, podrían tener interés práctico pues, podrían ser importantes para ser tenidos en consideración en las próximas revisiones del Reglamento relativas a la autenticidad del aceite de oliva virgen.

SUMMARY

The research work developed has as objective the study of the content of sterols in the extra virgin olive oil, and the analysis of the variability of these compounds on the basis of factors varietals; industrial factors, such as milling and melaxing process and; its relationship with nutritional aspects.

This study has been addressed in different stages and analytical methodologies. The variability of sterols has been determined through several studies. We evaluated the content of the sterol fraction in oils from 43 varieties from the World Bank of Germoplasm of Cordoba.

The result show that there is variability in regard to the content of these compounds in the extra virgin olive oils studied and that this is dependent on the variety of olive. In the 72% of the oils tested, the total and individual content of sterols are found within the limits established by the Regulation of the European Union. On the contrary, 28% of the oils studied presented values lower than those set out in the Regulations.

Of the total oils studied, we have found that in 43% of them have a content of different sterols minority (brassicasterol, 24-methylene cholesterol and, sitostanol) that are to trace levels, or even absent.

In the study to see the effect of the variation in the degree of milling and the conditions of melaxing process on the content of sterols in virgin olive oil, we demonstrated that the conditions for the preparation of the

paste have a significant impact on the final content of sterols present in obtained virgin olive oil.

We have determined that the conditions of grinding: type of mill, speed of rotation of the hammers and sieve diameter, are important factors that mediate, significantly, the total content of these compounds in the oils obtained, in such a way that we get the highest contents of the sterol fraction in the milling conditions less aggressive. Results have demonstrated an increased content of these compounds with sieve diameter and higher rotational speeds of the hammers, low in the case of the perforated sieve and sieve for the Listello with speeds of hammers medium-high.

In the terms and conditions of the mixing process (temperature and time), we have determined that the content of sterols in virgin olive oil increases when the olive paste is kept at low temperatures (20 °C), while the high times of smoothies, reduce the content.

We have also studied the antioxidant capacity of these compounds using different analytical methods; ABTS, DPPH, ORAC, bleaching of the beta-carotene, oxidative stability of oils and the activity of the Cu chelator and, the results show us a moderate antioxidant capacity of these compounds. In any of these analyzes (ORAC) we have detected a certain pro-oxidant activity of the sterols. In the evaluation of β -sitosterol and campesterol, detected no antioxidant activity.

The results obtained in this research could have practical interest could therefore be important to be taken into consideration in the future revisions of the Rules concerning the authenticity of the virgin olive oil.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El aceite de oliva es uno de los componentes fundamentales de la dieta Mediterránea. En las últimas décadas el uso del aceite de oliva se ha incrementado incluso en los países para los que el uso de aceite de oliva no es habitual (Mili, 2006). Este interés se atribuye a las propiedades bioactivas que ha demostrado (Kiritsakis, 1998) y que a su vez están relacionadas con la composición química del aceite.

El aceite de oliva presenta en su composición la fracción mayoritaria (ácidos grasos), y componentes minoritarios como antioxidantes naturales y los esteroides (Cercaci et al., 2007). Los esteroides son unos de los compuestos mayoritarios de la fracción insaponificable; en aceite de oliva se conocen alrededor de 15 esteroides entre los que β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol son los mayoritarios, mientras que Colesterol, 24-Metilcolesterol, Brasicasterol, Campestanol, Δ^7 -Campesterol, $\Delta^5,23$ -Estigmastadienol, Clerosterol, Sitostanol, $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol, Δ^7 -Estigmastanol y Δ^7 -Avenasterol, se encuentran en niveles más bajos o incluso en forma de trazas.

El contenido de los esteroides en el aceite de oliva varía en función de las condiciones agronómicas, las condiciones climáticas y factores tecnológicos (Guillaume et al., 2012).

En los últimos años estos compuestos han presentado gran interés nutricional por sus propiedades fisiológicas. Diferentes estudios han mostrado los efectos de los esteroides en diferentes enfermedades

como hipocolesterolemia, cardiovasculares y cancerígenas (Ling y Jones, 1995).

Sin embargo, los trabajos sobre esta la fracción del aceite de oliva son escasos, y no describen la variabilidad en contenido y composición, ni su capacidad antioxidante.

Objetivos

Los objetivos principales de esta Tesis Doctoral son:

1. Evaluación de la variabilidad de los esteroides en el aceite de oliva virgen.
2. Análisis la capacidad antioxidante de los esteroides más abundantes en el aceite de oliva virgen.

Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1.1. Estudiar el efecto de la variedad en el contenido y composición de esteroides en los aceites de 43 variedades.
- 1.2. Evaluar la influencia de las condiciones de molienda (molino, criba y velocidad) en la composición y contenido total de la fracción esteróica en los aceites de la variedad 'Picual'.

- 1.3. Analizar la influencia de batido de la pasta (tiempo, temperatura), en la fracción esterólica en los aceites procedentes de las variedades 'Picual'.
- 1.4. Caracterizar la actividad antioxidante "in vitro" de los principales esteroides de aceite de oliva valorada con diferentes métodos.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

VII. 1. Historia y Aspectos generales sobre los esteroides

Los primeros estudios sobre los esteroides se remontan al año 1733 por Vallisneri, encontrándose en formas cristalinas como soluciones alcohólicas de piedras de la vesícula. Años más tarde (1769), Poulletier de la Salle descubrió las mismas formas cristalinas cuando examinó los lípidos de las piedras en la vesícula, las cuales fueron solubles en alcohol (revisión según Ellis, 1918). Curiosamente estos lípidos que formaban los cristales no se alteraban por la saponificación, tal y como le ocurría a las bebidas alcohólicas y compuestos biológicos (Chevreul, 1815). Cuatro décadas después, el compuesto conocido como "colesterina" se encontró en forma de éster y lo denominaron como alcohol (Berthelot, 1859); de forma que el nombre común de este compuesto es, hoy en día, "colesterol". Años más tarde se descubrió la presencia de colesterol en diversos tejidos humanos y animales superiores (revisión según Bills, 1935).

Por primera vez, Beneke en (1862), Ritthausen y Lindenmeyer en (1863) aislaron los esteroides presentes en las plantas pensando que se trataba de colesterol, no obstante, en el año 1878 se descubrió que se trataba de "fitosterol". En años posteriores, se halló que los fitoesteroides no son compuestos derivados del colesterol, sino una mezcla de esteroides vegetales.

Hoy en día se conocen casi 250 tipos de esteroides (Akihisa *et al.*, 1991) y se clasifican en diferentes grupos, que según la nomenclatura más utilizada son:

4-des-, 4-mono- y 4, 4'-dimetilesteroles.

En este grupo se incluyen los esteroides comunes que están formados por grupos metilo en el anillo A del Carbono 4 (Figura VII 1.1); así la ausencia o la presencia del grupo metilo en Carbono 30 y 31 forman los denominados 4,4-dimetilesteroles (con dos grupos metilo), 4 α -metilesteroles (con un grupo metilo) y 4 α -desmetilesteroles (sin grupo metilo) (Akihisa *et al.*, 1991).

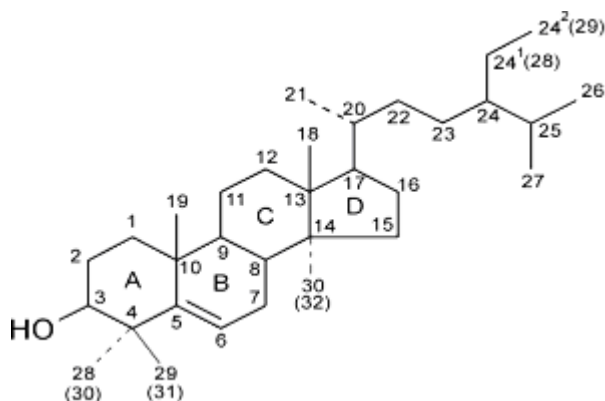


Figura VII.1.1. Enumeración de los átomos de carbono en la molécula de un esteroide (Moss, 1989).

24 – des-, 24 – metil y 24 – etilesteroles

Los grupos *24-des-*, *24-metil* y *24-etilesteroles* están divididos en tres clases, caracterizados por la alquilación del Carbono 24 de su cadena, *24-desmetilesteroles* (sin grupo alquilo), *24-metilesteroles* (con un grupo metilo) y *24-etilesterol* (con un grupo etilo).

La mayoría de esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C 5. A parte los esteroides o fitoesteroides son esteroides derivados de plantas con estructuras similares y funciones análogas al colesterol (Moreau *et al.*, 2002). Como se ha descrito, el colesterol es el esteroide predominante en animales y desempeña importantes funciones en el organismo: es el precursor de la síntesis de diversas hormonas esteroideas, permite estabilizar las membranas celulares y, en forma de ésteres de colesterol (usualmente asociados con triacilglicéridos), participa en los procesos de transporte/almacenamiento de lípidos.

Las membranas de las plantas contienen poco o nada de colesterol, pero presentan varios tipos de esteroides vegetales. En general, se cree que estas sustancias actúan como componentes estructurales de las membranas vegetales, a la vez que sirven de intermediarios para la biosíntesis de celulosa y numerosos productos vegetales secundarios, como los alcaloides, entre otros (Peng *et al.*, 2002; Read y Bacic, 2002).

Los esteroides vegetales son miembros de la familia de los triterpenos, su estructura es similar a la del colesterol, pero incluye un grupo metilo o etilo en el C-24. Dentro del grupo de los esteroides encontramos dos categorías o subgrupos, los esteroides, con un doble enlace en posición 5, y los estanoles que no cuentan con dicho doble enlace, es decir, con una reducción-5a (Ostlund, 2002) (Figuras VII 1.2 a y b). Los esteroides pueden ser convertidos a estanoles por hidrogenación química. Cabe destacar que dado que normalmente los estanoles son mucho menos abundantes que los esteroides, cuando se habla en términos generales de esteroides se suele hacer referencia a estos últimos.

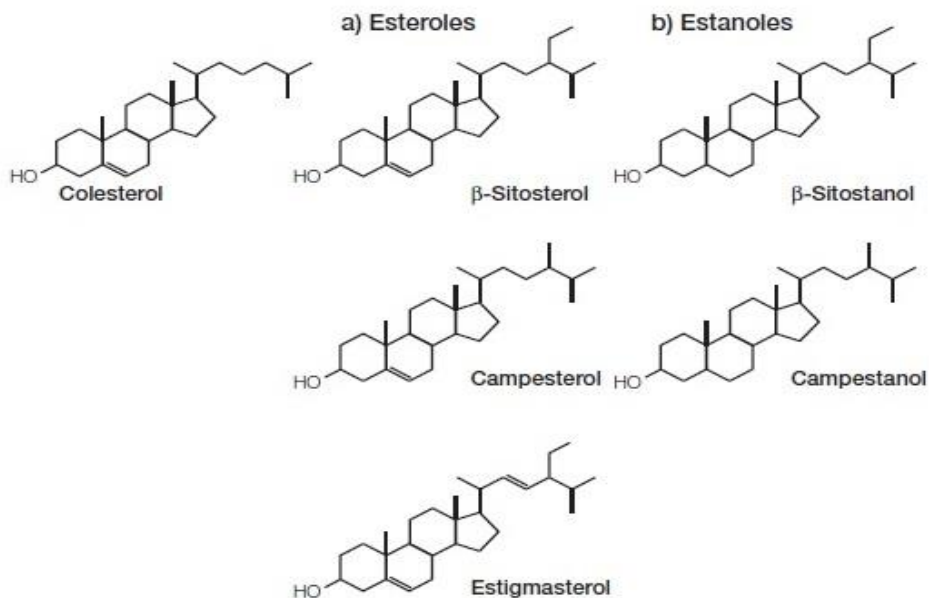


Figura VII.1. 2 (a y b). Esquema de los esteroides principales en plantas (Ostlund *et al.*, 2002).

Se han descrito más de 250 tipos diferentes de esteroides, siendo el más abundante el Sitosterol o β -Sitosterol, seguido por el Campesterol y el Stigmasterol (Ostlund *et al.*, 2002) (Figura VII 1.2a). Las dos categorías de esteroides se reflejan en los nombres de los compuestos. Así, el Sitosterol es estructuralmente idéntico al Sitostanol, excepto por el doble enlace en posición 5, y lo mismo ocurre con el Campesterol y el Campestanol (Figura VII 1.2b).

En la naturaleza, además de en la forma libre, los esteroides pueden aparecer como compuestos “conjugados”, en los cuales el grupo 3b-OH del esteroide está esterificado por ácidos grasos, ferrulato o ácido ferrúlico (potente antioxidante semejante a la vitamina E y C), o bien glicosilados (Figura VII 1.3).

Los ésteres con ácidos grasos están presentes en la mayoría de las plantas y constituyen cerca del 50% del total de esteroides en algunos alimentos, como el aceite de maíz (Kochhar, 1983). Por su parte, los ésteres de ferulato también aparecen en cantidades apreciables en muchos alimentos (Ostlund *et al.*, 2002), mientras que los esteroides glicosilados son unos componentes minoritarios en los alimentos, salvo algunas excepciones, como es el caso de las patatas en las que constituyen el 82% del total de los esteroides (Jonker *et al.*, 1985). Al contrario que los esteroides o estanoles libres, que son cristalinos y muy poco liposolubles, las formas esterificadas se disuelven fácilmente en alimentos que contengan grasa (Clifton, 2002).

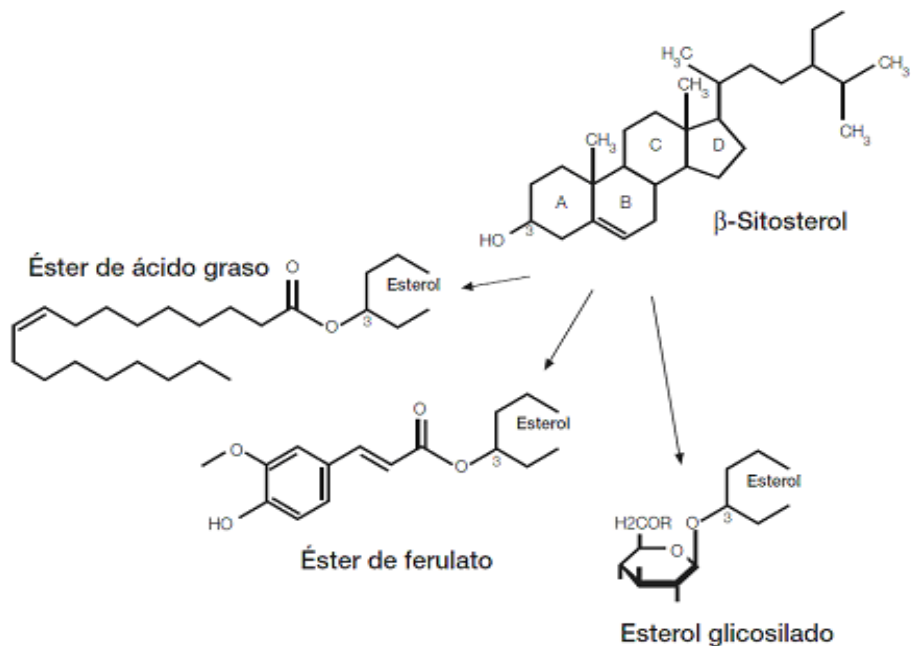


Figura VII.1.3. Modificaciones del grupo 3β-hidroxilo de los esteroides vegetales (Oliver *et al.*, 2005).

La gran mayoría de esteroides conocidos son sólidos cristalinos incoloros, solubles en solventes orgánicos relativamente apolares (Cloroformo, Benceno, etc.), menos solubles en alcoholes de bajo peso

molecular, y que funden sin descomponerse (en forma libre o esterificada). Presentan además actividad óptica debido a los carbonos asimétricos que poseen. Los esteroides se pueden recrystalizar en metanol caliente o en la mezcla metanol-tetrahidrofurano 10:1, formando cristales en forma de agujas brillantes incoloras.

VII.2. La biosíntesis de los esteroides

Los esteroides se derivan biogénicamente del AcetilCoA (Ruta del Acetato) vía mevalonato y escualeno. Los esteroides vegetales tienen como precursor inmediato al cicloartenol, mientras que los animales tienen al lanosterol. De una forma análoga se originan también los triterpenoides (Bach y Benveniste, 1997; Benveniste, 2002; Benveniste 2004; Schaller, 2004).

El primer paso de la síntesis de los esteroides empieza con la acción de la enzima reductasa de 3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A que cataliza la transformación del 3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A, en ácido mevalónico, un precursor muy importante de isopreno. Con la ruta de isopreno, a través de la ciclación de oxidoescualeno, forman el cicloartenol el principal precursor de los esteroides (Figura VII 2.1). Durante la ruta de los isoprenoides se producen diferentes compuestos que son importantes en varios procesos como reguladores de crecimiento, la defensa y el proceso de fotosíntesis.

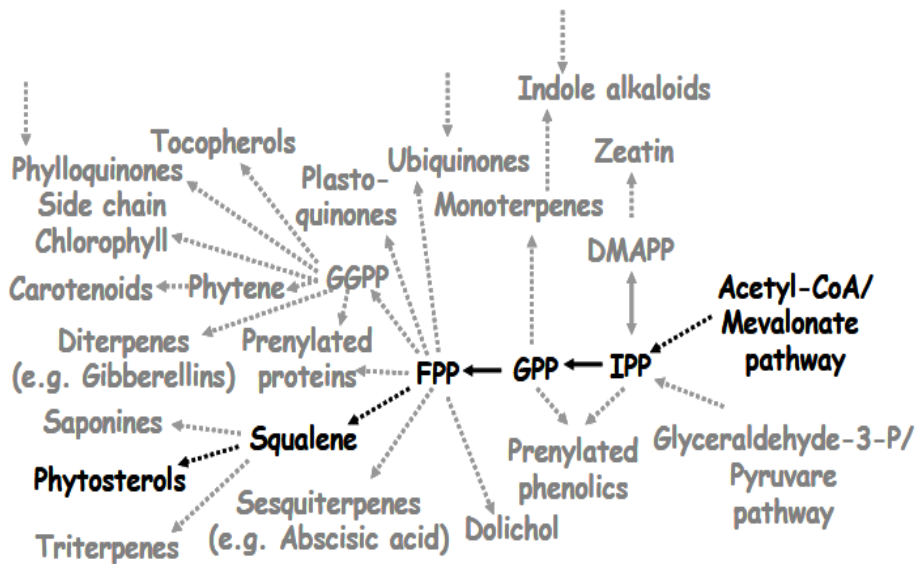


Figura VII.2.1. Ruta isoprenoide de las plantas. Biosíntesis de los esteroides por la ruta del mevalonato (Verpoorte, 2000).

La mayoría de los esteroides incluso el colesterol se sintetizan en tres rutas paralelas (Figura VII 2.2) a través del precursor de cicloartenol. En la biogénesis de los esteroides el precursor cicloartenol rompe la cadena en el carbono 2 a través de la metilación. La ruta de biosíntesis de los esteroides se realiza en dos reacciones con la ayuda de la enzima metiltransferasa SMT1 y SMT2.

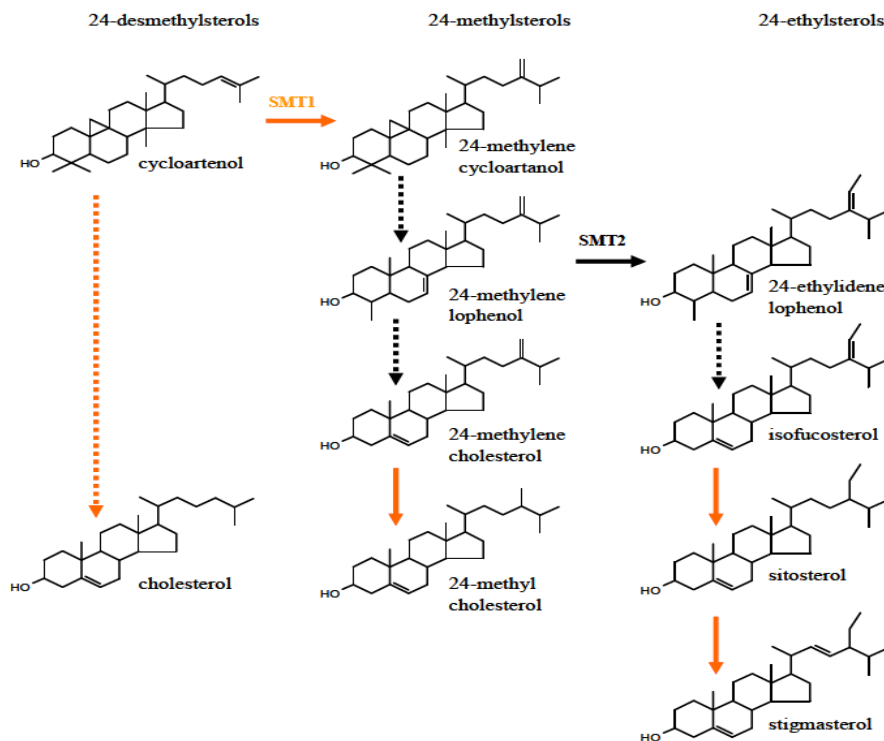


Figura VII.2.2. Ruta de biosíntesis de los esteroides en la planta a través del precursor de cicloartenol (Arnqvist, 2007)

VII. 3. Formación de los esteroides en el fruto del olivo

A lo largo del proceso de maduración del fruto se registran importantes cambios en la composición de sus esteroides. En las primeras etapas de desarrollo del fruto (entre 12 y 18 semanas tras floración) se encuentran cantidades muy altas de escualeno, precursor de los esteroides (Siti *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo del fruto el contenido en esteroides oscila aproximadamente entre 800 mg/100 mg, en las 26 semanas después

de la floración su contenido en el fruto alcanza niveles máximos y empieza a disminuir gradualmente al avanzar la maduración (Sakouhi *et al.*, 2009).

La disminución del contenido de los esteroides en el fruto en las últimas semanas de la maduración podría ser explicada porque la biosíntesis de los esteroides deja de funcionar, reduciendo de esta manera su contenido final. En realidad, durante este periodo, los fitoesteroides sintetizados ayudan a la formación de otros esteroides (Venkatramesh *et al.*, 2003).

El β -Sitosterol es el esteroide predominante, su contenido en el fruto alcanza el 95 % aproximadamente en las primeras etapas de maduración, disminuyendo después. Al contrario, el Δ^5 -Avenasterol, otro esteroide mayoritario en el aceite, presenta un contenido muy bajo al principio de la maduración del fruto alcanzando niveles más altos al final de la misma (Koutsaftakis *et al.*, 2000).

Durante la maduración del fruto Campesterol, Estigmasterol y Clerosterol alcanzan sus niveles más altos a las 26 semanas tras la floración, sus contenidos oscilan en un rango de 40.12 - 29.59 - 10.79 mg/100 mg de aceite, respectivamente (Sakouhi *et al.*, 2009). Respecto a estos esteroides, se ha descrito la posibilidad de un precursor común (Sakouhi *et al.*, 2009) (Figura VII 3.1).

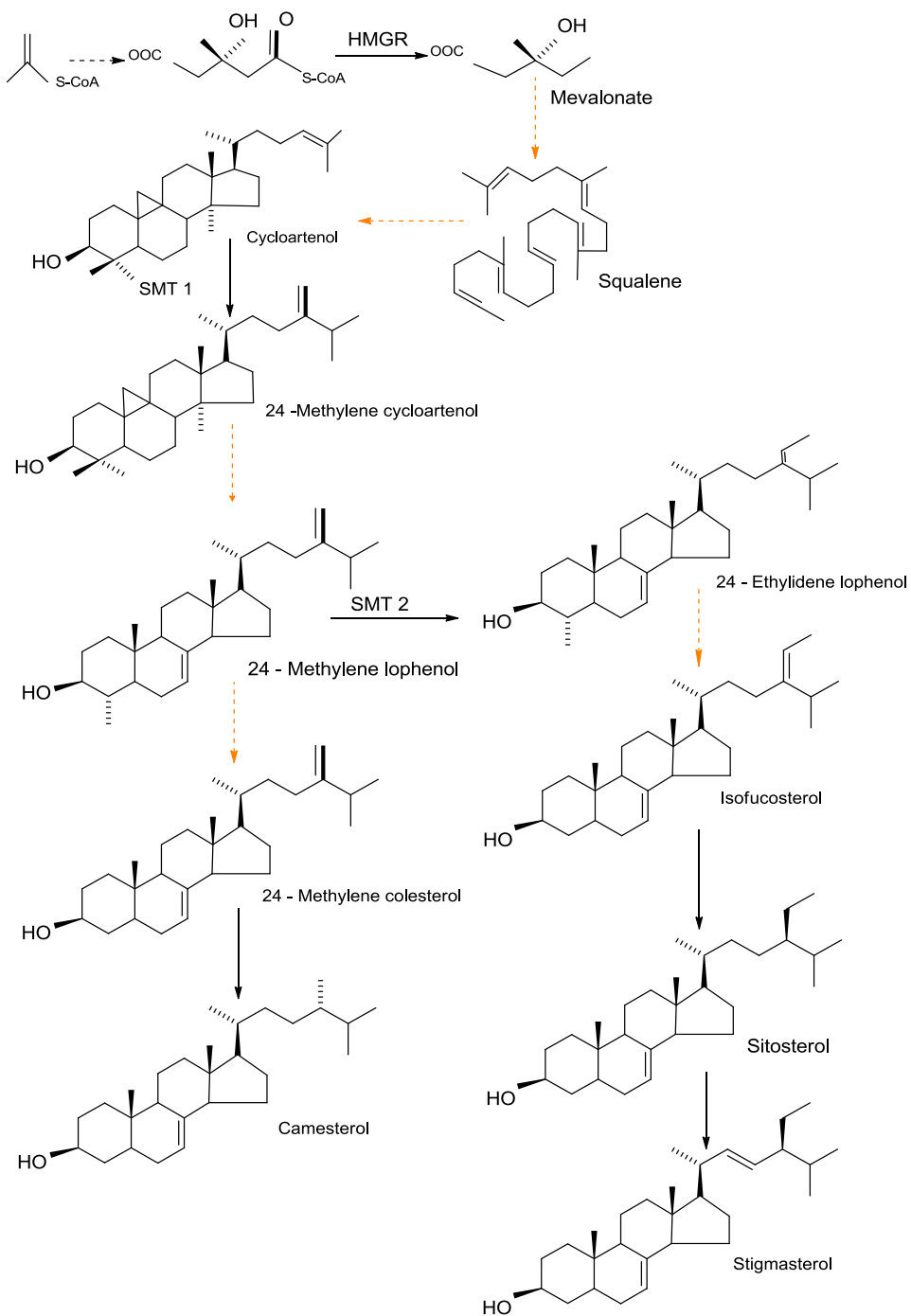


Figura VII.3.1. Ruta de biosíntesis de los esteroides (Piironen et al., 2000).

Los Δ^5 y Δ^7 -esteroles son un grupo muy importante de esteroles durante el desarrollo y crecimiento del fruto. Los Δ^5 -esteroles se encuentran, principalmente, en los tejidos de la aceituna y aumentan su contenido durante el desarrollo del fruto. Sin embargo, los Δ^7 -esteroles aumentan su contenido al final de la maduración (Sakouhi *et al.*, 2009). Así, durante el proceso de maduración de la aceituna la biosíntesis de los Δ^5 y Δ^7 -esteroles regulan el crecimiento y el desarrollo de nuevos tejidos del fruto. Los Δ^5 -esteroles se acumulan en la membrana plasmática, donde se cree que regulan su fluidez (Jiang y Wang, 2005).

VII. 4. Esteroles en el aceite de oliva virgen

Los esteroles son una importante fracción de constituyentes de carácter no glicerídico del aceite de oliva virgen. Se trata de moléculas liposolubles, complejas con cuatro anillos condensados que pueden estar en forma libre o esterificada con un ácido graso. Existen cuatro clases de esteroles: esteroles comunes (4 α -desmetilesteroles), 4 α -metilesteroles, 4,4-dimetilesteroles (alcoholes triterpénicos y dialcoholes triterpénicos) y ácidos hidroxiterpénicos. Si bien la descripción se va a centrar en los dos primeros grupos.

Desmetilesteroles. Los principales esteroles del aceite de oliva son el β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol y Campesterol (Fedeli, 1977; Itoh *et al.*, 1981; CE, 1993). En cantidades menores aparecen el Estigmasterol, colesterol, 24-Metilencolesterol, Δ^7 -Campesterol, Δ^5 -23 Estigmastadienol, Clerosterol, Sitostanol, Δ^5 -23 Estigmastadienol, Δ^7 -Estigmastenol y Δ^7 -Avenasterol (Calapaj *et al.*, 1993; CE, 1993).

El contenido total en esteroides para el aceite de oliva es 1 – 2 mg/g. La proporción de β -Sitosterol en la fracción esteróica del aceite de oliva es del 75 – 90 %, describiéndose un intervalo del 5 al 20 % para el Δ^5 -Avenasterol, 1 al 4 % para el Campesterol y del 0,5 al 2 % para el Estigmasterol (Amelotti y Morchio, 1977; Camera *et al.*, 1978; Conte *et al.*, 1993; Calapaj *et al.*, 1993; CE, 1993).

Como se ha señalado previamente, los esteroides se pueden presentar en forma libre o esterificada, alcanzando los esteril ésteres un porcentaje del 10–15 % de los esteroides totales (Boskou y Vlachopoulou, 1986; Grob *et al.*, 1990). La composición de los esteroides libres y esterificados ha sido descrita por Mariani *et al.* (1992), los Δ^5 -Esteroides diinsaturados aparecen en una proporción más elevada en su forma libre que en la esterificada, al contrario de lo que sucede con los esteroides Δ^7 -diinsaturados.

4 α -metilesteroides. Estos compuestos son intermediarios de la ruta de biosíntesis de los esteroides por lo que siempre se encuentran en pequeñas cantidades en el aceite de oliva.

De entre los 4-monometilesteroides identificados destacan por concentración el obtusifoliol, gramisterol, cilcoeucalenol y citrostadienol (Itoh *et al.*, 1973a; Itoh *et al.*, 1973b; Boskou y Morton, 1975). El contenido total de 4 α -metilesteroides en el aceite de oliva varía según los trabajos consultados, así Paganuzzi (1979) describió unos valores de 0,2 mg/g. mientras que Kornfeldt (1981) encuentra una concentración de 0,68 mg/g. En cualquier caso, debido a la complejidad

de la fracción de los 4 α -metilesteroles existen gran cantidad de compuestos aún sin identificar.

VII. 5. Influencia de los factores agronómicos en la composición de la fracción esterólica del aceite de oliva.

Los esteroides al igual que otros componentes en el aceite de oliva, varían sus concentraciones según la influencia tanto de factores agronómicos (zona del cultivo, prácticas agronómicas, clima, variedad y maduración) como tecnológicos (operaciones preliminares, extracción del aceite y almacenamiento).

Todos los factores agronómicos, incluyendo las condiciones climáticas que acompañan el desarrollo del cultivo del olivo, influyen de manera directa o indirecta en la composición del aceite. Muchos investigadores han estudiado la relación que existe entre el cultivo de olivo con el medio agronómico. El olivo está conectado con el área de origen y sus aspectos climáticos, y se ha demostrado con la variedad 'Arbequina', que es una variedad muy expandida en el Norte de España, que las características del aceite son muy diferentes de los cultivados en el Sur de España (Aparicio y Luna, 2002). El clima y el suelo son dos factores muy importantes en la concentración de los compuestos, tanto mayoritarios como en minoritarios del aceite.

El clima tiene una relación estrecha con la maduración del fruto, que está relacionada con la formación de los precursores metabólicos en el

fruto. Sin embargo, el tipo de suelo y sus reservas en agua y en los minerales se relaciona con el desarrollo del fruto afectando también las concentraciones finales de los dichos compuestos. (Aparicio y Luna, 2002).

La diversidad y la interacción de estos factores influyen en la concentración final de los esteroides en el aceite. Se ha comprobado que durante la maduración de la aceituna el contenido en Δ^5 -Avenasterol del aceite aumenta, sin embargo el contenido en β -Sitosterol disminuye (De la Torre *et al.*, 1985; Fiorino y Nizzi, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1999; Mariani *et al.*, 1991; Koutsaftakis *et al.*, 2000; Aparicio y Luna, 2002). La Figura VII. 5.1 muestra la concentración de los esteroides principales y esteroides totales durante la maduración del fruto.

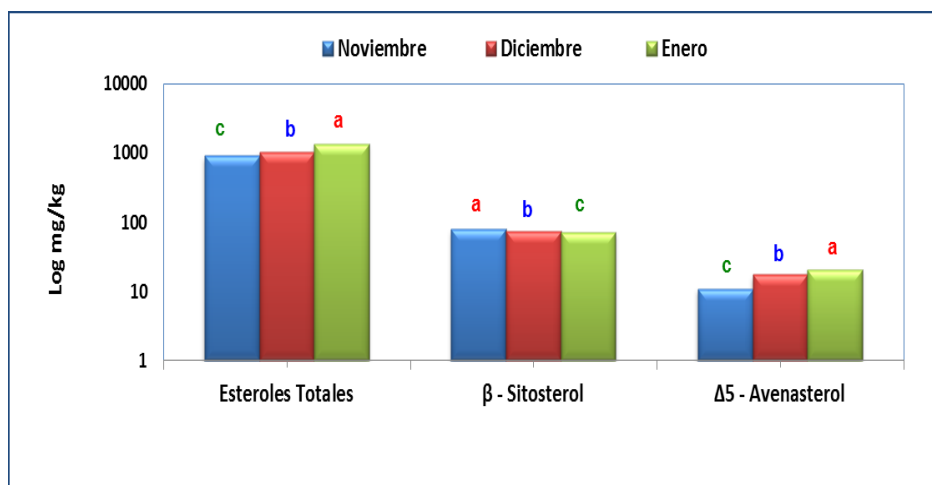


Figura VII.5.1. Concentración de los esteroides principales y esteroides totales del aceite de oliva durante la maduración del fruto (Koutsaftakis *et al.*, 2000).

Otros factores agronómicos que afectan a la composición de los esteroides en el fruto y posteriormente, en el aceite es la zona del cultivo (agua, salinidad y altitud) y a su vez, condiciones climáticas (lluvia, temperatura y humedad) (Casas *et al.*, 2004). Diferentes autores (Mousa y Gerasopoulos, 1996; El Antari *et al.*, 2000) han demostrado que en altitudes bajas los aceites presentan altos contenidos en esteroides. La Figura VII. 5.2 presenta las diferencias en las concentraciones de perfil de los esteroides a diferentes altitudes (Ferrero y Aparicio, 1991; Montedoro *et al.*, 1995; Bianchi *et al.*, 2001; Aparicio y Luna, 2002; Termime *et al.*, 2008).

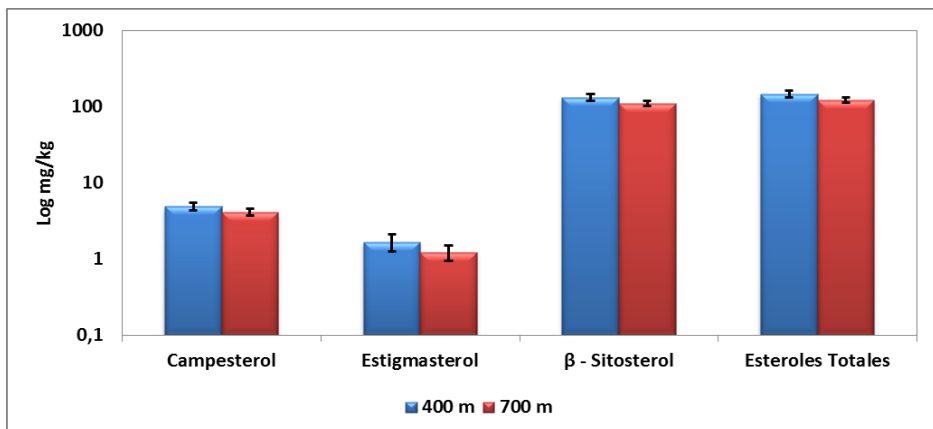


Figura VII.5.2. Variación en las concentraciones de los esteroides principales y esteroides totales a diferentes altitudes (Ferrero y Aparicio, 1991).

Se ha comprobado que el estrés hídrico afecta a la composición de los esteroides en el aceite. En los trabajos realizados por Stefanoudaki *et al.* (2001), demuestra que los olivos de secano han presentado un contenido más elevado en esteroides totales, β-Sitosterol y Campesterol. Estos resultados concuerdan con los trabajos realizados por Inglese *et al.* (1996). En la Figura VII. 5.3 se reflejan las concentraciones de los esteroides en aceites de secano y regadío.

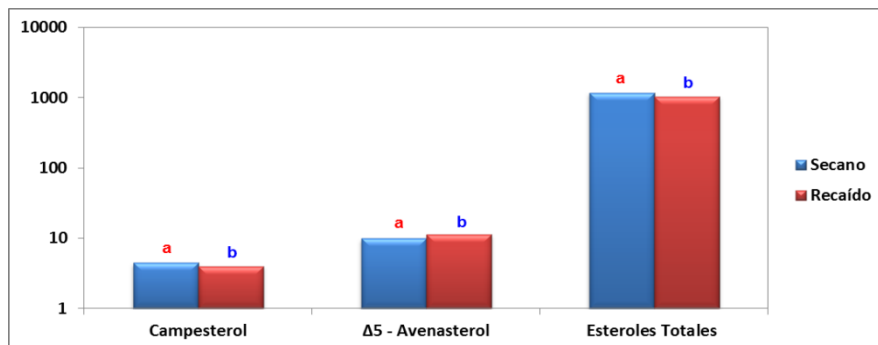


Figura VII.5.3. Concentraciones de los esteroides principales y esteroides totales en aceites de seco y regadío (Stefanoudaki *et al.*, 2001).

Otro factor agronómico que afecta el contenido de los esteroides del aceite de oliva es la salinidad del agua de regadío. En los trabajos realizados por El Agaimya *et al.* (1994), se ha observado que en salinidades más elevadas el contenido de esteroides del aceite disminuye.

Diferentes autores (De la Duarte y Martins, 1976; Fiorino y Nizzi, 1991; Christopoulou *et al.*, 1996; Aparicio y Luna, 2002; Lerma-García *et al.*, 2011) han descrito la influencia de la variedad en la composición de los esteroides en el aceite de oliva. Sin embargo, existen escasos trabajos que aporten un elevado número de variedades cultivadas en el mismo entorno. Sánchez *et al.* (2004) en trabajos realizados en siete variedades de olivo de Extremadura describió la diferencia de perfil de los esteroides (Figura VII 5.4).

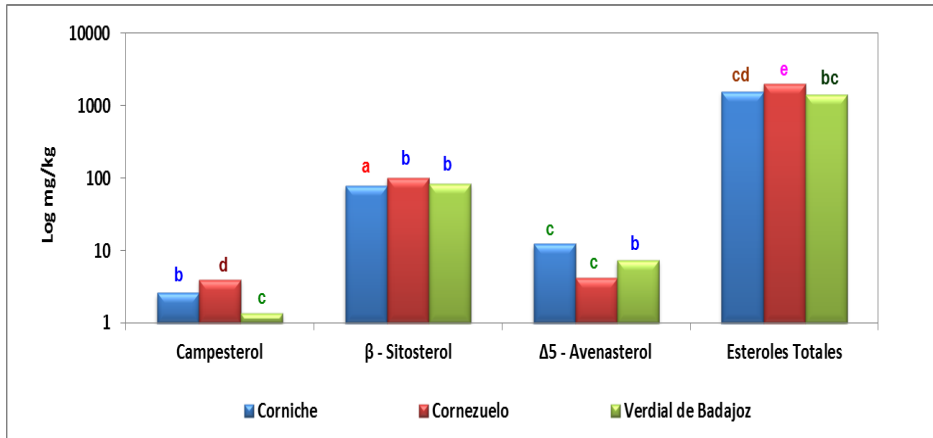


Figura VII.5.4. Concentración de los esteroides principales y totales de aceite de variedades de Extremadura (Sánchez et al., 2004).

VII. 6. Influencia de los factores tecnológicos en la composición de la fracción esteróica del aceite de oliva.

El proceso de la extracción del aceite de oliva empieza con la llegada del fruto a la almazara. La maduración del fruto, el transporte y el proceso tecnológico son factores fundamentales en la calidad del aceite de oliva. Para obtener un aceite en condiciones óptimas es importante seguir los pasos que se han mostrado con el esquema siguiente:

- Operaciones preliminares
 - Recepción del fruto
 - Limpieza y Lavado
 - Pesado
 - Almacenamiento del fruto
- La preparación de la pasta
 - Molienda

- Batido
- La separación de los fases líquida – sólida
 - Prensas
 - La centrifugación de las fases.
 - Sistemas de dos fases
 - Sistemas de tres fases
- La separación de la fase líquida
 - Decantación natural
 - Centrifugación
- Almacenamiento de aceite.

VII. 6.1. Operaciones preliminares

El tiempo de almacenamiento es un factor muy importante, en tiempos prolongados de almacenamiento producen alteraciones espontáneas como la hidrólisis, la actividad enzimática o por la actividad de los micro-organismos (Camera *et al.*, 1978), que afectan negativamente la calidad del aceite de oliva. Para evitar los factores negativos es aconsejable que el tiempo de almacenamiento sea el más corto posible y que las temperaturas en las tolvas sean bajas (García *et al.*, 1996).

Se ha comprobado que durante los almacenamientos prolongados del fruto, con el incremento de la acidez, se ha visto afectada la composición de los esteroides totales en particular el Estigmasterol (Camera *et al.*, 1978; Gutiérrez *et al.*, 2000; García, 2001) (Figura VII 6.1).

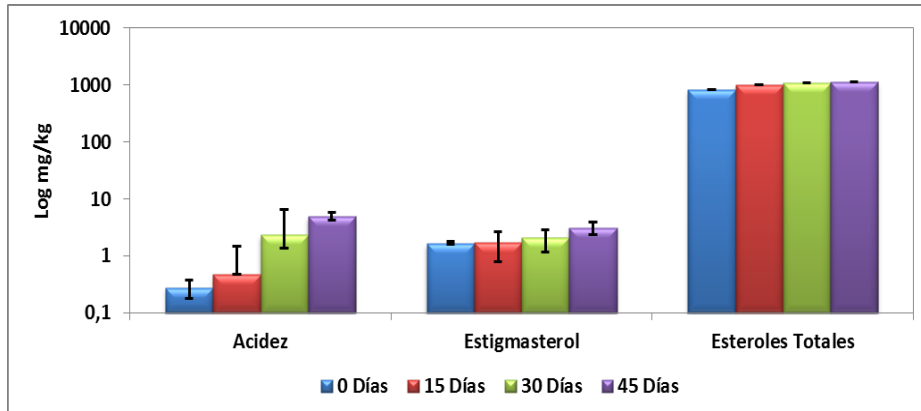


Figura VII.6.1.1. Influencia del tiempo de almacenamiento del fruto en la acidez y el contenido de esteroides totales y Estigmasterol del aceite de oliva (Gutiérrez et al., 2000).

VII. 6.2. La preparación de la pasta

La molienda y el batido de la pasta son dos procesos básicos para la posterior extracción, ya que con ellas se pretende preparar la pasta de aceituna para facilitar su elaboración.

- **Molienda**

El primer paso necesario para obtener el aceite de oliva, cualquiera que sea el método de separación a utilizar, es la molturación de las aceitunas para destruir la estructura de los tejidos vegetales que la forman.

Esta operación tiene por objetivo romper las células y hacer salir las pequeñas gotas de aceite. Las gotas de aceite están rodeadas de una membrana de propiedades anfóteras que tienden a mantener el aceite

en estado de emulsión, emulsión que es tanto más estable cuanto menor es el tamaño de las gotas.

La molienda ocupa en el proceso de extracción de aceite un lugar de gran importancia, ya tiene una influencia directa sobre las restantes operaciones de elaboración y principalmente, sobre el rendimiento y la calidad del aceite.

Los equipos empleados hoy en día para triturar las aceitunas son, básicamente, de dos tipos: molinos de muelas y triturador mecánico de martillos. Los molinos de muela es el sistema de molturación más antiguo, aunque, en realidad el sistema más empleado es el molino mecánico.

La molienda del fruto juega un papel muy importante en la cantidad final de los compuestos mayoritarios y minoritarios en el aceite. Existen muy pocos estudios sobre la influencia de molturación en el contenido de los esteroides. Christopoulou *et al.* (1996) en su trabajo indica que diferentes tipos de molinos no influyeron en el contenido de los esteroides.

- **Batido**

El batido tiene como función principal favorecer la unión de las gotas de grasa, formando una capa de aceite continua que facilite la siguiente etapa de separación sólido-líquido.

El batido completa el efecto de cizallamiento de las partes insuficientemente tratadas en la molienda y reúne las gotas de aceite dispersas en la pasta molida. Este proceso debe llevarse a cabo de forma que permita el mayor contacto posible entre las gotas de aceite, sin provocar emulsiones que luego dificultan el proceso de extracción.

En la operación del batido existen una serie de variables que pueden ser reguladas: tiempo de batido, temperatura y adición de coadyuvantes. El único coadyuvante tecnológico autorizado es el micro talco natural para él que se recomienden unas dosis entre 0.5 – 2% (Uceda *et al.*, 2006).

Koutsaftakis *et al.* (1999) propuso que para obtener un aceite de calidad es mejor utilizar temperaturas de batido por debajo de 30 °C, obteniendo un ratio de Campesterol/Estigmasterol muy alto. Los esteroides que más se afectan por la aplicación de temperaturas de batido de 45 °C son Estigmasterol y Δ^5 -Avenasterol, siendo los valores de Estigmasterol más altos, y el Δ^5 -Avenasterol ligeramente más bajos (Koutsaftakis *et al.*, 1999). La Figura VII 6.2. muestra la influencia de la temperatura de batido en el contenido de dos esteroides.

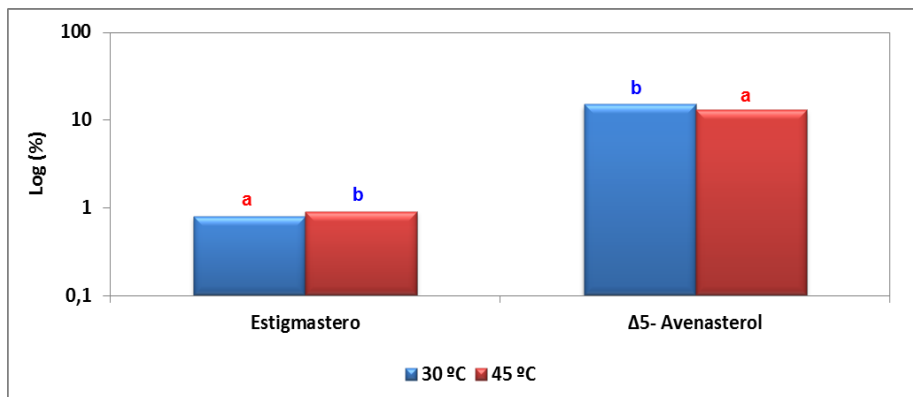


Figura VII.6.2.1. Influencia de diferentes temperaturas de batido en el contenido de Estigmasterol y Δ^5 -Avenasterol del aceite de oliva (Koutsaftakis et al., 1999).

Los trabajos realizados por Guillaume et al. (2012) han demostrado que el tiempo de batido presenta una influencia significativa en el contenido de los esteroides en el aceite de oliva. Según este trabajo Estigmasterol y Δ^7 – Estigmasterol aumentan su concentración en tiempos de batido largos (Figura VII 6.2.2). No obstante, no existen datos sobre la influencia de la adición de coadyuvantes en el contenido de los esteroides del aceite de oliva.

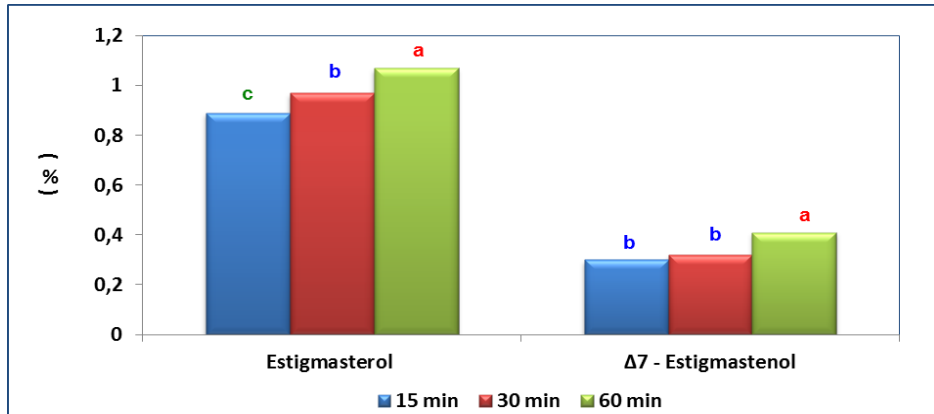


Figura VII.6.2.2. Influencia de diferentes tiempos de batido en el contenido de Estigmasterol y Δ^7 -Estigmasterol (Guillaume et al., 2012).

VII. 6.3. Separación de la fase sólida– líquida

Esta etapa constituye la parte fundamental del proceso de obtención del aceite y está basada en la separación de los líquidos contenidos en la pasta de aceitunas. Se puede realizar por diferentes sistemas: filtración selectiva, extracción por presión y extracción por centrifugación de pasta, en tres o dos fases (Civantos et al., 1992).

La centrifugación de la pasta; Se puede considerar como el procedimiento moderno de realizar la separación sólido–líquido mediante la utilización de la fuerza centrífuga. Se lleva a cabo en equipos que funcionan en “fase dinámica”, es decir donde los sólidos se van desplazando a lo largo del eje de giro y se descargan continuamente. Este sistema actualmente es el más utilizado en la extracción de aceite de oliva en continuo.

Diferentes autores han mostrado que el contenido en esteroides del aceite está afectado por los sistemas de extracción. Si bien sus conclusiones son contradictorias en relación con el contenido de esteroides.

Koutsafakis et al. (1999) en sus estudios, observan que Campesterol, Estigmasterol, β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol y Δ^7 -Avenasterol presentan valores más altos en sistemas de centrifugación respecto a las prensas. Sin embargo, Salvador et al. (2003), presentan contenidos más altos en Estigmasterol en sistemas de tres fases, mientras, que los contenidos en Δ^5 -Avenasterol, $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol y el β -Sitosterol estimado presentan valores más altos en sistemas de prensa (Figura VII.6.3).

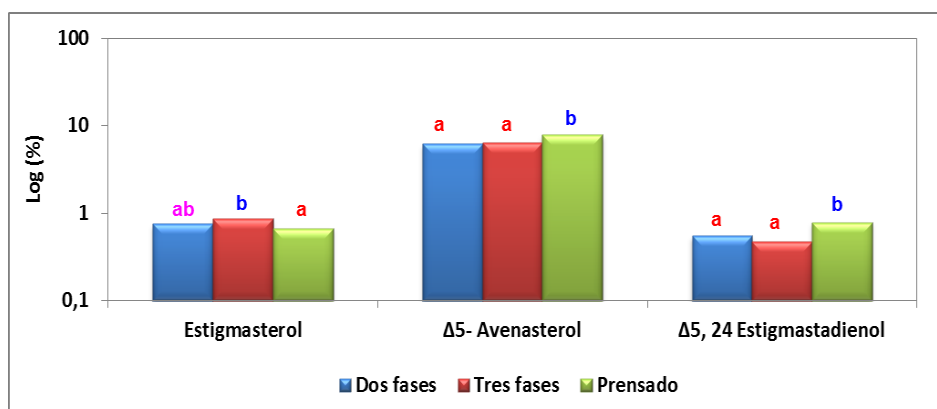


Figura VII.6.3.1. Influencia de diferentes tipos de extracción en el contenido de esteroides en el aceite de oliva Salvador et al. (2003).

Ranalli y Angerosa, (1996), estudiaron como influyen los sistemas continuos de dos y tres fases en el ratio de Campesterol/Estigmasterol, observando que el sistema de tres fases produce aceites con valores más altos de este ratio.

VII. 6.4. Separación de la fase líquida

Los aceites obtenidos por la separación de la fase sólida/líquida arrastran impurezas como agua o partes sólidas, que es necesario eliminar.

Para la separación de las impurezas que se encuentran en el aceite se utilizan dos sistemas: la decantación natural y las centrifugas verticales, basadas ambas en las diferencias de la densidad.

La decantación natural había quedado en el desuso por la falta de espacio y por el número considerable de depósitos necesario en la almazara pero también, al permanecer el aceite durante el largo tiempo en contacto con la fase acuosa, se producían fermentaciones o alteraciones que afectan la calidad del producto final. Por estas razones se pasó emplear más las centrifugas vertical ofreciendo un trabajo de forma continua y rápida. Sin embargo, de forma reciente se ha vuelto a utilizar esta tecnología aunque se desconoce cualquier efecto sobre la fracción esterólica del aceite.

La centrifugación de la pasta de aceituna es la operación básica más compleja, y donde se han producido últimamente mayores cambios tecnológicos esta operación de separación se produce en el decantador centrífugo horizontal o decanter.

En la actualidad, el proceso de extracción del aceite de oliva virgen llevado a cabo en una almazara se realiza mediante el sistema continuo de centrifugación en dos o tres fases. Un decantador centrífugo consta de un recipiente cilíndrico, que en general se coloca horizontalmente, y que gira alrededor de un eje a gran velocidad.

No existen trabajos que demuestren el efecto de la fase de la decantación o/y clarificación en el contenido de esteroides del aceite de oliva.

VII. 6.5. Almacenamiento del aceite

El almacén o bodega es el lugar donde el aceite va a permanecer hasta su comercialización. Las características que debe reunir una buena bodega son las siguientes:

Las paredes y techos deben ser aislantes de las temperaturas y no aportar olores extraños, debe disponer de un sistema de calefacción que no desprenda olores y mantenga una temperatura uniforme, alrededor de 15–18 °C, que permita una maduración de los aceites, sin favorecer la oxidación, de poca luminosidad y que fácilmente la limpieza. El material de construcción de los depósitos debe ser inerte, el más utilizado es el acero inoxidable.

Los depósitos no deben tener en general un tamaño superior a 50 Tm. para poder realizar una diferenciación de calidades. Deben tener el

fondo cónico para realizar un buen sangrado, ya que los aceites pasan a la bodega con cierta humedad e impurezas, estas precipitan, fermentan y aportan a los aceites olores y sabores anómalos.

VII.7. La calidad de aceite de Oliva.

El aceite virgen de oliva es el zumo o jugo oleoso, extraído mecánicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.), por procesos de molturación, batido y centrifugación, permitiendo conservar valiosos compuestos polifenólicos, que le otorgan un gran valor alimenticio, medicinal, cosmético, además de un agradable gusto y aroma (COI, 1991).

La calidad de un aceite de oliva se puede definir como el conjunto de propiedades o atributos propios del aceite, los cuales determinan el grado de calidad que tiene (Burón y García Teresa, 1979).

Actualmente, ante la necesidad de abrir nuevos mercados para los productos y debido a la cada vez mayor presión por parte de los consumidores en su demanda de "productos de calidad", se impone la necesidad de obtener aceites de oliva vírgenes con dicha cualidad, bien evaluada y conservada hasta su consumo.

La evaluación de la calidad de los aceites de oliva vírgenes se ha realizado, tradicionalmente, a través de índices analíticos más

relacionados con su grado de posible alteración que con sus cualidades positivas intrínsecas. Las limitaciones impuestas por la legislación vigente son de gran utilidad para facilitar su comercialización pero, en muchos casos, no tienen en cuenta sus especiales características, que lo hacen preferible para el consumo frente a otras grasas comestibles.

Existen distintas concepciones de calidad según el uso del aceite de oliva, estableciendo en primer lugar que la calidad no es única y encontrándonos con diferentes ópticas, desde *la reglamentada*, que sería aquella que se define por las normas establecidas, pasando por la *nutricional, comercial, sensorial, etc.*

Calidad reglamentada se define como la calidad establecida en el reglamento CE n.º 2568/91 modificado por el CE n.º 1989/03 de 6 de noviembre de 2003. En la Tabla VII 8.1, se establece los límites establecidos para el contenido de los esteroides en aceite de oliva.

Se entiende por el *aceite de oliva virgen* el obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos en condiciones, sobre todo térmicas, que no implique la alteración del aceite y no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, decantación, el centrifugado y la filtración, con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolventes o por procedimientos de reesterificación, y toda mezcla con aceites de otra naturaleza.

Aceite de Oliva Virgen Extra: Debe considerarse el mejor de los aceites de oliva. Tiene características sensoriales que reproducen los olores y sabores del fruto del que proceden, la aceituna. Es el zumo de la aceituna recolectada en su mejor momento de madurez y procesada adecuadamente.

Tiene todos los elementos de interés nutricional al no haber sido sometido a ningún proceso de refinado. En función de una multitud de matices que presentan los aceites de oliva virgen extra y que dependen de distintos factores desde la variedad al medio del cultivo, pueden obtenerse tipos diferenciados adecuados al gusto de los consumidores.

Aceite de oliva virgen. Es el aceite de oliva que puede presentar ligeras alteraciones, bien sea en sus índices analíticos o en sus características sensoriales, pero siempre en pequeña escala. Estas alteraciones, sobre todo sensoriales, pueden ser prácticamente imperceptibles, pero deprecian la calidad en relación al virgen extra.

Aceite de oliva lampante. Es el peor de los aceites vírgenes. Presenta serias alteraciones en sus índices físicos – químicos o/y sensoriales. Este aceite no puede consumirse tal como se produce y necesariamente ha de someterse a un proceso de refinado para rectificar sus defectos y hacerlo comestible, dando lugar al *aceite de oliva refinado*, que presenta unas características sensoriales prácticamente neutras, sin sabor ni olor y que sirve de base para la composición de otros aceites.

Aceite de oliva. Responde esta nueva denominación a la antigua aceite puro de oliva y es otro de los aceites que se encuentra envasados en el mercado, siendo el que tiene actualmente la mayor cuota de mercado. Se trata de un aceite integrado por Aceite de Oliva Refinado y Aceite de Oliva Virgen en proporciones variables según el tipo de aceite que se pretenda obtener. Fruto de la elaboración de aceite de oliva, en la almazara se obtiene un subproducto graso, el orujo. Este subproducto es aprovechado por la industria extractora para obtener, mediante disolventes orgánicos, *el aceite de orujo de oliva cruda.*

También se puede encontrar *aceite de orujo de oliva crudo* obteniendo por procedimientos mecánicos. Este aceite posee unas características que no lo hacen apto para el consumo directo, por lo que se someten a un proceso de refinado para obtener el *aceite de orujo de oliva refinado.* Mejorándolo con aceite de oliva virgen, da lugar a un nuevo aceite que está presente en el mercado y que se denomina *aceite de orujo de oliva.*

En los últimos años, se aprecian cada vez más las características organolépticas, nutricionales y ocultas de los aceites de oliva y que exigen que las mismas se conserven hasta el momento de su consumo, está contribuyendo a la necesidad de buscar nuevos criterios para la definición y estudio de la "calidad de los aceites de oliva vírgenes".

Entre los distintos componentes apreciables y/o característicos de estos aceites, se puede destacar a los siguientes:

- Presencia de componentes de significación sensorial que le comunican características organolépticas de inapreciable valor en ausencia de defectos. (Flath *et al.*, 1973; Montedoro *et al.*, 1978; Barrio *et al.*, 1983).
- Elevados contenidos en vitaminas liposolubles, α -tocoferol y en β - caroteno, de gran importancia nutricional. Christakis *et al.* (1982).
- Presencia de compuestos polares hidrosolubles, protectores de los aceites ante la autooxidación durante su periodo de conservación (Vazquez Roncero *et al.*, 1975; Montedoro *et al.*, 1978; Graciani Constante y Vazques Roncero, 1981).
- El perfil de esteroides, sus niveles no pueden superar a los establecidos por el Reglamento de la Comunidad Europea. (Sims, 1972).
- Entre los parámetros que definen la calidad del aceite de oliva en diferentes categorías se encuentran el contenido y la composición de esteroides. La Tabla VII 7.1 demuestra los límites permitidos para el perfil de los esteroides más importantes en aceite de oliva.

Tabla. VII 7.1 Composición de los esteroides en el aceite de oliva. Reglamento CE n.º 1989/03

Aceite de oliva	Colesterol (%)	Brasicaterol (%)	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	β -Sitosterol* (%)	Δ^7 -Estimasterol (%)	Esteroides Totales (mg/kg)
Virgen Extra	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4.0	< Camp **	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000
Virgen	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4.0	< Camp	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000
Lampante	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4.0	< Camp	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000
Refinado	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4.0	< Camp	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000
Refinado+Virgen	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4.0	< Camp	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000
Orujo Crudo	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4.0	< Camp	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000
Orujo Refinado	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4.0	< Camp	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000
Orujo	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4.0	< Camp	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000

* Suma de $\Delta^5,23$ -Estigmastadienol + Clerosterol + β -Sitosterol + Sitostanol + Δ^5 -Avenasterol + $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol, ** Campesterol

La calidad culinaria está ligada con el uso del aceite tanto en crudo como en la fritura. La utilización del aceite en crudo está relacionada con los caracteres sensoriales. Para caracterizar organolépticamente un aceite de oliva virgen existe el método de *Panel test* (COI, 1987), que permite realizar objetivamente un perfil con los atributos del aceite.

VII. 8. La adulteración de aceite de Oliva

El aceite de oliva es el único de su género por las características de composición, de su delicadeza en aroma, la estabilidad y los beneficios en la salud (Boskou, 1996).

El alto precio en el mercado y los conocidos beneficios para la salud atribuidos al aceite de oliva (Visioli y Galli, 1998), hacen de este producto un objetivo de diferentes tipos de fraudes como las adulteraciones por mezcla con otros aceites de distinta procedencia. Esto es especialmente importante para el aceite de oliva virgen extra que en los mercados internacionales alcanza precios mucho más altos que cualquier otro tipo de aceite vegetal.

Existen en la bibliografía diferentes pruebas físicas, químicas, cromatográficas y espectrofotométricas que permiten detectar pequeñas adiciones en el aceite de oliva virgen extra de aceite de oliva de baja calidad (Blanch *et al.*, 1998; Ruiz del Castillo *et al.*, 1998), aceite de avellana (Ruiz del Castillo *et al.*, 1998) y aceites de semillas (Amr y Abu al Rub, 1993; Favier *et al.*, 1998).

Los análisis de perfil de los esteroides, en realidad permiten detectar la adulteración del aceite de oliva con otros aceites vegetales y sobre todo, con aceites que presentan alto contenido en ácido oleico.

El valor mínimo que está permitido por los organismos oficiales para el contenido de esteroides totales en los aceites de oliva virgen es de 1000 mg/kg. Además, se emplean el porcentaje de β -Sitosterol y Δ^7 -Estigmasterol, aceite de oliva presenta un porcentaje de β -Sitosterol superior al 90% y un porcentaje de Δ^7 -Estigmasterol que no supera el 0.5%. La importancia en la detección de fraudes de aceite de oliva a través de perfil de los esteroides se observa en la Tabla VII. 8.1.

Tabla VII.8.1. El perfil de los esteroides de algunos aceites vegetales y el aceite de oliva según los límites establecidos

Aceites	Esteroides Totales (mg/kg)	Campesterol (mg/kg)	Estigmasterol (mg/kg)	β -Sitosterol (mg/kg)	Δ^7 -Estigmastanol (mg/kg)
Girasol (Alto en Ac.Oleico)	3563	7.4	9.5	61.8	14.7
Girasol desesterilizado	506	5.5	9.7	74.5	15.5
(Alto en Ac. Oleico)	506	5.5	9.7	74.5	15.5
Avellanas	1443	4.2	0.9	92	2.9
Almendras	2762	2.8	0.8	94.8	0.7
Aceite de Oliva	> 1000	> 4.0	< Camp.	\geq 93.0	M 0.5

Fuente: Giglioti et al., 1993

VII. 9. Efectos bioactivos de los esteroleos.

VII. 9.1. Efectos de los esteroleos sobre la disminuci3n del colesterol en LDLs

La inhibici3n de la absorci3n de colesterol produce una relativa deficiencia de colesterol, en respuesta a la cual se produce un incremento en la s3ntesis end3gena que no llega a compensar el descenso de colesterol producido al inhibirse su absorci3n. Lo mismo ocurre con la s3ntesis del receptor de las LDL-s de la circulaci3n, que tambi3n aumenta (Gylling y Miettinen, 1994; Plat y Mensink, 2002). Este hecho incrementa la eliminaci3n de las LDL y tambi3n de las IDL de la circulaci3n, y dado que 3stas son las precursoras de las LDL, de esta manera desciende adem3s su producci3n (Gylling *et al.*, 1999), sin verse afectadas las concentraciones de triacilglic3ridos ni de colesterol HDL (Hendriks *et al.*, 1999). Tras la ingesti3n de esteroleos vegetales disminuyen, por tanto, las concentraciones de colesterol LDL, pero tambi3n la de colesterol total debido a la menor absorci3n, y pese al incremento compensatorio en su s3ntesis (Ling y Jones, 1995a; Ling y Jones, 1995b; Gylling *et al.*, 1997; Howell *et al.*, 1998), incluso en individuos que ya ingieren bajas cantidades de colesterol en la dieta (Hallikainen y Uusitupa, 1999; Maki *et al.*, 2001). Este efecto se observa tanto con esteroleos vegetales libres como esterificados (Jones *et al.*, 2000).

Los primeros estudios con esteroleos vegetales utilizaron preparaciones poco liposolubles a3adidas a los alimentos, por los que efectos fueron muy limitados o incluso nulos en algunos casos (Ahrens *et al.*, 1957; Lees *et al.*, 1977; Denke, 1995). Otros estudios de los a3os 70

demonstraron que la esterificación de esteroides vegetales con ácidos grasos de cadena larga aumenta su solubilidad en medio lipófilo lo que, en la práctica, posibilita su uso más efectivo en los alimentos ricos en grasa (Mattson *et al.*, 1977; Mattson *et al.*, 1982; Vanhanen *et al.*, 1993). En los años 80, las ventajas del uso de los ésteres de esteroides vegetales en el enriquecimiento de los alimentos eran ya reconocidos de modo general. Las margarinas y la mantequilla aparecieron como vehículos ideales debido a su naturaleza fuertemente lipofílica. La esterificación de esteroides vegetales con los ácidos grasos de cadena larga aumenta cerca de diez veces su liposolubilidad y permite el suministro de varios gramos diarios en alimentos grasos tales como lo que conocemos como margarinas. En la actualidad, los esteroides vegetales libres o combinaciones con ésteres de esteroides vegetales se aplican a otros alimentos de menor contenido graso.

Al usar esteroides solubilizados de manera correcta, y dependiendo de la matriz en que se encuentren, las concentraciones de colesterol LDL descienden de manera coherente en los estudios clínicos. Por ejemplo, una ingesta diaria de esteroides de 2-2,5 g produce la menor tasa de absorción de colesterol (pese a una mayor tasa de síntesis endógena) y la expresión más elevada del receptor LDL, lo que da como resultado, en conjunto, un descenso del colesterol LDL de un 14% (Mensink y Plat, 1998), mientras que dosis mayores no se asocian a un efecto superior (Hallikainen *et al.*, 2000). Es interesante destacar que el efecto reductor de las LDL es el mismo tanto si se ingiere una determinada cantidad de esteroides dos a tres veces al día como si se ingiere de una sola vez (Plat *et al.*, 2000; Berger *et al.*, 2004).

Siguiendo con el metabolismo lipídico, el colesterol se excreta de nuestro organismo principalmente como colesterol no esterificado en la

bilis. Hasta el momento no hay datos concluyentes en cuanto al efecto de los esteroides sobre el metabolismo biliar, aunque algunos estudios sugieren que producen un incremento en la excreción de ácidos biliares, mientras que en otros no se halla ningún efecto (De Jong *et al.*, 2003).

VII.9.2. Efectos de los esteroides vegetales sobre aterosclerosis

Las concentraciones elevadas de colesterol LDL son un conocido factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis (Kiechl y Willeit, 1999), por lo que el descenso en ellos que produce la ingesta de esteroides podría asociarse a una disminución en el riesgo de padecer dicha enfermedad. En roedores sí que se ha observado un descenso en la formación de la placa aterosclerótica tras la ingestión de esteroides en la dieta (Moghadasian *et al.*, 1997; Moghadasian, 1999).

Respecto al posible uso de esteroides para prevenir la enfermedad cardiovascular resulta interesante la posibilidad de combinar la ingesta de esteroides con una terapia química con estatinas, ya que estaríamos combinando el efecto de ambos: los esteroides disminuyendo la absorción e incrementando la eliminación de colesterol y las estatinas reduciendo la biosíntesis de colesterol (Blair *et al.*, 2000).

Estudios *in vitro* sugieren que los esteroides podrían afectar a la formación de la placa aterosclerótica por otros mecanismos. Así, se ha observado un retraso en el crecimiento y la proliferación de las células musculares lisas (que es importante en los primeros estadios de

formación de la placa) en presencia de Sitosterol y Campesterol (Awad *et al.*, 2001).

VII.9.3. Otros efectos biológicos de los esteroides

Además de las acciones sobre el metabolismo lipídico y lipoproteico, los esteroides afectan a otros procesos metabólicos. El efecto sobre la absorción de vitaminas antioxidantes es quizás el principal “problema” de la ingesta de esteroides. Sin embargo, la revisión de algunas publicaciones puede ayudar a remarcar que es posible esperar otros efectos biológicos importantes de estos compuestos.

VII.9.3.1. Efectos sobre el cáncer

En los últimos años existe un gran interés por el posible papel de los esteroides en el cáncer, ya que estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que podrían ofrecer una protección frente a los tipos más comunes en las sociedades occidentales, como el de colon, mama y próstata (Nair *et al.*, 1984; Kennedy, 1995; Awad y Fink, 2000; De Jong *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2004). Este efecto protector se basaría en una serie de mecanismos que incluyen efectos sobre la estructura y función de la membrana en las células tumorales y del huésped, vías de transducción de señales que regulan el crecimiento del tumor y apoptosis, función inmunitaria del huésped, y metabolismo del colesterol en el huésped (Awad y Fink, 2000). Por ejemplo, en el caso del cáncer de colon se ha observado in vivo en roedores que los esteroides son capaces de reducir su incidencia si está inducido

químicamente (Raicht *et al.*, 1980), e in vitro pueden inhibir el crecimiento de células cancerígenas humanas (Awad *et al.*, 1996), así como de colonocitos transformados de roedores (Janezic y Rao, 1992; Awad *et al.*, 1997). Pero también hay datos diferentes, como un estudio prospectivo de cohortes en humanos que no indicó relación alguna entre la ingesta de esteroides y el riesgo de padecer cáncer de colon (Normen *et al.*, 2001; De Jong *et al.*, 2003). Por otra parte, la hiperplasia prostática (que es benigna y no conduce a cáncer de próstata) se trata clínicamente en Europa con productos que contienen Sitosterol (Berges *et al.*, 1995), ya que aunque no se observa ninguna reducción relevante en el volumen prostático, existen algunas evidencias experimentales que muestran una mejora sintomática (como un aumento en el flujo urinario y un menor volumen urinario residual) en pacientes tratados (Berges *et al.*, 1995; Klippel *et al.*, 1997). Estos resultados son destacables, ya que la cantidad de Sitosterol que se suministra como suplemento en estos estudios es muy baja (unos 60 mg/día) respecto a la ingesta diaria normal de β -Sitosterol (unos 160 mg) (De Jong *et al.*, 2003).

VII. 9.3.2. Efectos sobre las propiedades de membrana

El hecho de que los esteroides sean incorporados a las membranas celulares (Child y Kuksis, 1982; Ratnayake *et al.*, 2000) hace pensar que puedan afectar a sus propiedades.

Aunque hay datos que no indican efecto del β -Sitosterol sobre la fluidez de la membrana de queratocitos humanos (Mora *et al.*, 1999), se ha demostrado un efecto deletéreo en las membranas de los

glóbulos rojos de ratas hipertensas debido a un incremento en la incorporación de esteroides (Ratnayake *et al.*, 2000). Este hecho se asoció a una menor esperanza de vida en estos animales, probablemente porque los esteroides reemplazaron al colesterol en las membranas de los eritrocitos, por lo que serían menos deformables (Ratnayake *et al.*, 2000) y más frágiles (Bruckdorfer, *et al.*, 1969). Es difícil predecir hasta qué punto los resultados de los esteroides vegetales sobre la deformación de los glóbulos rojos de rata puede extrapolarse a los humanos (De Jong *et al.*, 2003).

VII. 9.3.3. La actividad antioxidante de los esteroides

Otro posible efecto de los esteroides en el organismo es su actividad antioxidante (Wang *et al.*, 2002). Se ha comprobado que el extracto metanólico de aceite de soja, que muestra un fuerte efecto protector contra el daño del ADN en células endoteliales humanas, además de tocoferoles y ácidos grasos n-3 poliinsaturados (PUFA) contiene también fitoesteroides. Los resultados indican que la actividad antioxidante del aceite de soja puede ser, en parte, relacionada con el contenido de esteroides. Por otra parte, en condiciones *in vitro*, β -Sitosterol ayudó a disminuir la oxidación lipídica de las membranas de las plaquetas en presencia de hierro (Van Rensburg *et al.*, 2000; Farhoosh *et al.*, 2011).

Los autores sugieren que la ingesta de esteroides puede proteger a las partículas LDL de la oxidación. Así, con base en los resultados de los estudios *in vitro* y estudios en humanos, existe la posibilidad de que los esteroides puedan poseer propiedades antioxidantes. La protección

antioxidante podría beneficiar también a la aterosclerosis (Loscalzo, 2003) y el cáncer (Quong *et al.*, 2002).

VII. 9.3.4. Efectos sobre el sistema inmunitario

Los efectos de los esteroides sobre la función inmunitaria no se han estudiado con detalle, pero algunas evidencias en humanos sugieren que podrían tener un efecto positivo sobre la respuesta inflamatoria y sobre el estado inmunológico en general (Bouic *et al.*, 1999), aunque existen datos en roedores que indican lo contrario (Leikin y Brenner, 1989).

RESULTADOS

***VIII.1. Capítulo I. Variabilidad intraespecífica de la
composición y contenido total de la fracción de
esteroles del aceite de oliva virgen***

Resumen

En este trabajo se ha estudiado el perfil de esteroides del aceite de oliva virgen de 43 variedades de olivo procedentes del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba. Los esteroides mayoritarios presentes en el aceite de oliva son: β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol, que muestran una gran variabilidad entre los aceites analizados. La mayoría de las variedades analizadas en este trabajo presentaron contenidos en esteroides totales de sus aceites comprendidos dentro de los límites establecidos por el Reglamento CEE, (1991). El contenido total de esteroides de los aceites de las variedades estudiadas osciló entre 855–2185 mg/kg. A la vista de los resultados se observa una gran variabilidad debido al componente genético, obteniéndose para algunos esteroides individuales contenidos fuera de los límites establecidos en la reglamentación vigente.

La variabilidad observada para la fracción esteróica del aceite se estudió mediante análisis de componentes principales y de cluster. De los resultados se puede concluir que el perfil de los esteroides se puede considerar como una herramienta de gran utilidad para caracterizar y discriminar los aceites de oliva monovarietales.

Introducción.

El aceite de oliva es uno de los aceites más antiguos entre los aceites vegetales, es el zumo del fruto de la aceituna, y presenta excelentes propiedades nutricionales, sensoriales y funcionales (Matos et al., 2007).

Los efectos beneficiosos del aceite de oliva en la salud están relacionados con su composición en ácidos grasos y la presencia de componentes minoritarios tales como el escualeno, esteroides, y de antioxidantes naturales como polifenoles y tocoferoles (Owen et al., 2000a; Owen et al., 2000b).

El aceite de oliva está constituido fundamentalmente por triglicéridos, alrededor de un 98%, mientras que el 1–2% restante lo forman un conjunto de sustancias denominado componentes minoritarios. Una parte importante de esta fracción está constituida por los esteroides, que son derivados del escualeno. Su estructura es muy parecida al colesterol aunque cada esteroide se caracteriza por tener un doble enlace en carbono 5 (Rozner y Garti, 2006). Basado en su estructura química, los esteroides, se dividen en dos subgrupos: “esteroides” que se caracterizan en presentar un doble enlace en el carbono 5 y los “estanoles” o esteroides saturados, que se caracterizan por la falta de este doble enlace en su estructura (Katan et al., 2003).

En los últimos años la fracción esteróica ha recibido una atención particular por sus propiedades bioactivas en la salud humana, como son

sus efectos antiinflamatorio (Bouic, 2002), antibacteriano (Gregg, 2001), anticancerígeno (Awad et al., 2000), así como, por su capacidad para reducir los niveles del colesterol en LDLs (Kritchevsky y Chen, 2005).

Además, el perfil de esteroides es una herramienta importante en la detección de adulteraciones del aceite de oliva con otros tipos de grasas. Por esta razón, el Reglamento de Unión Europea ha establecido límites para el contenido de cada esteroide presente en el aceite de oliva y el aceite de orujo (CEE, 2003).

En el aceite de oliva los esteroides oscilan entre 800 y 2600 mg/kg, predominando el β -Sitosterol (75–90%), Δ^5 -Avenasterol (5–36%) y Campesterol (3%) (Boskou, 1996). El contenido de la fracción esteroídica en el aceite de oliva está influenciado por diferentes factores: agronómicos, las condiciones climáticas (El Antari et al., 2002; Stefanoudaki et al., 2001; Aparicio et al., 1994), la variedad (Fiorini y Nizzi, 1991; Lerma-García et al., 2011), la maduración del fruto (De la Torre et al., 1985; Koutsaftakis et al., 2000), y tecnológicos como las condiciones de extracción del aceite y almacenamiento (Christopoulou et al., 1996; Ranalli y Angerosa 1996; Koutsaftakis et al., 1999).

Sin embargo, no existen trabajos sobre variabilidad genética asociada a estos componentes del aceite de oliva. Por tanto, el objetivo de este trabajo es el estudio del contenido y composición en esteroides de los aceites de 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.

Material y Métodos

a) Material vegetal y condiciones de cultivo

Para la realización de este trabajo se han seleccionado 43 variedades de olivo (*Olea europea* L) cultivadas en la Colección del Banco de Germoplasma Mundial de Olivo de Córdoba. La Tabla VIII 1.1 presenta las variedades seleccionadas y el país de origen.

Tabla VIII 1.1. Área de origen de las 43 variedades de olivo analizadas del Banco de Germoplasma Mundial de Olivo de Córdoba

Variedades	Origen
'Amigdalolia Nana'	Grecia
'Arbequina'	España
'Arroniz'	España
'Beyaz Yagl'	Turquía
'Blanqueta'	España
'Callosina'	España
'Chetoi'	Túnez
'Cipresino'	Italia
'Cornicabra'	España
'Crnica'	Croacia
'Dolce Agogia'	Italia
'Frantoio'	Italia
'Galega Vulgar'	España
'Kalinjot'	Albania
'Kelb-el Ter 145'	Siria
'Kerkiras'	Grecia
'Khashabi'	Siria
'Kotruvs'	Albania
'Lastovka'	Croacia
'Lechin de Granada'	España
'Levantinka'	Croacia
'Manzanilla'	España
'Megaritiki'	Grecia
'Meski'	Túnez
'Mision de San Vicente'	USA
'Mixani'	Albania
'Moraiole'	Italia
'Morrut'	España
'Nevado Azul'	España
'Pajarero'	España
'Plementa Bjelica'	Croacia
'Picholine Marocaine'	Marrueco
'Pendolino'	Italia
'Palomar'	España
'Racimal'	España
'Razzola'	Italia
'San Sun Tuzcamalik'	Turquía
'Sevillenca'	España
'Salonenque'	Francia
'St. George Greys'	USA
'Ulliri i Kuq'	Albania
'Zalmati'	Túnez
'Zarza'	España

Los árboles cultivados en el IFAPA, Centro Alameda del Obispo de Córdoba, de 20 años de edad, están dispuestos a un marco de plantación de 7 × 7 m, sobre un suelo de tipo inceptisol de origen fluvial, desarrollado sobre terrazas del Guadalquivir. Su textura es franca y presenta una profundidad media entre 80 y 100 cm. En la Tabla VII 1.2 se recoge la composición media de estos suelos.

Tabla VIII 1.2. Composición del suelo del Banco de Germoplasma Mundial de Olivo de Córdoba

Parámetro	<i>Valor</i>
Arena (USDA) %	7
Limo (USDA) %	45
Arcilla (USDA) %	48
Clasificación	Franca
pH en agua	8.4
Materia Orgánica (%)	1.6
Fósforo disp. (Olsen) (ppm)	7
Potasio disp. (AcNH ₄) (ppm)	107
Caliza %	38

Todos los árboles elegidos reciben las mismas prácticas agronómicas: sistema del cultivo en no laboreo, y riego localizado de alta frecuencia, en régimen de riego deficitario.

b) Toma de muestras

La toma de muestras de fruto se ha realizado a la altura del operador en las cuatro orientaciones del árbol y evitando los frutos del interior del mismo (Rodríguez de la Borbolla et al., 1955). De cada variedad, se han seleccionado dos árboles con el índice de cosecha entre 3 y 4.

De cada árbol se han tomado 5 kg de aceituna coincidiendo con un índice de madurez mayoritario en el árbol de 3, basado en el cambio de color, por pigmentación, de la piel del fruto y del mesocarpio a lo largo del proceso de maduración (Uceda y Frías, 1985).

Las muestras, una vez tomadas e identificadas en el campo, se llevaron al laboratorio para realizar la extracción del aceite.

c) Extracción de aceite

Esta operación fue realizada en un período de tiempo inferior a las 24 horas después de la toma de muestras. Se empleó el analizador de rendimientos “Abencor” (Abencor series 100, MC2 Ingeniería y Sistemas, S.L, Sevilla, España) (Martínez *et al.*, 1975). Consta de un molino con diámetro de criba de 5 mm, una termobatidora y una centrífuga vertical.

Una vez molturado el fruto, se homogeneizó la pasta y se introdujo en

contenedores de acero inoxidable de 800 g de capacidad, sometiendo la pasta a un batido de 30 minutos a una temperatura de 28 °C. Durante el proceso de batido no se adicionó agua, así como tampoco microtalco natural micronizado (MTN) como coadyuvante natural.

Tras el batido de la masa, ésta se centrifugó a 3500 rpm durante un minuto, recogándose el mosto oleoso así separado en una probeta. Se dejó decantar para separar el aceite del resto de los componentes de la aceituna y, posteriormente se filtró con papel jarabe. Las muestras recién filtradas se llevaron a congelación a una temperatura de – 24 °C hasta el momento de ser analizadas.

d) Análisis de la fracción esterólica.

La determinación cualitativa y cuantitativa de los esteroides en el aceite de oliva se ha realizado mediante el método de análisis oficial descrito en los anexos V y VI del Reglamento CEE/2568/91.

Para la determinación de este método se pesan 5 gramos de aceite de oliva que se saponifican con una solución de potasa etanólica 2 N. La fracción insaponificable se extrae con éter dietílico por triplicado. Las fracciones se reúnen y se lavan con agua destilada hasta que está presente reacción neutra.

Los restos de humedad, se eliminan con el sulfato sódico anhidro, evaporando el éter hasta sequedad, para completar el secado, la

muestra se deseca en estufa a 100 °C durante 15 minutos. La fracción insaponificable, diluida a 5% en cloroformo, se separó mediante cromatografía de capa fina de placa de gel de sílice. La fracción esterólica se identificó con 2.7- diclorofluoresceína a la luz ultravioleta. Pre disolviéndose en cloroformo (10 mL). El residuo se lavó tres veces con éter dietílico (10 mL), recogiendo el filtrado en el mismo matraz cónico, que se evapora hasta la sequedad con rotavapor y posterior desecando en estufa a 105 °C durante 10 minutos. El matraz se deja enfriar en el desecador y se pesa.

A la fracción de esteroides, se agrega el reactivo de silanización (mezcla de piridina – hexametildisilazano – trimetilclorosilano, Panreac).

La Separación y la cuantificación de la fracción de esteroides se llevó a cabo mediante cromatografía de gases en columna capilar, en un cromatógrafo equipado con un inyector Split/Splittles, detector de ionización de llama (FID) y con una columna TRB-5 de 30 m, diámetro interno de 0,32 mm y espesor de 0,25 mm de película. Las condiciones de separación cromatográfica fueron:

- temperatura de la columna 260 °C
- temperatura del inyector 280 °C
- temperatura del detector 290 °C
- volumen de muestra inyectada 0.5 µL.

La cuantificación se llevó a cabo mediante la adición de un patrón interno (α -colestanol 0.2%). Los resultados se expresan como porcentajes relativos y miligramos α -colestanol por kg de aceite.

d) *Análisis estadístico* Los resultados obtenidos en este trabajo se expresan como el valor medio \pm desviación estándar SD. Se llevó a cabo el análisis de componentes principales y de cluster para la discriminación de las 43 variedades de aceite de oliva según su fracción esterólica mediante el programa Unscrambler (Unscrambler software, versión 9.6).

Resultados

Los esteroides son unos de los componentes más importantes del aceite de oliva virgen, están relacionados con la calidad del aceite, y se utilizan además para controlar la autenticidad del mismo. A la vista de los resultados presentados en la Tabla VIII 1.3 a, expresados como porcentaje, el β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol representan los esteroides mayoritarios del aceite de oliva.

Sin embargo, Colesterol, Brasicasterol, 24-Metilencolesterol, Campestenol, Clerosterol, β -Sitostanol, $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol, Δ^7 -Estigmastanol y Δ^7 -Avenasterol están presentes en cantidades más pequeñas (Tabla VIII 1.3 b).

Tabla VIII 1.3 a. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba

Variedades	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	β – Sitosterol (%)	$\Delta 5$ – Avenasterol (%)	β – Sitosterol Estimado (%)	Esteroles Totales (mg/kg)
'Amigdalolia Nana'	3.30 \pm 0.15 ^a	1.40 \pm 0.30	86.90 \pm 1.90	2.85 \pm 0.25	91 \pm 2.26	1346 \pm 473.7
'Arbequina'	4.00 \pm 0.05	0.93 \pm 0.07	80.30 \pm 1.20	11.10 \pm 1.05	94 \pm 0.08	1430 \pm 32.5
'Arroniz'	3.10 \pm 0.00	1.00 \pm 0.10	87.50 \pm 1.20	5.50 \pm 1.10	94 \pm 0.13	1407 \pm 77.7
'Beyaz Yagl'	3.40 \pm 0.05	0.89 \pm 0.11	78.70 \pm 0.30	10.20 \pm 1.65	92 \pm 1.90	2000 \pm 98.9
'Blanqueta'	3.30 \pm 0.00	0.45 \pm 0.01	82.70 \pm 0.15	10.10 \pm 0.20	95 \pm 0.04	1265 \pm 45.2
'Callosina'	3.10 \pm 0.00	0.39 \pm 0.03	86.40 \pm 0.70	5.90 \pm 0.35	95 \pm 0.04	1922 \pm 81.3
'Chetoi'	2.90 \pm 0.05	1.25 \pm 0.05	83.10 \pm 0.50	8.80 \pm 1.05	94 \pm 0.18	1227 \pm 161.9
'Cipresino'	4.10 \pm 0.05	0.67 \pm 0.02	82.10 \pm 1.30	8.70 \pm 1.50	93 \pm 0.19	1423 \pm 20.5
'Cornicabra'	2.60 \pm 0.10	0.45 \pm 0.01	76.10 \pm 2.05	16.20 \pm 2.15	95 \pm 0.00	1505 \pm 147.7
'Crnica'	4.00 \pm 0.45	0.77 \pm 0.13	87.05 \pm 0.05	3.65 \pm 0.55	94 \pm 0.31	1266 \pm 229.8
'Docle Agogia'	4.20 \pm 0.05	0.57 \pm 0.02	85.20 \pm 0.75	5.05 \pm 1.15	94 \pm 0.09	1690 \pm 209.3
'Frantoio'	3.00 \pm 0.10	0.45 \pm 0.05	86.80 \pm 0.25	6.40 \pm 0.25	95 \pm 0.51	2089 \pm 485.7
'Galega Vulgar'	3.20 \pm 0.05	0.90 \pm 0.05	88.10 \pm 1.20	4.90 \pm 1.00	95 \pm 0.11	1861 \pm 370.5
'Kalinjot'	4.30 \pm 0.00	0.50 \pm 0.20	83.80 \pm 0.05	2.60 \pm 0.00	88 \pm 0.14	1662 \pm 58.6
'Kelb-el Ter 145'	3.50 \pm 0.70	1.40 \pm 0.20	87.80 \pm 1.55	3.70 \pm 0.80	94 \pm 1.20	1249 \pm 287.0
'Kerkiras'	3.60 \pm 0.00	0.40 \pm 0.10	89.35 \pm 0.55	2.75 \pm 0.05	94 \pm 0.98	1857 \pm 299.1
'Khashabi'	3.10 \pm 0.15	1.25 \pm 0.05	79.30 \pm 0.30	11.80 \pm 1.45	93 \pm 1.18	848 \pm 9.8
'Kotruvsi'	3.40 \pm 0.20	1.05 \pm 0.05	85.30 \pm 0.45	6.30 \pm 0.85	93 \pm 0.42	1828 \pm 64.3
'Lastovka'	3.50 \pm 0.15	1.90 \pm 0.25	81.00 \pm 2.60	5.90 \pm 0.50	89 \pm 4.23	1155 \pm 127.9
'Lechin de Granada'	3.70 \pm 0.05	1.10 \pm 0.05	84.90 \pm 0.55	7.30 \pm 0.55	94 \pm 0.14	1873 \pm 71.4
'Levantinka'	3.10 \pm 0.05	0.75 \pm 0.05	82.40 \pm 2.90	11.15 \pm 1.75	95 \pm 1.13	1355 \pm 299.1

a – Media \pm SD

Tabla VIII 1.3 a. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba

Variedades	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	β – Sitosterol (%)	$\Delta 5$ – Avenasterol (%)	β – Sitosterol Estimado (%)	Esteroles Totales (mg/kg)
'Manzanilla'	2.70 ± 0.10	1.20 ± 0.00	88.50 ± 0.40	4.80 ± 0.30	95 ± 0.21	1355 ± 299.1
'Megaritiki'	3.10 ± 0.05	0.27 ± 0.02	84.80 ± 0.35	8.20 ± 0.25	95 ± 0.09	1279 ± 236.1
'Meski'	2.80 ± 0.05	1.00 ± 0.20	75.40 ± 0.75	16.40 ± 1.10	94 ± 0.56	1442 ± 0.70
'Mision San Vicente'	3.20 ± 0.00	1.80 ± 0.10	81.70 ± 0.70	8.50 ± 0.15	91 ± 1.26	1271 ± 356.3
'Mixani'	3.10 ± 0.05	1.50 ± 0.30	78.00 ± 0.60	10.00 ± 0.70	90 ± 2.26	2128 ± 234.7
'Moraíolo'	2.90 ± 0.45	0.95 ± 0.02	85.70 ± 0.30	6.20 ± 0.95	94 ± 1.14	1655 ± 106.7
'Morrut'	5.10 ± 0.05	1.70 ± 0.00	83.10 ± 1.00	6.20 ± 0.45	91 ± 1.42	1519 ± 33.9
'Nevado Azul'	3.00 ± 0.00	1.25 ± 0.05	89.30 ± 0.55	3.90 ± 0.60	95 ± 0.04	1125 ± 60.8
'Pajarero'	2.80 ± 0.05	0.98 ± 0.02	88.40 ± 0.50	5.30 ± 0.50	96 ± 0.04	2000 ± 212.8
'Palomar'	3.10 ± 0.15	1.40 ± 0.05	74.20 ± 1.35	15.40 ± 0.70	92 ± 2.22	20.99 ± 49.4
'Pendolino'	2.50 ± 0.05	0.65 ± 0.15	83.60 ± 2.20	7.40 ± 0.60	93 ± 2.47	1465 ± 598.9
'Picholine Marocaine'	3.10 ± 0.10	0.86 ± 0.05	88.70 ± 0.85	4.70 ± 0.50	95 ± 0.36	1271 ± 106.7
'Plementa Bjelica'	2.80 ± 0.10	1.10 ± 0.00	74.70 ± 1.80	18.50 ± 1.80	95 ± 0.00	2071 ± 118.0
'Racimal'	2.40 ± 0.05	0.90 ± 0.04	85.30 ± 0.40	7.40 ± 0.05	95 ± 0.09	1734 ± 266.5
'Razzola'	4.30 ± 0.00	0.15 ± 0.15	81.90 ± 1.30	7.60 ± 0.50	92 ± 0.91	1728 ± 216.3
'Salonenque'	2.60 ± 0.15	0.59 ± 0.08	86.30 ± 1.30	6.20 ± 1.20	95 ± 0.04	1444 ± 298.4
'San Sun Tuzcamalik'	3.10 ± 0.20	1.55 ± 0.05	81.60 ± 2.00	7.80 ± 1.30	92 ± 0.96	2098 ± 94.7
'Sevillneca'	3.60 ± 0.05	0.48 ± 0.02	84.20 ± 1.20	7.70 ± 1.20	94 ± 0.04	1270 ± 4.90
'St. George Grey'	2.80 ± 0.10	0.54 ± 0.02	88.10 ± 0.50	5.20 ± 0.40	96 ± 0.03	2419 ± 228.4
'Ulliri i Kuq'	3.50 ± 0.20	0.60 ± 0.00	88.40 ± 0.25	5.20 ± 0.40	95 ± 0.07	1817 ± 197.2
'Zalmati'	3.30 ± 0.10	0.44 ± 0.00	83.30 ± 3.60	9.05 ± 3.30	95 ± 0.02	1698 ± 26.8
'Zarza'	2.60 ± 0.00	0.96 ± 0.13	86.00 ± 0.10	6.80 ± 0.20	95 ± 0.08	2378 ± 44.50

a – Media ± SD

Tabla VIII 1.3 b. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba

Variedades	Coolesterol (%)	Brasicasterol (%)	24-Metilencolesterol (%)	Campestenol (%)	Clerosterol (%)	Sitostanol (%)	Δ^5 -24 Estigmastadienol (%)	Δ^7 -Estigmastenol (%)	Δ^7 -Avenasterol (%)
'Amigdalolia Nana'	0.05 ± 0.05 ^a	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.05	1.30 ± 0.10	0.05 ± 0.05	0.20 ± 0.20	0.10 ± 0.10	0.20 ± 0.00
'Arbequina'	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.45 ± 0.07	0.12 ± 0.01	1.10 ± 0.00	0.43 ± 0.08	0.71 ± 0.01	0.19 ± 0.05	0.30 ± 0.02
'Arroniz'	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.80 ± 0.10	0.04 ± 0.04	0.36 ± 0.09	0.24 ± 0.00	0.35 ± 0.02
'Beyaz Yaglı'	0.14 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.11	0.26 ± 0.00	1.10 ± 0.10	0.00 ± 0.00	1.60 ± 0.10	0.59 ± 0.08	0.96 ± 0.09
'Blanqueta'	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.10 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.30 ± 0.04	0.80 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.01
'Callosina'	0.23 ± 0.03	0.02 ± 0.02	0.21 ± 0.04	0.09 ± 0.01	1.10 ± 0.00	0.47 ± 0.14	1.46 ± 0.90	0.21 ± 0.03	0.37 ± 0.00
'Chetoi'	0.24 ± 0.11	0.03 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.12 ± 0.01	1.00 ± 0.05	0.68 ± 0.31	0.81 ± 0.16	0.21 ± 0.02	0.35 ± 0.03
'Cipresino'	0.27 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.16 ± 0.02	1.10 ± 0.05	0.56 ± 0.03	0.79 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.67 ± 0.13
'Cornicabra'	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.13 ± 0.01	1.10 ± 0.00	0.95 ± 0.15	0.70 ± 0.05	0.27 ± 0.01	0.77 ± 0.16
'Crnica'	0.32 ± 0.17	0.07 ± 0.07	0.08 ± 0.02	0.29 ± 0.02	1.05 ± 0.05	2.00 ± 0.40	0.43 ± 0.07	0.25 ± 0.01	0.40 ± 0.01
'Docle Agogia'	0.14 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.21 ± 0.01	1.00 ± 0.00	1.04 ± 0.06	1.23 ± 0.27	0.40 ± 0.01	0.54 ± 0.00
'Frantoio'	0.06 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.90 ± 0.00	0.06 ± 0.03	1.00 ± 0.10	0.25 ± 0.05	0.45 ± 0.05
'Galega Vulgar'	0.11 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.08 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.57 ± 0.13	0.45 ± 0.15	0.19 ± 0.04	0.45 ± 0.02
'Kalinjot'	0.65 ± 0.35	0.02 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.30 ± 0.30	0.95 ± 0.15	0.00 ± 0.00	0.60 ± 0.30	0.25 ± 0.05	0.30 ± 0.00
'Kelb-el Ter 145'	0.17 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.02	1.25 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.56 ± 0.01	0.40 ± 0.04	0.30 ± 0.07
'Kerkiras'	0.30 ± 0.10	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.10	0.20 ± 0.10	1.00 ± 0.10	0.10 ± 0.10	0.50 ± 0.20	0.40 ± 0.20	0.30 ± 0.00
'Khashabi'	0.08 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.04	0.47 ± 0.01	1.10 ± 0.30	0.06 ± 0.06	0.61 ± 0.05	0.15 ± 0.01	0.42 ± 0.02
'Kotruvsi'	0.15 ± 0.05	0.05 ± 0.05	0.02 ± 0.02	0.10 ± 0.10	0.80 ± 0.20	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.10	0.20 ± 0.00	0.30 ± 0.00
'Lastovka'	0.20 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.10	1.05 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.75 ± 0.15	0.40 ± 0.30	0.25 ± 0.05
'Lechin de Granada'	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.08 ± 0.00	1.10 ± 0.05	0.22 ± 0.02	0.59 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.29 ± 0.00
'Levantinka'	0.13 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.30 ± 0.00	1.20 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.30 ± 0.00
'Manzanilla'	0.16 ± 0.06	0.04 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.30	1.05 ± 0.05	0.20 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.36 ± 0.02

a – Media ± SD

Tabla VIII 1.3 b. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba

Variedades	Colesterol (%)	Brasicasterol (%)	24-Metilencolesterol (%)	Campestenol (%)	Clerosterol (%)	Sitostanol (%)	Δ^5 -24 Estigmastadienol (%)	Δ^7 -Estigmastenol (%)	Δ^7 -Avenasterol (%)
'Megaritiki'	0.12 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.10 ± 0.10	1.04 ± 0.05	0.49 ± 0.07	0.71 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.53 ± 0.01
'Meski'	0.06 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.3	0.30 ± 0.03	1.30 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.83 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.20 ± 0.10
'Mision San Vicente'	0.06 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.54 ± 0.04	0.35 ± 0.05	0.51 ± 0.01
'Mixani'	0.90 ± 0.50	0.02 ± 0.02	0.15 ± 0.08	0.30 ± 0.10	1.55 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.35	0.45 ± 0.35	0.35 ± 0.05
'Moraiolo'	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.09 ± 0.03	1.05 ± 0.05	0.38 ± 0.07	0.76 ± 0.13	0.27 ± 0.01	0.51 ± 0.01
'Morrut'	0.18 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.18 ± 0.00	1.10 ± 0.30	0.00 ± 0.00	0.53 ± 0.14	0.35 ± 0.05	0.24 ± 0.03
'Nevado Azul'	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.03	1.05 ± 0.05	0.20 ± 0.00	0.37 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.34 ± 0.02
'Pajarero'	0.06 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.07 ± 0.14	1.05 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.58 ± 0.05	0.13 ± 0.01	0.33 ± 0.08
'Palomar'	0.14 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.19 ± 0.02	0.42 ± 0.00	1.40 ± 0.45	0.00 ± 0.00	0.74 ± 0.03	0.29 ± 0.06	0.36 ± 0.08
'Pendolino'	0.07 ± 0.60	0.05 ± 0.05	0.02 ± 0.02	0.15 ± 0.17	1.05 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.70 ± 0.20	0.15 ± 0.05	0.25 ± 0.05
'Picholine Marrocaïne'	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.06 ± 0.01	1.04 ± 0.05	0.22 ± 0.01	0.44 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.32 ± 0.01
'Plementa Bjelica'	0.25 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.15 ± 0.05	0.90 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.60 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.20 ± 0.00
'Racimal'	0.09 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.11 ± 0.01	1.10 ± 0.10	0.35 ± 0.01	1.10 ± 0.50	0.15 ± 0.01	0.47 ± 0.04
'Razzola'	0.25 ± 0.05	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.00	1.20 ± 0.15	0.00 ± 0.00	1.10 ± 0.00	0.15 ± 0.05	0.45 ± 0.05
'Salonenque'	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.90 ± 0.01	0.64 ± 0.05	0.80 ± 0.04	0.43 ± 0.08	0.93 ± 0.02
'San Sun Tuzcamalik'	0.09 ± 0.07	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.10	0.22 ± 0.22	1.40 ± 0.00	0.20 ± 0.19	0.60 ± 0.17	0.17 ± 0.02	0.54 ± 0.09
'Sevillneca'	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.12 ± 0.0	1.10 ± 0.00	0.57 ± 0.01	0.76 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.74 ± 0.08
'St. George Grey'	0.10 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.08 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.52 ± 0.09	0.76 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.48 ± 0.01
'Ulliri i Kuq'	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.90 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.30 ± 0.20	0.45 ± 0.35	0.35 ± 0.05
'Zalmati'	0.08 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.08	0.09 ± 0.01	1.10 ± 0.00	0.41 ± 0.01	0.95 ± 0.24	0.26 ± 0.04	0.68 ± 0.07
'Zarza'	0.10 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.00	1.05 ± 0.05	0.40 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.70 ± 0.01

a – Media ± SD

El perfil de los esteroides (expresado en %) en el aceite de oliva se utiliza como una herramienta para la detección de la presencia de otros tipos de grasas en el aceite de oliva, y para ello, se han establecido los límites por cada esteroide y su contenido total (Cert et al., 1997). La composición de los esteroides en el aceite de las 43 variedades se muestra en la Tabla VIII 1.3. Los valores medios, en general, se encuentran dentro de los límites establecidos por la CE con algunas excepciones.

El β -Sitosterol, esteroide mayoritario y uno de los más estudiados por sus efectos beneficiosos en la salud (Hidalgo et al., 2009; Paniagua-Pérez et al., 2008; Vivancos y Moreno, 2005), muestra un contenido que varía entre 74.20 y 89.35% para los aceites de las variedades 'Palomar' y 'Kerkiras', respectivamente.

En cuanto al Δ^5 -Avenasterol, es el segundo esteroide en importancia en el aceite de oliva, la variedad 'Kalinjot' presenta los niveles más bajos (2.60%), siendo los aceites de 'Plementa Bjelica' los que mostraron niveles más altos, alrededor de 18.50%.

Campesterol y Estigmasterol son otros dos esteroides mayoritarios en el aceite de oliva, que se utilizan como parámetros de calidad y autenticidad de los aceites. La mayoría de los aceites analizados presentan niveles dentro de los límites establecidos, con alguna excepción para el Campesterol, que en algunas variedades presenta valores superiores al 4%, valor establecido por el Reglamento CEE, (2003). Las variedades con alto contenido en este compuesto son 'Morrut' (5.1%), 'Razzola' (4.3%), 'Kalinjot' (4.3%), 'Dolce Agogia' (4.2%) y 'Cipresino' con 4.1%. Sin

embargo, el contenido en Estigmasterol de los aceites analizados no superó el 2.0% en ninguna de las variedades estudiadas.

Las variedades analizadas presentaron unos valores muy bajos de colesterol en sus aceites, observándose en algunas de ellas la ausencia de este esteroide. Habría que destacar como las variedades 'Mixani' y 'Kalinjot' alcanzaron unos valores de colesterol por encima de los límites establecidos por la Reglamentación de la Unión Europea ($\leq 0.5\%$) (CEE, 2003).

El contenido en Brasicasterol de los aceites analizados en este trabajo oscila entre 0.01 y 0.08%. En algunos de las variedades como 'Amigdalolia Nana', 'Arroniz', 'Beyaz Yagl', 'Dolce Agogia', 'Frantoio', 'Kerkiras', 'Khashabi', 'Lastovka', 'Levantinka', 'Megaritiki', 'Meski', 'Mision San Vicente', 'Morrut', 'Palomar', 'Plementa Bjelica', 'San Sun Tuzcamalik', 'St George Grey' y 'Ulliri i Kuq' se observa la ausencia de este compuesto.

24-Metilencolesterol, es otro esteroide minoritario cuyo contenido en este trabajo ha oscilado entre 0.01 y 0.45. Habría que descartar como en algunas variedades como 'Amygdalolia Nana', 'Arroniz', 'Ulliri i Kuq', 'Lastovka' y 'Frantoio' no se detectó su presencia en el aceite extraído.

Campestanol, Sitostanol, Δ^5 ,24-Estigmasteradienol y Δ^7 -Estigmastenol son esteroides que pertenecen a la familia de los estanoles. En el aceite de oliva estos esteroides se encuentran en cantidades muy bajas o a nivel de trazas. La variedad 'Palomar' ha presentado un elevado contenido en

Campestanol, alrededor del 0.42%. El contenido en β -Sitostanol de los aceites estudiados varió entre 0.01 y 2.0% para las variedades 'Crnica' y 'Lastovka', respectivamente. La variedad 'Beyaz Yagl' presentó los niveles más altos en Δ^5 , 24-Estigmastadienol y Δ^7 -Estigmastenol, tal y como se puede observar en la Tabla VII 1.3, siendo los aceites de la variedad 'Amygdalolia Nana' los que presentaron los valores más bajos para estos esteroides.

La variedad de este estudio que presentó los niveles más elevados de Clerosterol (1.55%) fue 'Samsun Tuzlamalik', mientras que en los aceites de la variedad 'Beyaz Yagl' se obtuvieron los valores más altos de Δ^7 -Avenasterol (0.96 %).

El β -Sitosterol de forma individual no está recogido en la reglamentación como parámetro de calidad sino como β -Sitosterol estimado, que es un parámetro que incluye la suma de Δ^5 ,23-Estigmastadienol, Clerosterol, β -Sitosterol, β -Sitostanol, Δ^5 -Avenasterol y Δ^5 ,24-Estigmastadienol. La mayoría de las variedades analizadas presentaron valores dentro de los límites establecidos por el Reglamento de la CEE (2003), con algunas excepciones como las variedades 'Kalinjot', 'Lastovka', 'Mixani', 'Amygdalolia Nana', 'Mision San Vicente', 'Morrut', 'San Sun Tuzcamalik', 'Razzola', 'Palomar' y 'Beyaz Yagl' cuyo contenido no superaron el 93.0% (valor límite establecido).

En cuanto al contenido total de esteroides, todas las variedades han presentado valores por encima de 1000 mg/kg (valor límite CEE). Solo la variedad 'Khashabi' mostró un contenido por debajo de este límite

oscilando en torno a 848 mg/kg (Tabla VIII 1.4). La variedad con un contenido más elevado de esteroides es 'Sevillanca' con un valor medio de 2419 mg/kg.

Tabla VIII. 1.4. Contenido de esteroles totales de los aceites de 43 variedades de olivo cultivadas en el Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.

Variedades	Grupos	Esteroles Totales(mg/kg)
'Sevillenca'	I	2419 ± 161 ^a
'Zalmati'	I	2378 ± 31
'Mision de San Vicente'	II	2128 ± 166
'Pajarero'	II	2099 ± 35
'Salonenque'	II	2098 ± 67
'Frantoio'	II	2089 ± 343
'Picholine Marocaine'	II	2071 ± 83
'Nevado Azul'	II	2000 ± 70
'Beyaz Yagl'	II	2000 ± 150
'Callosina'	II	1922 ± 57
'Zarza'	III	1891 ± 83
'Lechin de Granada'	III	1873 ± 50
'Galega Vulgar'	III	1861 ± 262
'Kerkiras'	III	1857 ± 211
'Kotruvsi'	III	1828 ± 45
'St. George Greys'	III	1817 ± 139
'Plementa Bjelica'	III	1734 ± 188
'Racimal'	III	1728 ± 153
'Ulliri i Kuq'	III	1698 ± 19
'Dolce Agogia'	III	1690 ± 148
'Kalinjot'	III	1662 ± 41
'Mixani'	III	1655 ± 75
'Moraiolo'	IV	1519 ± 24
'Cornicabra'	IV	1505 ± 104
'Palomar'	IV	1465 ± 423
'Razzola'	IV	1444 ± 211
'Megaritiki'	IV	1442 ± 0.50
'Arbequina'	IV	1430 ± 23
'Cipresino'	IV	1423 ± 14
'Arroniz'	IV	1407 ± 55
'Levantinka'	IV	1355 ± 211
'Amigdalolia Nana'	IV	1346 ± 355
'Manzanilla'	V	1279 ± 167
'Meski'	V	1271 ± 252
'Pendolino'	V	1271 ± 75
'San Sun Tuzcamalik'	V	1270 ± 3.5
'Crnica'	V	1266 ± 162
'Blanqueta'	V	1265 ± 32
'Kelb-el Ter 145'	V	1249 ± 203
'Chetoi'	V	1227 ± 114
'Lastovka'	V	1155 ± 90
'Morrut'	V	1125 ± 43
'Khashabi'	V	848 ± 7.0

a, Valor medio ± SD

El análisis de componentes principales de los resultados muestra que β -Sitosterol y Δ^5 -Avenasterol explican el 93% de la varianza (PC 1), sin embargo, el Campesterol y Estigmasterol solo un 5% (PC 2). Posteriormente en el análisis de clúster se ha elegido una distancia Euclídea de 50, lo que ha permitido clasificar los aceites de las variedades analizadas en 5 grupos como se puede observar en la Figura VIII 1.1.

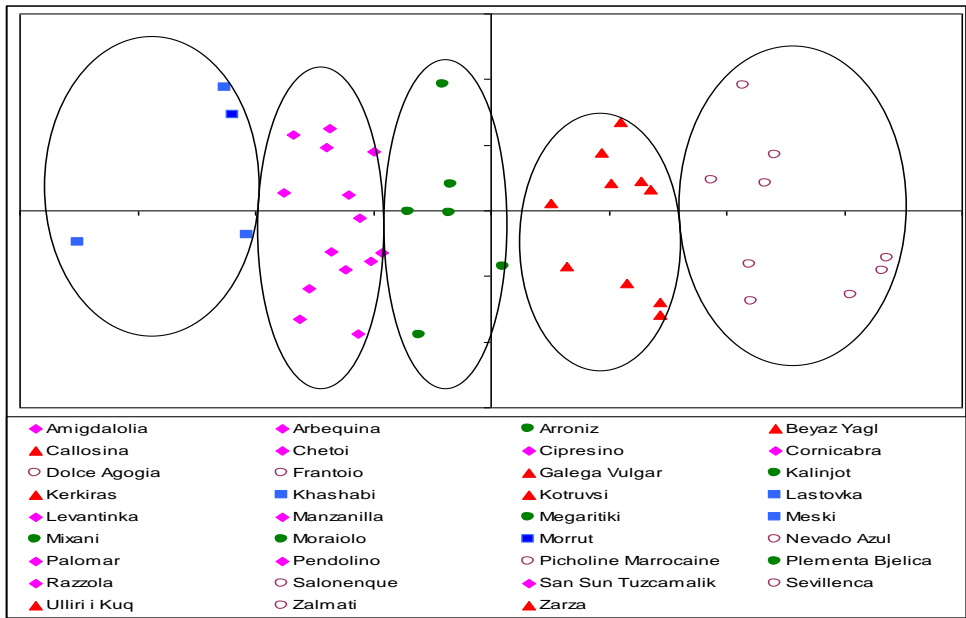


Figura VIII 1.1 Análisis de Componentes principales (PC 1 y PC 2) de los esteroides del aceite de oliva virgen de 43 variedades de Banco de Germoplasma de Córdoba.

Las categorías o grupos obtenidos del análisis Multivariante según el perfil de esteroides de los aceites son los siguientes:

- Grupo I: Muy Alto contenido en β -Sitosterol, muy bajo en Δ^5 -Avenasterol.
- Grupo II: Alto contenido en β -Sitosterol, bajo contenido en Δ^5 -Avenasterol.
- Grupo III: Valor medio en β -Sitosterol y Δ^5 -Avenasterol y alto contenido en Campesterol y Estigmasterol.
- Grupo IV: Bajo contenido en β -Sitosterol, alto contenido en Δ^5 -Avenasterol.
- Grupo V: Muy bajo contenido en β -Sitosterol, muy alto contenido en Δ^5 -Avenasterol.

Discusión

En general, los aceites de las variedades estudiadas presentan una gran variabilidad en la fracción esterólica que puede ser explicada por el componente genético ya que los otros factores, tanto agronómicos como tecnológicos, fueron constantes. Además, del análisis de componentes principales se pueden establecer cinco categorías de variedades en función de su contenido total de esteroides presentes en el aceite.

Categoría I: Muy Alto.....> 2200 mg/kg

Categoría II: Alto.....1999 – 2200 mg/kg

Categoría III: Medio.....1650 – 1999 mg/kg

Categoría IV: Bajo.....1300 – 1650 mg/kg

Categoría V: Muy Bajo.....< 1300 mg/kg

Hasta la fecha, los estudios llevados a cabo sobre los contenidos en esteroides en el aceite de oliva han puesto de manifiesto la influencia de la variedad en las mismas. Sin embargo, dichos estudios no aportan el elevado número de variedades y tampoco, en el entorno de un Banco de Germoplasma con las mismas condiciones de cultivo y medio agrológico.

En cualquier caso, los niveles de contenido total obtenidos, se encontraron en el intervalo descrito previamente por Boskou (1996). En cuanto, a los esteroides individuales se observa que los aceites de las variedades 'Kalinjot' y 'Chetoui' muestran unos contenidos en β -Sitosterol, similares a los descritos por Tedeschini et al. (2001) y Temime et al. (2008). Sin embargo, en el caso de las variedades 'Frantoio' y 'Moraiolo' los resultados obtenidos para el contenido en esteroides totales y el porcentaje de los mayoritarios difieren de los descritos por Caselli et al. (1993).

Para los aceites de la variedad 'Arbequina', los contenidos en Campesterol, Campestanol, β -Sitosterol, Sitostanol, Δ^5 -Avenasterol y Δ^7 -Estigmastadienol, mostraron valores similares a los descritos por Lerma – García et al. (2011).

Las diferencias encontrados en algunas variedades podrían ser explicadas por el hecho de que el contenido en esteroides en el aceite de oliva está influenciado por otros factores además del genético, como las condiciones climáticas (Stefanouadaki et al., 2001), factores agronómicos (Aparicio y Luna, 2002) y medio del cultivo (Bianchi et al., 2001).

Los resultados de la composición esterólica de los aceites monovarietales estudiados, expresado en mg/kg, está recogida en la Tabla VIII 1.4 (a-b). Estos resultados aportan gran interés a nivel nutricional por los efectos beneficiosos que presentan los esteroides sobre la salud. Los esteroides mayoritarios, que su vez presentan interés nutricional, como β -Sitosterol y Δ^5 -Avenasterol han presentado valores muy diferentes entre las variedades estudiadas; el contenido en β -Sitosterol varió entre 672 mg/kg para la variedad 'Kashabi' y 2035 mg/kg para los aceites de 'Sevillanca'. Y en el caso del Δ^5 -Avenasterol valores se situaron en el rango de 11 a 318 mg/kg, hasta 30 veces superiores.

Tabla VIII 1.4 a. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba

Variedades	Campesterol (mg/kg)	Stigmasterol (mg/kg)	β – Sitosterol (mg/kg)	Δ^5 – Avenasterol (mg/kg)	β – Sitosterol Estimado (%)	Esteroles Totales (mg/kg)
'Amigdalolia'	44.58 \pm 13.0 ^a	17.83 \pm 0.9	1176 \pm 448	37.5 \pm 8.7	91 \pm 2.26	1346 \pm 473.7
'Arbequina'	57.90 \pm 0.3	13.31 \pm 1.7	1148 \pm 50.2	159.20 \pm 17.6	94 \pm 0.08	1430 \pm 32.5
'Arroniz'	43.61 \pm 2.4	14.01 \pm 1.2	1232 \pm 91.2	77.45 \pm 18.5	94 \pm 0.13	1407 \pm 77.7
'Beyaz Yagl'	68.96 \pm 2.0	17.72 \pm 2.2	1574 \pm 69.2	206.16 \pm 56.8	92 \pm 1.90	2000 \pm 98.9
'Blanqueta'	41.74 \pm 1.4	5.74 \pm 0.1	1046 \pm 34.6	127.83 \pm 8.1	95 \pm 0.04	1265 \pm 45.2
'Callosina'	59.59 \pm 2.5	7.48 \pm 0.4	1660 \pm 51.6	114.19 \pm 4.6	95 \pm 0.04	1922 \pm 81.3
'Cheto'	36.15 \pm 3.9	15.40 \pm 2.8	1020 \pm 143.5	107.43 \pm 3.8	94 \pm 0.18	1227 \pm 161.9
'Cipresino'	59.08 \pm 1.8	9.54 \pm 0.5	1168 \pm 43.5	123.63 \pm 28.4	93 \pm 0.19	1423 \pm 20.5
'Cornicabra'	39.03 \pm 1.7	6.76 \pm 0.4	1144 \pm 68.5	246.89 \pm 69.7	95 \pm 0.00	1505 \pm 147.7
'Crnica'	50.56 \pm 1.2	9.54 \pm 0.5	1102 \pm 201.5	45.33 \pm 1.4	94 \pm 0.31	1266 \pm 229.8
'Docle Agogia'	71.89 \pm 10.0	9.75 \pm 1.8	1439 \pm 160.5	87.04 \pm 38.0	94 \pm 0.09	1690 \pm 209.3
'Frantoio'	62.34 \pm 11.6	9.23 \pm 0.7	1814 \pm 414.3	133.91 \pm 23.9	95 \pm 0.51	2089 \pm 485.7
'Galega Vulgar'	60.35 \pm 10.7	16.61 \pm 2.0	1643 \pm 357.8	88.56 \pm 8.1	95 \pm 0.11	1861 \pm 370.5
'Kalinjot'	71.48 \pm 2.5	8.39 \pm 4.9	1394 \pm 50.9	43.22 \pm 1.5	88 \pm 0.14	1662 \pm 58.6
'Kelb-el Ter 145'	45.13 \pm 22.4	17.89 \pm 7.5	1094 \pm 224.8	47.83 \pm 24.7	94 \pm 1.20	1249 \pm 287.0
'Kerkiras'	66.87 \pm 10.7	7.21 \pm 1.4	1661 \pm 281.4	50.97 \pm 6.9	94 \pm 0.98	1857 \pm 299.1
'Khashabi'	26.70 \pm 1.4	10.60 \pm 0.7	672 \pm 4.24	100.59 \pm 18.5	93 \pm 1.18	848 \pm 9.8
'Kotruvsi'	62.07 \pm 2.9	19.22 \pm 1.9	1560 \pm 43.1	116.50 \pm 26.0	93 \pm 0.42	1828 \pm 64.3
'Lastovka'	40.88 \pm 2.0	22.30 \pm 1.5	933 \pm 61.5	67.72 \pm 0.6	89 \pm 4.23	1155 \pm 127.9
'Lechin de Granada'	69.37 \pm 5.2	21.52 \pm 0.5	1592 \pm 74.9	137.42 \pm 9.3	94 \pm 0.14	1873 \pm 71.4
'Levantinka'	42.59 \pm 8.4	10.06 \pm 1.2	1123 \pm 302	147.4 \pm 0.1	95 \pm 1.13	1355 \pm 299

a – Media \pm SD

Tabla VIII 1.4 a. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba

Variedades	Campesterol (mg/kg)	Estigmasterol (mg/kg)	β – Sitosterol (mg/kg)	$\Delta 5$ – Avenasterol (mg/kg)	β – Sitosterol Estimado (%)	Esteroles Totales (mg/kg)
'Manzanilla'	34.36 ± 4.5	15.34 ± 2.8	1132 ± 215.6	60.89 ± 5.9	95 ± 0.21	1279 ± 236.1
'Megaritiki'	45.43 ± 1.0	3.96 ± 0.5	1223 ± 7.77	119.08 ± 5.1	95 ± 0.09	1442 ± 0.7
'Meski'	36.34 ± 11.0	13.21 ± 7.1	957 ± 255.9	211.2 ± 78.2	94 ± 0.56	1271 ± 356.3
'Mision San Vicente'	68.09 ± 7.5	38.47 ± 7.2	1739 ± 212.8	182.19 ± 24.5	91 ± 1.26	2128 ± 234.7
'Mixani'	52.18 ± 4.5	24.60 ± 5.4	1291 ± 69.2	165.02 ± 5.7	90 ± 2.26	1655 ± 106.7
'Moraiolo'	44.91 ± 10.6	14.4 ± 0.1	1302 ± 35.3	94.710 ± 18.2	94 ± 1.14	1519 ± 33.9
'Morrut'	58.13 ± 10.2	19.12 ± 1.0	934 ± 34.6	70.11 ± 3.3	91 ± 1.42.	1125 ± 60.8
'Nevado Azul'	60.01 ± 6.3	25.08/ ± 4.0	1788 ± 205.7	77.11 ± 8.6	95 ± 0.0.4	2000 ± 212.8
'Pajarero'	57.74 ± 2.8	20.57 ± 1.0	1855 ± 58.6	11.07 ± 12.2	96 ± 0.04	20.99 ± 49.4
'Palomar'	46.79 ± 21.9	21.46 ± 9.7	1094 ± 472.3	228.65 ± 106.7	92 ± 2.22	1465 ± 598.9
'Pendolino'	32.46 ± 3.6	8.37 ± 3.3	1065 ± 128.6	93.63 ± 2.8	93 ± 2.47	1271 ± 106.7
'Picholine Marrocaïne'	64.13 ± 0.7	17.77 ± 0.4	1839 ± 130.1	96.94 ± 9.0	95 ± 0.36	2071 ± 118.0
'Plementa Bjelica'	48.75 ± 9.9	19.08 ± 2.9	1300 ± 244.6	318.26 ± 4.0	95 ± 0.00	1734 ± 266.5
'Racimal'	42.26 ± 4.0	16.43 ± 0.9	1473 ± 174.6	128.81 ± 17.3	95 ± 0.09	1728 ± 216.3
'Razzola'	62.09 ± 12.8	9.89 ± 0.0	1185 ± 270.8	108.69 ± 12.4	92 ± 0.91	1444 ± 298.4
'Salonenque'	55.69 ± 6.9	12.42 ± 1.9	1811 ± 120.9	130.29 ± 31.1	95 ± 0.04	2098 ± 94.7
'San Sun Tuzcamalik'	39.39 ± 3.7	19.69 ± 0.8	1036 ± 31.8	99.314 ± 23.7	92 ± 0.96	1270 ± 4.9
'Sevillneca'	88.23 ± 6.6	11.58 ± 0.4	2035 ± 151.3	188.24 ± 58.6	94 ± 0.04	2419 ± 228.4
'St. George Grey'	51.02 ± 8.0	9.94 ± 1.7	1602 ± 186.6	93.95 ± 0.0	96 ± 0.03	1817 ± 197.2
'Ulliri i Kuq'	59.46 ± 5.7	10.18 ± 0.1	1502 ± 29.6	88.22 ± 8.2	95 ± 0.07	1698 ± 26.8
'Zalmati'	78.52 ± 4.8	10.46 ± 0.1	1982 ± 175.6	214.20 ± 108.6	95 ± 0.02	2378 ± 44.5
'Zarza'	49.17 ± 3.0	18.36 ± 4.7	1626 ± 103.9	128.45 ± 2.6	95 ± 0.08	1891 ± 118.0

a – Media ± SD

Tabla VIII 1.4 b. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba

Variedades	Colesterol (mg/g)	Brassicasterol (mg/g)	24- Metilencolesterol (mg/g)	Campestenol (mg/g)	Clerosterol (mg/g)	Sitostanol (mg/g)	Δ^5 -24 Estigmastadienol (mg/g)	Δ^7 - Estigmastenol (mg/g)	Δ^7 - Avenasterol (mg/g)
'Amigdalolia Nana'	0.84 ± 1.1	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.84 ± 1.1	17.83 ± 8.0	0.84 ± 1.1	2.02 ± 2.8	1.01 ± 1.4	2.69 ± 0.9
'Arbequina'	1.63 ± 0.4	1.22 ± 0.7	6.41 ± 1.2	1.78 ± 0.0	15.73 ± 0.3	6.13 ± 1.4	10.15 ± 0.0	2.70 ± 0.9	4.28 ± 0.3
'Arroniz'	0.34 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.06 ± 0.0	2.75 ± 0.4	11.31 ± 2.6	0.58 ± 0.8	5.08 ± 1.6	3.37 ± 0.1	4.91 ± 0.1
'Beyaz Yagl'	2.87 ± 0.8	0.00 ± 0.0	5.01 ± 3.0	5.20 ± 0.2	21.93 ± 1.7	0.00 ± 0.0	32.07 ± 4.4	11.74 ± 1.6	19.13 ± 1.5
'Blanqueta'	1.13 ± 0.1	0.44 ± 0.0	3.85 ± 0.2	1.32 ± 0.2	13.91 ± 0.4	3.84 ± 0.6	10.13 ± 0.8	2.71 ± 0.1	3.09 ± 0.0
'Callosina'	4.40 ± 0.6	0.39 ± 0.5	4.10 ± 1.0	1.82 ± 0.2	21.14 ± 0.8	9.11 ± 4.1	28.60 ± 26.7	4.05 ± 0.9	7.11 ± 0.3
'Chetoi'	3.07 ± 2.2	0.33 ± 0.4	2.99 ± 0.1	1.46 ± 0.0	12.8 ± 0.8	8.70 ± 6.4	10.12 ± 4.0	2.66 ± 0.7	4.39 ± 1.1
'Cipresino'	3.91 ± 0.1	0.92 ± 0.1	5.19 ± 0.4	2.35 ± 0.5	16.37 ± 1.2	7.97 ± 0.7	11.24 ± 0.2	4.19 ± 0.0	9.58 ± 2.5
'Cornicabra'	1.20 ± 0.1	0.74 ± 0.1	5.66 ± 0.8	2.03 ± 0.3	16.56 ± 1.6	25.98 ± 11.7	10.59 ± 2.0	4.14 ± 0.5	11.76 ± 4.5
'Crnica'	4.40 ± 3.8	1.00 ± 1.4	1.03 ± 0.2	3.77 ± 1.1	13.21 ± 1.5	7.97 ± 0.7	5.33 ± 0.2	3.25 ± 0.8	5.15 ± 1.1
'Docle Agogia'	2.29 ± 0.9	0.00 ± 0.0	1.95 ± 0.3	3.53 ± 0.2	16.90 ± 2.0	17.48 ± 0.7	20.38 ± 3.8	6.83 ± 0.7	9.12 ± 1.1
'Frantoio'	1.47 ± 1.3	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	1.96 ± 0.3	18.80 ± 4.3	1.47 ± 1.3	21.23 ± 7.8	5.39 ± 2.6	9.57 ± 3.6
'Galega Vulgar'	1.94 ± 0.6	0.31 ± 0.4	2.68 ± 0.4	1.56 ± 0.1	18.61 ± 3.7	10.26 ± 1.3	7.98 ± 2.2	3.43 ± 0.3	8.40 ± 1.0
'Kalinjot'	10.9 ± 8.6	0.33 ± 0.0	3.32 ± 0.1	4.86 ± 6.8	15.85 ± 4.0	0.00 ± 0.0	9.85 ± 6.7	4.13 ± 1.0	4.98 ± 0.1
'Kelb-el Ter 145'	2.18 ± 1.0	0.72 ± 0.0	1.98 ± 0.8	1.20 ± 0.0	15.51 ± 2.7	3.96 ± 0.1	6.97 ± 1.4	5.07 ± 1.8	3.65 ± 0.4
'Kerkiras'	5.36 ± 1.7	0.00 ± 0.0	2.06 ± 2.9	3.50 ± 2.0	18.78 ± 5.6	1.64 ± 2.3	9.71 ± 6.7	7.00 ± 4.0	5.57 ± 0.8
'Khashabi'	0.72 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.33 ± 0.4	4.02 ± 0.1	9.30 ± 3.4	0.54 ± 0.7	5.21 ± 0.7	1.27 ± 0.1	3.56 ± 0.4
'Kotruvsi'	2.72 ± 1.1	0.93 ± 1.3	0.37 ± 0.5	1.87 ± 2.6	14.53 ± 4.6	0.00 ± 0.0	18.33 ± 3.2	3.65 ± 0.1	5.48 ± 0.1
'Lastovka'	2.31 ± 0.2	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	3.46 ± 0.3	12.08 ± 0.5	0.06 ± 0.0	8.80 ± 3.4	4.35 ± 4.3	2.84 ± 0.4
'Lechin de Granada'	1.79 ± 0.7	0.74 ± 0.2	3.92 ± 0.1	1.49 ± 0.0	21.52 ± 0.5	4.11 ± 0.3	11.03 ± 0.3	2.98 ± 0.4	5.43 ± 0.2
'Levantinka'	1.69 ± 0.8	0.00 ± 0.0	0.48 ± 0.2	4.06 ± 0.8	16.20 ± 2.9	0.00 ± 0.0	4.06 ± 0.8	2.71 ± 0.3	4.06 ± 0.8
'Manzanilla'	2.00 ± 0.7	0.56 ± 0.6	1.15 ± 0.4	0.97 ± 0.3	13.51 ± 3.3	2.64 ± 0.7	7.20 ± 1.0	2.22 ± 0.3	4.62 ± 0.4

a – Media ± SD

Tabla VIII 1.4 b. Composición de la fracción esterólica de los aceites de las 43 variedades de olivo del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba

Variedades	Colesterol (mg/g)	Brasicasterol (mg/g)	24- Metilencolesterol (mg/g)	Campestenol (mg/g)	Clerosterol (mg/g)	Sitostanol (mg/g)	Δ^5 -24 Estigmastadienol (mg/g)	Δ^7 - Estigmastenol (mg/g)	Δ^7 - Avenasterol (mg/g)
'Megaritikí'	1.80 ± 0.1	0.00 ± 0.0	1.15 ± 0.0	1.44 ± 0.0	15.07 ± 1.1	7.06 ± 1.4	10.31 ± 0.7	3.67 ± 0.3	7.64 ± 0.2
'Meski'	0.73 ± 0.3	0.00 ± 0.0	0.73 ± 0.3	3.56 ± 0.7	17.28 ± 5.7	0.00 ± 0.0	10.16 ± 2.8	1.27 ± 0.3	2.29 ± 1.0
'Mision San Vicente'	1.37 ± 1.9	0.00 ± 0.0	4.14 ± 0.3	1.43 ± 0.7	14.89 ± 1.6	0.00 ± 0.0	11.67 ± 2.6	7.36 ± 0.6	10.86 ± 1.4
'Mixani'	16.1 ± 13.8	0.43 ± 0.6	1.96 ± 2.1	5.04 ± 2.6	25.69 ± 2.8	0.00 ± 0.0	7.18 ± 7.7	7.71 ± 8.6	5.75 ± 0.7
'Moraiolo'	1.59 ± 0.1	1.14 ± 0.5	2.27 ± 0.3	1.35 ± 0.6	15.96 ± 1.4	1.48 ± 2.1	11.58 ± 2.6	4.09 ± 0.1	7.82 ± 0.0
'Morrut'	2.13 ± 1.9	0.00 ± 0.0	1.57 ± 0.0	2.01 ± 2.1	12.50 ± 5.4	0.00 ± 0.0	6.02 ± 2.5	3.91 ± 0.5	2.77 ± 0.7
'Nevado Azul'	1.09 ± 0.0	0.64 ± 0.9	1.80 ± 0.1	1.18 ± 0.1	21.08 ± 3.6	0.42 ± 0.1	7.44 ± 0.1	4.70 ± 0.6	6.86 ± 0.0
'Pajarero'	1.26 ± 0.3	0.32 ± 0.4	2.15 ± 0.2	1.46 ± 0.0	22.05 ± 2.0	4.39 ± 0.7	12.15 ± 1.1	2.83 ± 0.2	7.00 ± 2.3
'Palomar'	1.96 ± 0.4	0.00 ± 0.0	2.69 ± 0.7	5.48 ± 1.0	19.34 ± 0.6	0.00 ± 0.0	10.71 ± 3.8	3.99 ± 0.4	4.98 ± 0.4
'Pendolino'	8.44 ± 10.0	0.67 ± 0.9	0.26 ± 0.3	2.02 ± 2.8	13.31 ± 0.2	0.00 ± 0.0	9.05 ± 4.3	1.94 ± 1.0	3.15 ± 0.6
'Picholine Marrocaíne'	1.13 ± 0.0	1.04 ± 0.3	2.46 ± 0.4	1.23 ± 0.2	21.60 ± 0.3	4.65 ± 0.1	9.08 ± 0.3	3.41 ± 0.0	6.63 ± 0.6
'Plementa Bjelica'	4.43 ± 1.8	0.00 ± 0.0	0.44 ± 0.1	2.50 ± 0.8	15.61 ± 2.3	0.00 ± 0.0	10.40 ± 1.5	1.73 ± 0.2	3.46 ± 0.5
'Racimal'	1.55 ± 0.1	0.31 ± 0.4	2.62 ± 0.8	1.88 ± 0.0	18.85 ± 0.0	6.03 ± 0.5	21.02 ± 15.4	2.67 ± 0.2	8.18 ± 1.9
'Razzola'	3.71 ± 1.7	0.24 ± 0.3	1.44 ± 0.2	1.84 ± 2.6	17.7 ± 0.6	0.00 ± 0.0	15.88 ± 3.2	2.06 ± 0.5	6.39 ± 0.3
'Salonenque'	1.15 ± 0.2	1.36 ± 0.2	1.46 ± 0.2	2.30 ± 0.1	20.46 ± 1.3	13.49 ± 1.0	18.01 ± 0.3	9.07 ± 2.7	19.48 ± 0.2
'San Sun Tuzcamalik'	1.14 ± 1.2	0.00 ± 0.0	1.84 ± 1.8	2.85 ± 4.0	17.78 ± 0.0	2.61 ± 3.5	7.68 ± 3.1	2.22 ± 0.4	6.92 ± 1.7
'Sevillneca'	1.79 ± 0.3	1.22 ± 0.4	4.04 ± 1.5	303 ± 0.4	26.61 ± 2.5	13.92 ± 1.4	18.55 ± 2.6	6.37 ± 0.2	18.03 ± 4.4
'St. George Grey'	1.88 ± 0.1	0.00 ± 0.0	1.81 ± 0.1	1.45 ± 0.1	18.1 ± 1.9	9.32 ± 1.2	13.85 ± 0.6	3.25 ± 0.0	8.79 ± 0.5
'Ulliri i Kuq'	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	3.39 ± 0.0	15.28 ± 0.2	1.69 ± 0.0	5.13 ± 4.8	7.57 ± 8.2	5.95 ± 1.2
'Zalmati'	1.90 ± 0.0	0.94 ± 0.3	4.13 ± 2.7	2.25 ± 0.4	26.16 ± 0.4	9.87 ± 0.6	22.63 ± 7.8	6.19 ± 1.4	16.26 ± 2.2
'Zarza'	1.84 ± 1.2	0.28 ± 0.1	1.69 ± 0.1	1.70 ± 0.1	19.90 ± 2.5	7.57 ± 0.7	12.65 ± 0.2	5.17 ± 0.6	13.33 ± 0.9

a – Media ± SD

En cuanto a los límites legales establecidos para el aceite de oliva virgen, se observa que el 28% de los aceites de las variedades estudiadas se encuentran fuera de los límites descritos por el Reglamento de la Unión Europea para el contenido total y/o contenido individual de diferentes esteroides para la categoría “virgen extra”. En este aspecto los resultados presentados en este trabajo se podrían considerar de gran interés para su consideración próximas revisiones de este Reglamento.

Además, para el 43% de las variedades estudiadas se observaron como la ausencia o contenido a niveles de traza (difíciles de cuantificar) de Brasicasterol, 24–Metilencolesterol y Sitostanol, podría ser utilizados como una herramienta de gran interés para establecer la autenticidad y permitir la discriminación de los aceites monovarietales en Denominaciones de Origen Protegidas.

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir:

- ❖ La composición de los esteroides del aceite de oliva presenta una gran variabilidad genética. Este efecto se puede observar tanto en el contenido total como en esteroides individuales.
- ❖ El perfil de los esteroides se puede utilizar como una herramienta de alto valor para discriminar y clasificar las variedades de aceite de oliva. Además, se podría utilizar el perfil de los esteroides como un instrumento para proteger la autenticidad los aceites de oliva monovarietales.

- ❖ La información obtenida en este trabajo sobre el contenido de la fracción esterólica presente en los aceites de oliva, podría ser útil para los estudios nutricionales.
- ❖ En los resultados de este estudio se observó que algunas de las variedades obtuvieron contenidos en algunos de los esteroides que no están dentro de los límites establecidos. A pesar de los resultados, estas variedades se podrían considerar como aceites de oliva virgen extra porque estos contenidos podrían ser características de propia variedad.

Referencias:

- Aparicio, R., Ferreiro, L., Alonso, V. (1994). *Effect of climate on the chemical composition of virgin olive oil*. *Analytica Chimica Acta*. 292; 235 – 241.
- Aparicio, R., Luna G. (2002). *Characterization of monovarietal virgin olive oils*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 104; 614 – 627.
- Awad, A.B., Downie, A., Fink, C.S., Kim, U. (2000). *Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice*. *Anticancer Research*. 20; 821 – 824.
- Azcón-Bieto, J., Talon, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Ed. *Mc Graw- Hill-Interamericana*. pp 261 – 283.
- Bianchi, G., Giansante, L., Shaw, A., Kell, D.B. (2001). *Chemometric criteria for the characterisation of Italian Protected Denomination of Origin (DOP) olive oils from their metabolic profiles*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 103; 141 – 150.

- Boskou, D. (1996). *Olive oil chemistry and technology*. Champaign, Illinois: AOCS Press.
- Bouic, P.J. (2002). *Sterols and sterolins: New drugs for the immune system?*. *Drug Discovery Today*. 7; 775 – 778.
- Caselli, S., Modi, G., Nizzi Grifi, F., Fiorino, P. (1993). *Variabilidad de la composición en ácidos grasos, en esteroides y en alcoholes del aceite de oliva de cultivares de Toscana*. *Olivae*. 47; 46 – 51.
- CEE Regulation 1989 (2003). *Characteristic of olive and olive pomace oils and their analytical methods*. Official journal of the European Communities. 295; 57
- Cert, A., Moreda, W., García-Moreno, J. (1997). *Determinación de esteroides y alcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico*. *Grasas y Aceites*. 48; 207 – 218.
- Christopoulou, E., Lazaraki, M., Alexiou, F., Synoury, S., Frangiscos, E. (1996). *Influence of certain factors on the composition of olive-pomace oils. Part II sterol, triterpenic dialcohols and aliphatic alcohols*. *Rivista Italiana Sostanze Grasse*. 73; 201 – 211.
- De La Torre, M.C., López, M.C., Coleil, J. (1985). *Evolución de la fracción esteróica durante la maduración de las aceitunas*. *Grasas y Aceites*. 36; 198–202.
- El Antari, A., Hilal, A., Boulouha, B., El Moudni, A. (2000). *Etude de l'influence de la variété, de l'environnement et des techniques culturales sur les caractéristiques des fruits et la composition chimique de l'huile d'olive vierge extra au Maroc*. *Olivae*. 80; 29 – 36.

- Fiorino, P., Nizzi Grifi, F. (1991). *Maturazione delle olive e variación di alcuni componente dell'olio*. *Olivae*. 35: 25 – 28
- García, M.S. (2001). *Composición química de distintas calidades de aceites de oliva virgen de la variedad 'Empeltre' en bajo de Aragón*. *Grasas y Aceites*. 52; 52 – 57.
- Gregg, F. B. (2001). *US Patent 6, 319, 524*.
- Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruiz, A., Albi, M.A (1999). *Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin oil extracted from the varieties 'Picual' and 'Hojiblanca' and the different components involved*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47; 121 – 127.
- Hidalgo, F.J., León, M.M., y Zamora, R. (2009). *Effect of β – Sitosterol in the antioxidant activity of oxidized lípido – amine reaction products*. *Food Research International*. 42; 1215 – 1222.
- Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M. (2003). *Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels*. *Mayo Clinic Proceedings*. 78; 965 – 978.
- Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., Stefanoudaki, E., Cert, A. (2000). *Estudio sobre las variaciones de determinados parámetros químicos y de los componentes menores de los aceites de oliva virgen obtenidos de aceitunas recolectadas en distintas fases de maduración*. *Olivae*. 80; 22 – 27.
- Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., Stefanoudaki, E.J. (1999). *Effect of extraction System, Stage of ripeness, and Kneading Temperature on the sterol Composition of virgin olive oils*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76; 1477 –1481.

- Kritchevsky, D., Chen, S.D. (2005). *Phytosterols – health benefits and potential concerns: a review*. Nutrition Research. 25; 413 – 428.
- Lerma–García, M.J., Simó–Alfonso, E.F., Méndez, A., Lliberia, J.L., Herrero–Martínez, M.J. (2011). *Classification of extra virgin olive oils according to their genetic variety using linear discriminant analysis of sterol profiles established by ultra – performance liquid chromatography with mass spectrometry detection*. Food Research International. 44; 103 – 108.
- Martínez, J.M., Muñoz, E., Alba, J., Lazón, A. (1975). *Informe sobre la utilización del analizador de rendimiento “Abencor*. Grasas y Aceites. 26; 379.
- Matos, L.C., Cunha, S.C., Amaral, J.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Olivera, B.P (2007). *Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobranc, osa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices*. Food Chemistry. 102; 406 – 414.
- Paniagua – Pérez , R., Madrigal – Bujaidar, E., Reyes – Cadena, S., Álvarez – Gonzáles, I., Sánchez – Chapul, L., Pérez – Gallaga, J., Hernández, N., Flores – Mondragón, G., Velasco, O. (2008). *Cell protection induced by β – Sitosterol: inhibition of genotoxic damage, stimulation of lymphocyte production, and determination of its antioxidante capacity*. Arch. Toxicol. 82; 615 – 622
- Owen, R.W., Giacosas, A., Hull, W.E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000). *Olive oil consumption and health: The possible role of antioxidants*. Lancet Oncology. 1; 107 – 112.

- Owen, R.W., Mier, W., Giacosas, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000a). *The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil*. European Journal of Cancer. 36; 1235 – 1247.
- Owen, R.W., Mier, W., Giacosas, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000b). *Phenolic compounds and squalene in olive oils: The concentration and antioxidant potential of total phenol simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene*. Food and Chemical Toxicology. 38; 647 – 659.
- Ranalli, A., Angerosa, F. (1996). *Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products*. Journal of the American Oil Chemical Society. 73; 417 – 422.
- Rodríguez de la Borbolla, J.M., Gómez Herrera, C., Gómez Caucho, F., Fernández Díez, M.J. (1955). *Conservación de aceitunas de molino*. Sindicato Nacional del Olivo.
- Rozner, S., Garti, N. (2006). *The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 282; 435 – 456.
- Sánchez Casas, J., Osorio Bueno, E., Montañó García, A. M., Martínez Cano, M. (2004). *Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain)*. Food Chemistry. 87; 225 – 230.
- Stefanoudaki, E., Chartzoulakis, K., Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F. (2001). *Effect of drought stress on qualitative characteristics of olive oil of cv.Koroneiki*. Grasas y Aceite. 79; 202 – 206.
- Tedeschini, J., Thomaj, F., Bregasi, M., Panajoti, Dh., Ferraj, B., Bacaj, M., Pitts, C., Pfeirffer, D., Ferguson, L. (2001). *Effect of harvest*

timing on olive fly infestation and olive oil yields and quality. 1st European Meeting of the IOBC/WPRS Study Group “Integrated Control in Olives” 29-31 May 2003, Maich-Chania Crete, Hellas.

Temime, S.B., Manai, H., Methenni, K., Baccouri, B., Abaza, L., Daoud, D., Sánchez, J., Osorio, E., Zarrouk, M. (2008). *Sterolic composition of Chétoi virgin olive oil: Influence of geographical origin.* Food Chemistry. 110; 368 – 374.

Uceda, M., and Frías, L. (1975). *Harvest dates. Evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality.* In: Proceedings del Segundo Seminario Oleícola Internacional Córdoba: COI pp. 125 – 128.

Vivancos, M., Moreno, J.J. (2005). β – *Sitosterol modulates antioxidante enzyme response in RAW 264.7 macrophages.* Free Radical Biology & Medicine, 39; 91 – 97.

VIII.2. Capítulo II. Influencia de las condiciones de molienda del fruto en el contenido de esteroides del aceite de oliva virgen.

Resumen

En este trabajo se ha estudiado, a nivel de almazara, el efecto sobre la fracción esterólica del aceite de oliva virgen del grado de molienda y la velocidad de giro de los martillos en dos tipos de molino: Listello y Criba Perforada, empleando frutos de la variedad 'Picual'. Además, se ha llevado a cabo la comparación entre ambos molinos para un grado de molienda equivalente.

A la vista de los resultados obtenidos, se observa un efecto significativo de estas variables en el contenido en esteroides del aceite de oliva. El molino Listello dio lugar a aceites con contenidos más elevados en esteroides cuando se empleó el mayor grado de molienda y la velocidad de giro más elevada. Los contenidos en Campesterol, Estigmasterol, Clerosterol, β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol, Δ^7 -Estigmastanol, Δ^7 -Avenasterol Esteroides Totales, Eritrodiol y Uvaol fueron significativamente más altos cuando se empleó el molino de Listello utilizando una velocidad de giro de 3000 rpm.

Con el molino de Criba Perforada se han obtenido diferencias significativas en el contenido en esteroides en el aceite cuando se empleó el grado de molienda de 7 mm y la velocidad de giro de 2000 rpm.

En cuanto a la comparación entre los dos tipos de molino, a velocidades altas el molino Listello dio lugar a aceites de oliva con un

elevado contenido de esteroides, en comparación con el molino de Criba Perforada.

Introducción

El aceite de oliva virgen es un producto natural obtenido mediante procedimientos físicos de presión o centrifugación (Boskou, 1996; Di Giovacchino, 1996).

La extracción por medios mecánicos requiere “liberar” el aceite de los tejidos celulares reuniendo las pequeñas gotas en gotas más grandes para que pueda separarse en una fase oleosa continua. Con este fin se llevan a cabo las siguientes operaciones: molturación de las aceitunas, batido de la pasta obtenida, extracción y clarificación final del aceite. Todos estos procesos pueden afectar a la calidad, la composición y las características sensoriales del producto final, y por ello, es necesario optimizar todas las etapas de la extracción del aceite (Kiritsakis, 1998).

Una etapa importante en la elaboración de los aceites es la elección del molino a emplear. El molino ha de garantizar la consecución de una rotura efectiva de las estructuras celulares del fruto con el fin de facilitar la extracción del aceite (Beltrán et al., 2011).

En general, las condiciones de molienda no afectan a los parámetros de calidad reglamentada (Beltrán et al., 2011), por lo que los trabajos se han centrado en los componentes minoritarios del aceite. Así,

diferentes estudios han mostrado que el tipo de molienda tiene gran influencia sobre el contenido en fenoles, así los molinos metálicos dan lugar a aceites con niveles más altos que los de empiedro (Angerosa y Di Giovacchino 1995; Caponio et al., 1999). Además el grado de la molienda, utilizando diámetros de criba pequeños, así como varía la velocidad de giro de los martillos, da lugar a un incremento de estos compuestos (Cert et al., 1999; Di Giovacchino *et al.*, 2002).

Otros componentes que se ven influenciados por el grado de molienda son los compuestos triterpénicos, cuyo contenido en el aceite es más elevado cuando se emplean grados de molienda finos (Allouche et al., 2010). Sin embargo, los pigmentos clorofílicos y carotenoides disminuyen al aumentar el grado de molienda y con el empleo de velocidades de giro más pequeñas (Beltrán et al., 2011).

Los compuestos volátiles de aceite de oliva, que son responsables de aroma del aceite y de otras características organolépticas también se han visto afectado por las condiciones de molienda (Angerosa, 2002).

En general, los estudios se han centrado en los compuestos fenólicos y volátiles (Kalua et al., 2006; Parenti et al., 2008; Gómez-Rico et al., 2009), dejando de lado otros compuestos minoritarios de gran interés como esteroides, escualeno y tocoferoles, entre otros (Allouche et al., 2010).

En el aceite de oliva los esteroides constituyen la parte mayoritaria de la fracción insaponificable. En los últimos años se ha incrementado el interés en los esteroides gracias a sus propiedades para reducir los niveles del colesterol en LDL y en consecuencia del riesgo de enfermedades cardiovasculares (Patel y Thompson, 2006), efectos antiinflamatorios (Bouic, 2002), antibacterianos, (Zhao et al., 2005) antioxidantes (Van Rensburg et al., 2000; Hidalgo et al., 2009) y propiedades anticancerígenas (Awad et al., 2000; Gregg, 2001) así como su implicación en proteger la calidad de los aceites de oliva (Hidalgo et al., 1993). Considerando la importancia de las propiedades bioactivas de los esteroides, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto del tipo de molienda, velocidad de giro de los martillos y grado de la molienda en la composición de los esteroides del aceite de oliva virgen. Para ello, se han empleado dos tipos de molinos Listello y Criba Perforada y se han molturado frutos de la variedad 'Picual'.

Material y Métodos

a) Material Vegetal

Se han utilizado frutos de la variedad 'Picual', procedente de la finca experimental del Centro IFAPA "Venta del Llano" de Mengíbar (Jaén), son árboles de 25 años de edad, dispuestos a un marco de plantación de 7 x 7 m. Se han recolectado aproximadamente 5000 kg de aceituna para cada ensayo con un índice de madurez aproximado de 3, basado en el cambio de color, por pigmentación, de la piel del fruto y del mesocarpio a lo largo del proceso de maduración (Uceda y Frías,

1985). Los frutos fueron recolectados y procesados industrialmente en el mismo día.

b) Condiciones de procesado y extracción.

Se llevaron a cabo tres experimentos diferentes, en los que se evaluó el efecto del grado de molienda y la velocidad de giro de cada molino por separado y se llevó a cabo la comparación entre ambos tipos de molinos en condiciones de molienda equivalentes.

Los ensayos se realizaron en la almazara experimental de Centro IFAPA “*Venta del Llano*”. La almazara está equipada con un sistema continuo formado por un molino de martillos con capacidad de intercambiar la criba perforada por Listellos y un regulado de la velocidad de giro de los martillos, una batidora de tres cuerpos con una capacidad de 600 kg cada uno, y una centrifuga horizontal SC90 de dos fases (Pieralisi, España).

Para cada una de las condiciones ensayadas se emplearon partidas de aproximadamente 500 kg. de frutos. Durante los ensayos no se empleó microtalco natural (MTN) como coadyuvante, y las condiciones de batido fueron de 18 °C y 60 min. El ritmo de inyección de la pasta al decanter fue de 800 kg/h.

Antes de triturar los frutos se ajustaron las variables analizadas para cada tipo de molino. Los ensayos siguieron un diseño factorial; tres

grados de molienda 4 – 5 – 6 mm para el molino de Listello que se corresponden con 5 – 6 – 7 mm utilizados en el molino de Criba Perforada. Las velocidades de giro de los martillos para los dos molinos fueron: 2000, 2250 y 3000 rpm. Para el ensayo de comparación de ambos molinos se emplearon un Listello 5 mm para el molino Listello y una criba de 6 mm para el de Criba Perforada, las velocidades de giro de los martillos ensayadas fueron 2000 y 3000 rpm.

La pasta molida procedente de cada partida dio lugar a un cuerpo de batidora. Las muestras de aceite fueron tomadas por triplicado a la salida del decanter que se filtraron con papel jarabe con el fin de eliminar los restos sólidos y de humedad que aún le acompañaban. Las muestras recién filtradas se llevaron a congelación a una temperatura de -24 °C hasta el momento de ser analizadas.

c) Determinación de los esteroides.

En las muestras de aceite se ha determinado el contenido en esteroides utilizando el método de análisis oficial Europeo descrito en los anexos V y VI del Reglamento CEE (1991).

Para cuantificar la fracción esteróica del aceite de oliva se utilizó un equipo de cromatografía de gases (FID) Helwett Packard modelo 6890, equipado con una columna capilar de HP-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 lm) (Agilent, España).

Las condiciones de separación en el cromatógrafo fueron:

- temperatura de la columna 260 °C
- temperatura del inyector 280 °C
- temperatura del detector 290 °C
- cantidad de sustancia inyectada 0.5 µL.

Se empleó Helio como gas portador. La cuantificación se llevó a cabo mediante la adición de un patrón interno 0.2% de α -colestanol. Los resultados se expresaron como mg/kg de cada esteroide y del contenido total, mientras que la suma del contenido de Eritrodiol más Uvaol y β – Sitosterol estimado se expresaron como %.

d) Análisis estadístico.

Se ha llevado a cabo el análisis de la varianza ANOVA para estudiar el efecto de cada uno de los tratamientos sobre el contenido de los esteroides de los aceites estudiados. Los resultados se han expresado como valor medio \pm desviación estándar (SD). Para establecer diferencias entre medias se ha aplicado el Test de Tukey ($p \leq 0.05$). Se ha empleado el programa de Statistix, Versión 8.0 (Analytical Software).

Resultados y Discusión

Influencia de las condiciones de molienda con molino Listello en el contenido en esteroides en el aceite de oliva.

En la Tabla VIII 2.1 se presentan los valores medios de la composición esterólica del aceite en función de los grados de molienda y de las velocidades de giro de los martillos empleando el molino Listello.

Tabla VIII 2.1. Influencia del grado de molienda (mm) y de la velocidad de giro de los martillos (rpm) en el contenido en esteroides del aceite de oliva extraído con molino Listello.

Esteroides (mg/kg)	Listello (4 mm)			Listello (5 mm)			Listello (6 mm)		
	2000 (rpm)	2250 (rpm)	3000 (rpm)	2000 (rpm)	2250 (rpm)	3000 (rpm)	2000 (rpm)	2250 (rpm)	3000 (rpm)
Colesterol	1.16 ± 0.3 ^a	0.75 ± 0.71	1.44 ± 1.61	0.90 ± 0.81	2.64 ± 0.52	1.20 ± 0.52	0.61 ± 0.31	2.43 ± 1.96	0.20 ± 0.35
Brasicasterol	0.76 ± 0.05	0.39 ± 0.14	0.16 ± 0.27	0.09 ± 0.09	0.08 ± 0.07	1.25 ± 1.74	0.63 ± 0.51	0.19 ± 0.13	0.21 ± 0.20
24-Metilencolesterol	1.67 ± 0.91	2.46 ± 0.86	8.12 ± 5.99	2.21 ± 0.06	6.14 ± 1.64	2.15 ± 0.70	2.53 ± 1.02	3.81 ± 2.44	0.78 ± 1.35
Campesterol	31.5 ± 4.46	29.7 ± 1.94	47 ± 4.85	34.7 ± 4.53	36.4 ± 3.71	42.9 ± 0.91	28.5 ± 1.77	27.7 ± 2.18	44.9 ± 0.41
Campestanol	1.42 ± 0.22	3.35 ± 1.04	4.75 ± 1.59	2.26 ± 1.96	7.89 ± 1.9	2.63 ± 1.43	4.25 ± 0.93	5.87 ± 1.72	0.71 ± 1.24
Estigmasterol	5.30 ± 0.50	5.11 ± 0.22	11.6 ± 4.22	5.12 ± 1.36	10.0 ± 1.67	7.09 ± 0.55	4.18 ± 1.21	6.96 ± 1.61	6.55 ± 0.29
Δ7-Campesterol	19.8 ± 11.5	20.2 ± 12.8	18.1 ± 12.1	15.5 ± 5.98	16.9 ± 8.21	8.63 ± 2.39	19.7 ± 18.1	11.4 ± 5.68	7.64 ± 3.76
Clerosterol	3.92 ± 2.46	12.5 ± 1.52	21.9 ± 6.01	12.5 ± 2.27	17.7 ± 2.65	15.6 ± 3.47	7.04 ± 5.06	12.1 ± 3.26	9.25 ± 1.29
β-Sitosterol	772 ± 44	724 ± 74	900 ± 106	782 ± 116	733 ± 75	1029 ± 98	746 ± 48	622 ± 90	897 ± 219
Sitostanol	1.36 ± 1.67	0.00 ± 0.00	1.75 ± 1.54	0.42 ± 0.72	3.51 ± 1.46	2.95 ± 2.72	0.00 ± 0.00	1.64 ± 1.43	0.00 ± 0.00
Δ5-Avenasterol	55.6 ± 7.05	65.7 ± 4.42	82.2 ± 5.05	81.9 ± 18.8	65.3 ± 3.36	91.4 ± 15.2	61.5 ± 11.2	59.8 ± 10.3	94.9 ± 5.94
Δ5,24-Estigmastadienol	1.88 ± 0.18	7.13 ± 0.90	15.4 ± 3.85	4.25 ± 3.58	13.3 ± 3.98	10.3 ± 5.44	2.99 ± 2.01	7.36 ± 2.9	6.59 ± 3.67
Δ7-Estigmastanol	1.16 ± 0.31	3.92 ± 1.95	9.79 ± 4.63	1.73 ± 0.37	7.1 ± 3.26	5.9 ± 5.45	1.02 ± 0.99	3.62 ± 1.96	3.61 ± 2.05
Δ7-Avenasterol	2.35 ± 0.37	3.86 ± 1.04	7.35 ± 2.22	2.57 ± 0.66	6.6 ± 0.77	4.4 ± 0.75	3.42 ± 2.42	4.61 ± 1.39	5.22 ± 0.94
Esteroides Totales	900 ± 44	881 ± 84	1130 ± 67	947 ± 140	929 ± 83	1226 ± 120	882 ± 72	769 ± 87	1061 ± 217
β-Sitosterol Estimado (%)	92.6 ± 1.15	89.2 ± 1.62	90.2 ± 3.54	93.1 ± 0.25	91.1 ± 2.42	93.7 ± .072	92.7 ± 1.66	90.2 ± 3.54	93.0 ± 2.14
Eritrodiol	3.85 ± 0.73	5.99 ± 3.74	7.67 ± 1.44	4.03 ± 2.71	6.87 ± 2.55	6.04 ± 1.23	3.17 ± 1.09	4.29 ± 0.62	6.25 ± 0.66
Uvaol	1.25 ± 0.8	1.43 ± 0.63	2.96 ± 0.58	0.83 ± 1.1	1.49 ± 0.27	2.86 ± 0.67	1.37 ± 1.27	2.12 ± 0.19	2.39 ± 0.27
Eritrodiol+Uvaol (%)	0.56 ± 0.06	0.83 ± 0.5	0.93 ± 3.51	0.44 ± 0.31	0.88 ± 1.52	0.71 ± 0.08	0.53 ± 0.32	0.83 ± 0.19	0.84 ± 0.25

a,. Media ± SD

Como se observa en la Tabla VIII 2.1 la composición de los esteroides totales del aceite extraído con el molino Listello, muestran unos niveles de esteroides totales entre 769 y 1226 mg/kg. Cuando los frutos se trituraron empleando velocidades de giro bajas se observó un descenso del contenido total de los esteroides en el aceite. Los niveles no superaban el límite (1000 mg/kg) establecido por el Reglamento de CEE, (2003).

En los estudios realizados por Guillaume et al. (2012) se menciona que el hueso de aceituna contiene un contenido más elevado de esteroides que la pulpa del fruto. Por tanto, cuando se utiliza el molino de Listello se emplea una trituración más fina utilizando altas velocidades de giro de los martillos permitir a extraer un mayor contenido de esteroides en el aceite.

En la Tabla VIII 2.2 está recogido el porcentaje de la variabilidad explicada para las condiciones de molienda de la composición de los esteroides y su contenido total. En general, la velocidad de giro influyó de forma más importante en los esteroides que el grado de molienda. El grado de molienda dio lugar a diferencias significativas en el contenido en Campesterol, Clerosterol y Sitostanol ($P \leq 0.05$). En cuanto a la velocidad de giro de los martillos, para Campesterol, Δ^5 -Avenasterol y Esteroides Totales, se obtuvo un nivel de significación de $P \leq 0.0001$.

Tabla VIII 2.2. Porcentaje de variabilidad explicada por las condiciones de molienda en contenido de esteroides presentes en el aceite de oliva virgen

Esteroides	Diámetro de criba (Ø) (mm)	Velocidad de giros (V) (rpm)	(Ø) (mm) x (V) (rpm)	Error
24-Metilcolesterol	6.3 ^{NS}	9.0 ^{NS}	42.3 ^{**}	65.4
Campesterol	5.5 [*]	74.1 ^{***}	8.6 [*]	11.8
Campestanol	3.7 ^{NS}	35.3 ^{**}	37.6 ^{**}	23.4
Estigmasterol	6.7 ^{NS}	29.9 ^{**}	36.3 [*]	27.1
Clerosterol	16.3 [*]	32.9 ^{**}	37.6 ^{**}	24.7
β-Sitosterol	8.0 ^{NS}	50.2 ^{**}	3.6 ^{NS}	38.2
Sitostanol	19.2 [*]	8.8 ^{NS}	26.4 ^{NS}	49.5
Δ⁵-Avenasterol	8.9 ^{NS}	51.9 ^{***}	11.9 ^{NS}	27.4
Δ⁵.24 Estigmastadienol	8.6 ^{NS}	41.4 ^{**}	18.6 ^{NS}	31.1
Δ⁷-Estigmastanol	8.0 ^{NS}	34.9 [*]	14.9 ^{NS}	42.1
Δ⁷-Avenasterol	0.1 ^{NS}	40.3 ^{**}	27.3 [*]	32.3
Esteroides Totales	10.6 ^{NS}	55.6 ^{***}	1.7 ^{NS}	32.0
Eritrodiol	12.3 ^{NS}	60.6 [*]	11.6 ^{NS}	99.9
Uvaol	1.1 ^{NS}	50 ^{**}	7.1 ^{NS}	41.8
Σ Eritrodiol y Uvaol	2.2 ^{NS}	31.6 [*]	2.8 ^{NS}	63.0

NS – no significativo, * – $P \leq 0.05$, ** – $P \leq 0.01$, *** – $P \leq 0.0001$

En general, para los esteroides Campesterol, Clerosterol y Sitostanol, se obtuvieron contenidos más elevados cuando las aceitunas se trituraron mediante el Listello de 5 mm (Figura VIII 2.1).

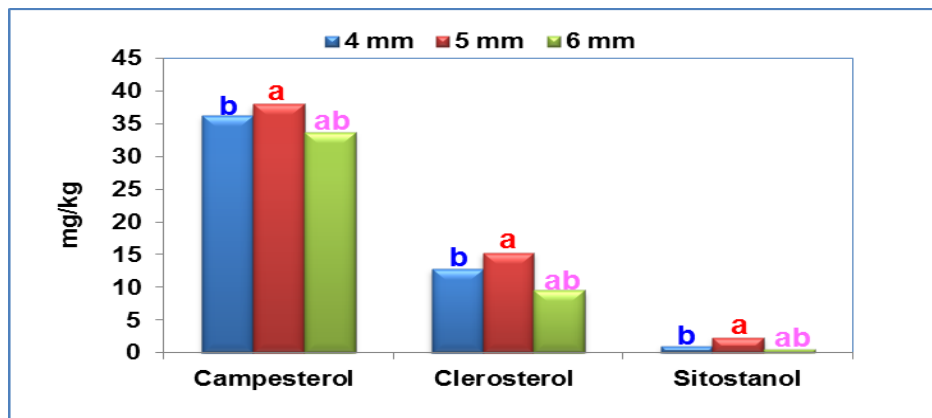


Figura VIII 2.1 Influencia de grado de molienda en el contenido de Campesterol, Clerosterol y Sitostanol en el aceite de oliva virgen obtenido mediante molino Listello (Test de Tukey $p \leq 0.05$).

Por otro lado, esteroides como Estigmasterol, $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol, Δ^7 -Estigmastanol y Δ^7 -Avenasterol, presentaron unos valores significativamente más bajos para la velocidad de giro de 2000 rpm (Figura VIII 2.2). Se aprecia, un incremento lineal con el aumento del régimen de giro de los martillos para todos estos compuestos.

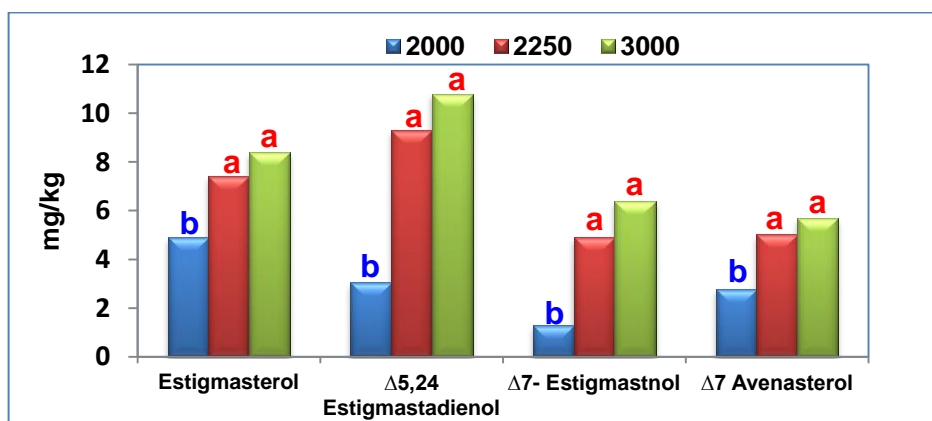


Figura VIII 2.2. Influencia de la velocidad de giro en el contenido en Estigmasterol, $\Delta^5, 24$ -Estigmastadienol, Δ^7 -Estigmastanol y Δ^7 -Aveasterol en el aceite de oliva virgen obtenido mediante molino Listello (Test de Tukey $p \leq 0.05$).

Asimismo, habría que destacar como el contenido en Campestanol y la suma de Eritrodiol y Uvaol presentaran valores significativamente más altos cuando el régimen de giro de los martillos fue de 2250 rpm.

El Eritrodiol y Uvaol, están presentes de forma mayoritarias en la piel de la aceituna (Frega y Lercker, 1986, Bianchi et al., 1992). Por lo que se necesita una molienda más fina para romper las estructuras celulares y liberar dichos compuestos. El contenido de estos compuestos es significativamente más alto cuando se velocidades de giros muy altas. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos realizados Alluche et al. (2010), sin embargo, en los trabajos previos realizados por Cert et al., (1999) no se obtuvieron diferencias significativas para las condiciones de molienda empleadas.

En cuanto a la interacción entre el grado de la molienda y la velocidad de giro de los martillos utilizados en este trabajo, solo se vieron afectados significativamente Campesterol, Estigmasterol, Δ^7 -Estigmastanol y Uvaol obteniéndose valores más altos cuando los frutos se trituraron con un grado de molienda pequeño y velocidades de giros altas (Figura VIII 2.3).

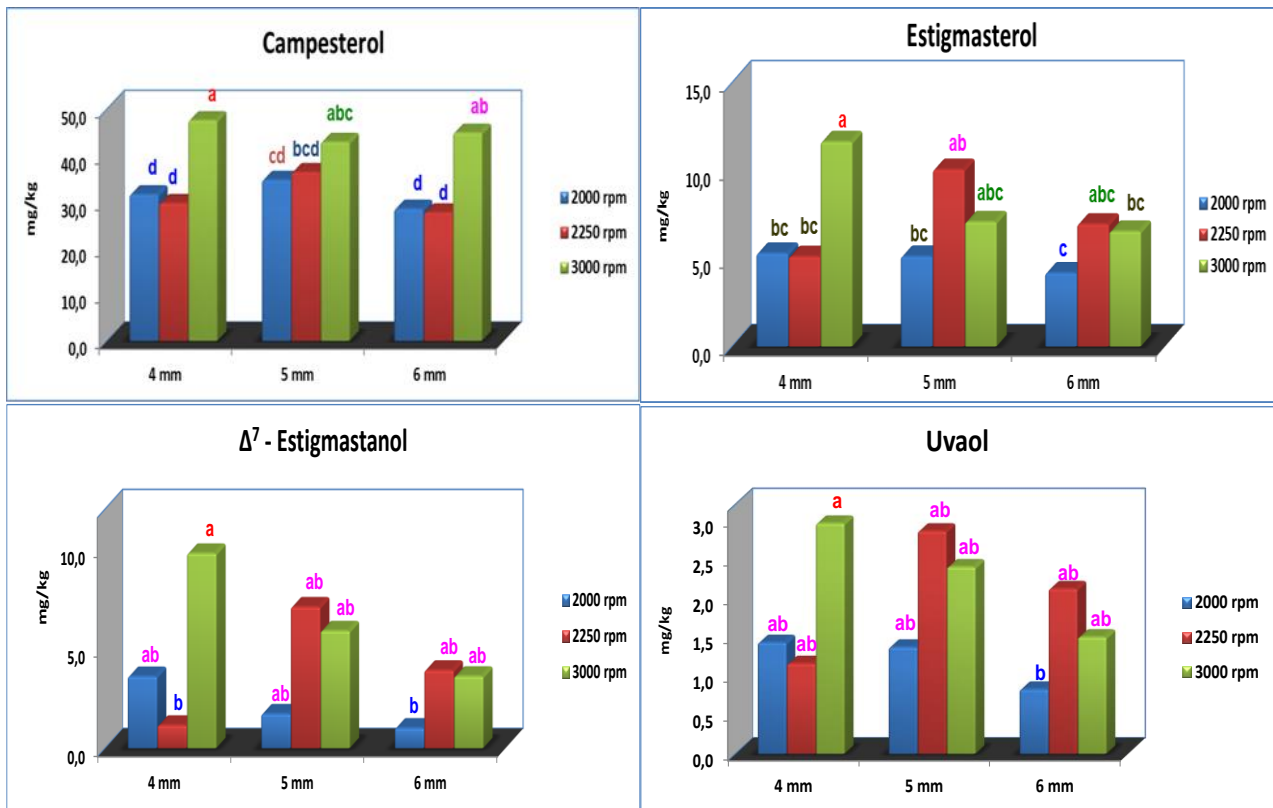


Figura VIII 2.3. Interacción entre el grado de molienda y la velocidad de giro de los martillos del molino Listello para el contenido de Campesterol, Estigmasterol, Δ^7 -Estigmasterol y Uvaol del aceite de oliva virgen (Test de Tukey $p \leq 0.05$)

Clerosterol, $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol y Δ^7 -Avenasterol mostraron niveles significativamente más altos cuando las aceitunas se molieron con una velocidad de 3000 rpm, a pesar de diferentes tamaños de Listello (Figura VIII 2.4).

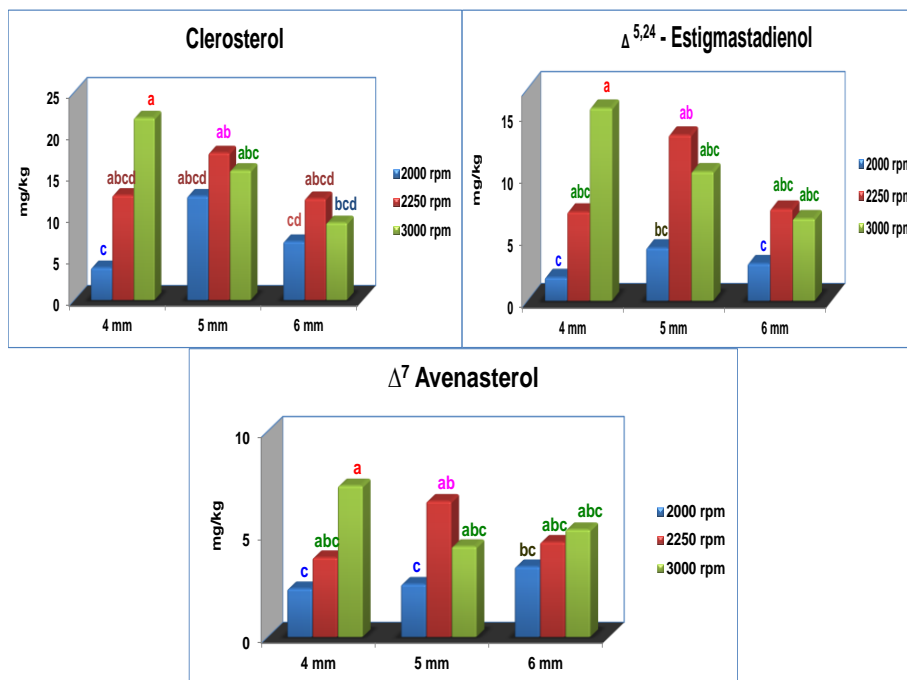


Figura VIII 2.4. Efecto de la interacción entre la velocidad de giro y grado de la molienda en el contenido en Clerosterol, $\Delta^5, 24$ -Estigmastadienol y Δ^7 -Avenasterol del aceite de oliva virgen obtenido con molino de Listello (Test de Tukey $p \leq 0.05$).

El contenido en β -Sitosterol y Esteroles totales presentaron valores significativamente más altos cuando las aceitunas se molturaron utilizando tamaño de Listello de 5 mm y una velocidad de giro de 3000 rpm, aunque en general, las velocidades más elevadas den lugar a aceites con alto contenidos en β -Sitosterol (Figura VIII 2.5).

Los niveles más bajos se obtuvieron para velocidades de giro de 2250 rpm, independientemente del grado de molienda.

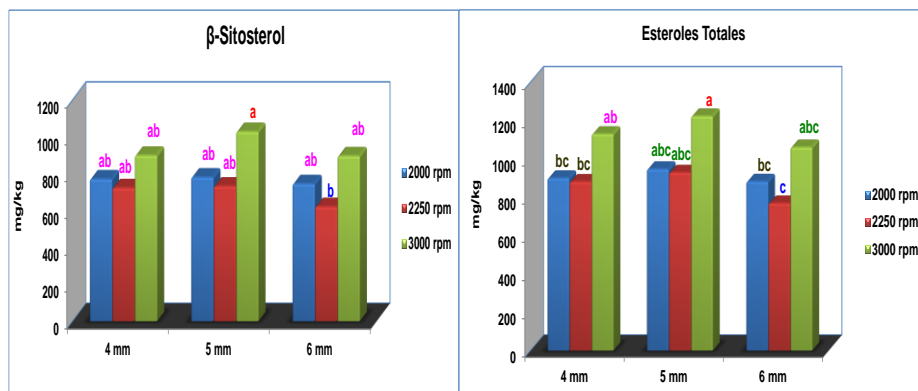


Figura VIII 2.5. Efecto de la interacción del grado de la molienda y velocidad de giro en el contenido en β -Sitosterol y Esteroles Totales del aceite de oliva virgen obtenido con molino de Listello (Test de Tukey $p \leq 0.05$).

Además, el contenido en 24-Metilcolesterol mostro unos valores mayores cuando las aceitunas se trituran utilizando grados de molienda de 4 mm ($P \leq 0.001$). Por lo tanto, se consigue una mejor extracción de los esteroles a regímenes de giros más elevadas y grados de molienda menores.

Influencia de las condiciones de molienda con molino de criba Perforada en el contenido en esteroles del aceite de oliva.

El contenido y composición en esteroles del aceite de oliva virgen elaborado con el molino de Criba Perforada se presenta en la Tabla VIII

2.3., los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos por el Reglamento de CEE, (2003).

En general, se observa que cuando las aceitunas se trituran con el molino de Criba Perforada se obtiene un mayor contenido en esteroides cuando se utilizan velocidades de giro muy bajas, y grados de molienda mayores.

Tabla VIII 2.3. Influencia del grado de molienda (mm) y de la velocidad de giro de los martillos (rpm) en el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen extraído con molino de criba Perforada

Esteroides (mg/kg)	Criba Perforada (5 mm)			Criba Perforada (6 mm)			Criba Perforada (7 mm)		
	2000 rpm	2250 rpm	3000 rpm	2000 rpm	2250 rpm	3000 rpm	2000 rpm	2250 rpm	3000 rpm
Colesterol	0.53 ± 0.21a	0.39 ± 0.01	0.44 ± 0.46	0.20 ± 0.34	0.24 ± 0.41	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.39 ± 0.21	0.0 ± 0.00
Brassicasterol	0.00 ± 0.00	0.60 ± 0.41	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.25	0.08 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.09	0.22 ± 0.38
24-Metilencolesterol	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.43 ± 0.83	0.24 ± 0.42	0.42 ± 0.32	0.00 ± 0.00	0.43 ± 0.74	0.53 ± 0.23	0.00 ± 0.00
Campesterol	44.6 ± 2.11	47.5 ± 3.86	36.4 ± 5.03	41.0 ± 7.04	39.0 ± 6.47	36.6 ± 2.84	56.0 ± 11.0	41.1 ± 2.63	39.7 ± 1.84
Campestanol	2.52 ± 2.19	0.48 ± 0.84	1.80 ± 0.59	0.84 ± 1.45	1.11 ± 1.92	2.70 ± 2.36	0.00 ± 0.00	3.11 ± 0.71	1.97 ± 1.73
estigmasterol	8.20 ± 0.37	9.04 ± 1.59	7.82 ± 0.65	6.78 ± 1.61	7.53 ± 1.09	5.48 ± 2.20	10.2 ± 2.13	7.18 ± 0.81	5.52 ± 2.16
Δ7-Campesterol	5.42 ± 2.40	9.83 ± 6.97	4.89 ± 1.24	2.97 ± 1.02	6.36 ± 5.99	13.5 ± 10.9	21.8 ± 16.1	6.23 ± 5.77	8.08 ± 7.98
Clerosterol	13.5 ± 3.45	12.4 ± 4.38	7.44 ± 2.62	7.53 ± 3.19	13.4 ± 9.96	2.93 ± 1.16	12.7 ± 1.92	7.39 ± 0.56	4.75 ± 1.84
β-Sitosterol	1081 ± 69	1104 ± 108	1023 ± 67	1029 ± 75	998 ± 94	971 ± 33	1328 ± 291	1016 ± 88	981 ± 19
Sitostanol	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.70	0.29 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.59 ± 1.02	0.00 ± 0.00	0.43 ± 0.76	0.66 ± 1.14
Δ5-Avenasterol	114.0 ± 8.50	122 ± 22.2	101.0 ± 3.68	101.0 ± 0.97	99.0 ± 11.7	96.3 ± 7.26	144.0 ± 33.6	104.3 ± 4.75	101.0 ± 2.25
Δ5,24-Estigmastadienol	3.10 ± 0.36	4.30 ± 1.14	2.77 ± 0.94	3.33 ± 0.74	4.79 ± 1.30	3.50 ± 0.61	6.35 ± 2.52	4.24 ± 1.44	4.01 ± 1.17
Δ7-Estigmastanol	2.36 ± 0.32	2.69 ± 0.22	2.03 ± 0.50	1.97 ± 0.29	2.66 ± 0.60	1.20 ± 0.92	3.44 ± 0.91	2.32 ± 0.09	3.15 ± 1.33
Δ7-Avenasterol	5.04 ± 0.38	5.31 ± 0.55	4.93 ± 0.51	4.85 ± 0.52	4.95 ± 0.56	4.52 ± 0.68	6.46 ± 1.75	5.11 ± 0.19	5.64 ± 0.80
Esteroides Totales	1281 ± 77	1320 ± 139	1194 ± 75	1201 ± 96	1178 ± 111	1138 ± 43	1590 ± 351	1198 ± 92	1157 ± 28
β-Sitosterol Estimado (%)	94.6 ± 0.23	95.3 ± 0.64	95.0 ± 0.33	95.1 ± 0.41	95.0 ± 0.64	94.0 ± .037	93.8 ± 0.94	94.5 ± 0.66	94.0 ± 0.80
Eritrodiol	6.68 ± 1.62	6.91 ± 0.93	4.86 ± 1.12	7.93 ± 4.68	5.82 ± 2.42	3.31 ± 1.06	7.45 ± 0.91	3.96 ± 1.08	4.18 ± 2.02
Uvaol	3.21 ± 1.13	2.56 ± 1.00	3.16 ± 1.11	2.51 ± 0.89	3.15 ± 1.29	1.66 ± 0.47	3.24 ± 0.61	3.16 ± 0.13	3.63 ± 2.38
Eritrodiol+Uvaol (%)	0.76 ± 0.18	0.71 ± 0.08	0.66 ± 0.15	0.84 ± 0.41	0.74 ± 0.21	0.43 ± 0.10	0.68 ± 0.09	1.2 ± 0.94	0.66 ± 0.35

a, Media ± SD

En la Tabla VIII 2.3 se observa el efecto de las condiciones de molienda empleando el molino de Criba Perforada en el perfil de los esteroides y su contenido total en el aceite de oliva a partir de los datos obtenido del ANOVA la Tabla VIII 2.4 muestra el porcentaje de la variabilidad originado por las condiciones de molienda en el contenido de los esteroides del aceite de oliva virgen. Como se puede observar hay un menor número de esteroides influenciados por las condiciones de molienda ($P \leq 0.05$), además el grado de significación obtenido fue menor que los encontrados con el molino de Listello ($P \leq 0.0001$).

Tabla VIII 2.4 Porcentaje de variabilidad explicada por las condiciones del molino de Criba Perforada para algunos esteroides presentes en el aceite de oliva virgen.

Esteroides	Diámetro de criba (Ø) (mm)	Velocidad de giros (V) (rpm)	(Ø) (mm) x (V) (rpm)	Error
<i>Colesterol</i>	26.7 *	7.5 ^{NS}	12.0 ^{NS}	53.8
<i>Brassicasterol</i>	4.4 ^{NS}	13.6 ^{NS}	34.9 *	48.8
<i>Campesterol</i>	13.9 *	28.2 *	20.4 ^{NS}	37.5
<i>Estigmasterol</i>	13.6 ^{NS}	22.3 *	20.0 ^{NS}	43.6
<i>Clerosterol</i>	7.8 ^{NS}	32.5 *	14.9 ^{NS}	44.8
<i>β-Sitosterol</i>	10.0 ^{NS}	20.4 *	22.3 ^{NS}	47.3
<i>Δ⁵-Avenasterol</i>	15.8 *	19.5 *	23.0 ^{NS}	41.6
<i>Δ⁷-Estigmastanol</i>	24.8 *	6.2 ^{NS}	24.3 ^{NS}	44.7
<i>Esteroides Totales</i>	11.1 ^{NS}	20.7 *	23.7 ^{NS}	44.5

NS – no significativo, * – $P \leq 0.05$

En general, el grado de molienda no mostró un efecto significativo en el contenido de los esteroides mayoritarios. No obstante, cuando las aceitunas se trituraron con la ayuda de una criba de diámetro 7 mm los

contenidos en $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol y Δ^7 -Estigmastanol fueron significativamente más altos. El colesterol, sin embargo, se incrementó significativamente ($P \leq 0.05$) cuando se empleó un grado de molienda de menor diámetro (Figura VIII 2.6).

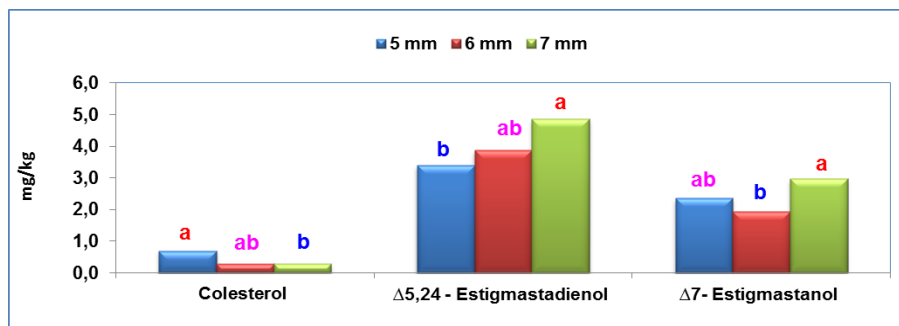


Figura VIII 2.6. Influencia de grado de molienda en el contenido en Colesterol, $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol y Δ^7 -Estigmastanol en el aceite de oliva virgen obtenido mediante el empleo de molino Criba Perforada (Test de Tukey $p \leq 0.05$).

La Figura VIII 2.7 muestra el incremento del contenido de los esteroides mayoritarios (Campesterol, Estigmasterol, Clerosterol, β -Sitosterol y Δ^5 -Avenasterol) y del contenido total cuando se molturó a la velocidad de giro más baja (2000 rpm).

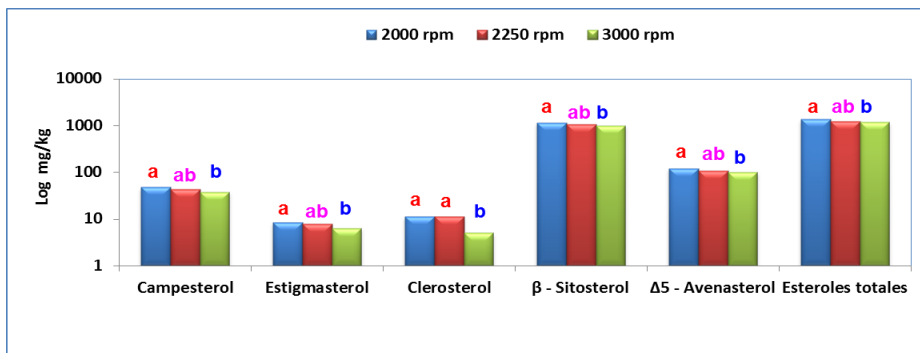


Figura VIII 2.7 Efecto de la velocidad de giro de los martillos en el contenido de los esteroides mayoritarios y esteroides totales de aceite de oliva virgen extraído con molino de Criba Perforada (Test de Tukey $p \leq 0.05$).

En cuanto a la interacción del grado de molienda y la velocidad de giro de los martillos, se observó como el contenido en Campesterol, Estigmasterol, Δ^5 -Avenasterol $\Delta^5,24$ -Estigmastadienol, Δ^7 -Estigmastanol y Esteroides Totales fueron significativamente más altos cuando se emplearon grados de molienda de mayor diámetro y velocidades de giro bajas (Figura VIII 2.8).

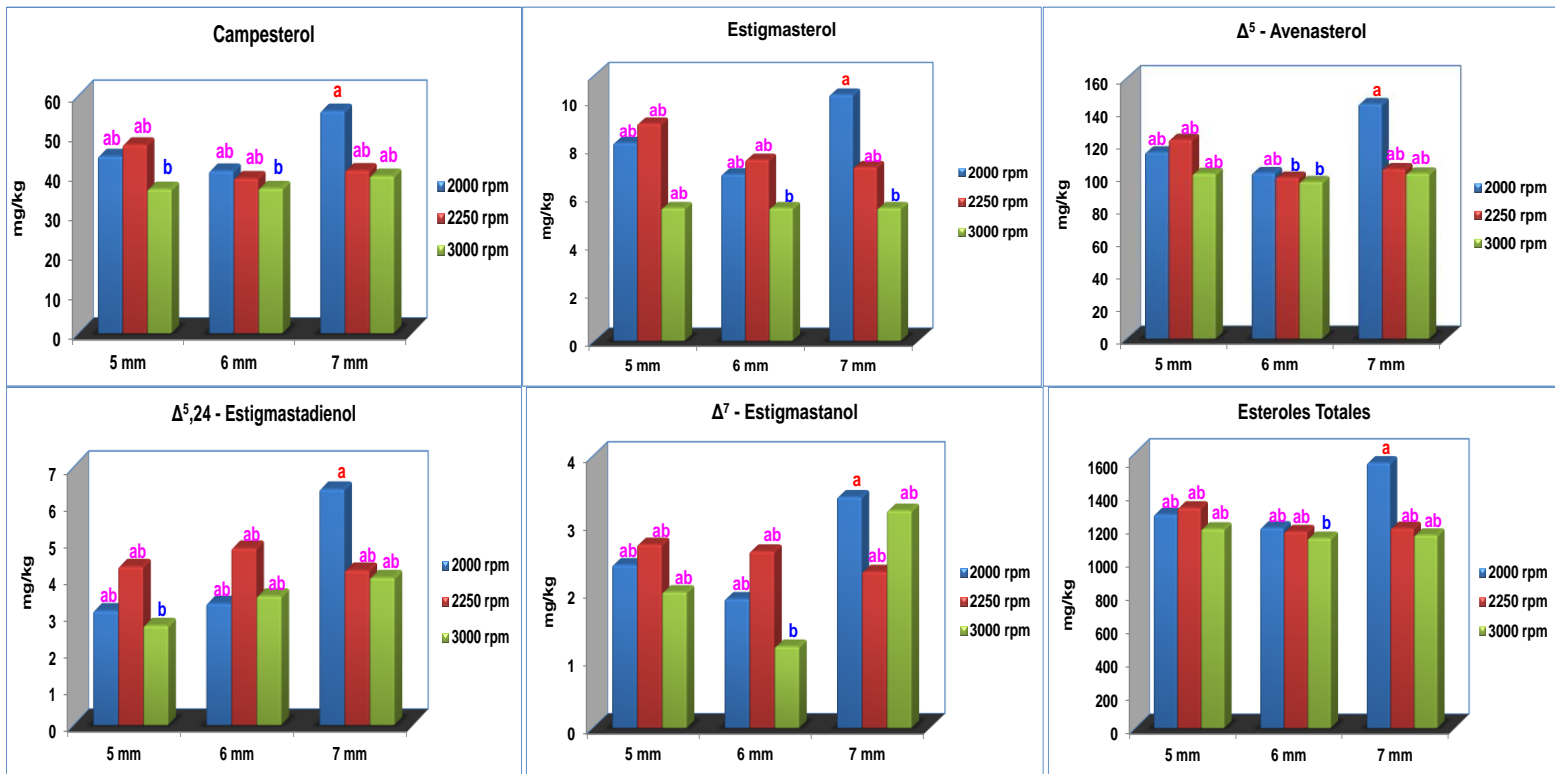


Figura VIII 2.8. Interacción entre el grado de molienda y la velocidad de giro de los martillos del molino de Criba Perforada para el contenido de Campesterol, Estigmasterol, Δ^5 - Avenasterol, $\Delta^5,24$ - Estigmastadienol, Δ^7 - Estigmasterol y Esteroles Totales del aceite de oliva virgen (Test de Tukey $p \leq 0.05$)

Efecto de tipo de molino en la fracción esterólica del aceite de oliva virgen entre. Comparar entre los molinos Listello y Criba Perforada.

La composición de los esteroides de los aceites elaborados con los molinos Listello y Criba Perforada para diferentes velocidades de giro 2000 y 3000 rpm se recogen en la Tabla VIII 2.5. El contenido total de esteroides se encuentra dentro de los límites establecidos por el Reglamento de CEE, (2003), con algunas excepciones como en el β -Sitosterol estimado que presenta valores por debajo de estos límites cuando se empleó una velocidad de giro de los martillos menor.

Tabla VIII 2.5. Efecto del tipo de molienda en la composición de la fracción esterólica del aceite de oliva virgen

Esteroles (mg/kg)	Listello (5 mm)		Martillo (6 mm)	
	2000 rpm	3000 rpm	2000 rpm	3000 rpm
Colesterol	2.93 ± 1.2 ^a	1.48 ± 1.4	3.90 ± 1.1	0.00 ± 0.0
Brasicasterol	1.65 ± 1.9	0.00 ± 0.0	0.44 ± 0.8	0.00 ± 0.0
24-Metilencolesterol	5.22 ± 2.5	6.35 ± 3.7	6.43 ± 2.5	2.18 ± 21
Campesterol	49.9 ± 3.0	47.6 ± 6.4	43.4 ± 3.3	47.3 ± 5.2
Campestanol	4.86 ± 1.9	0.00 ± 0.0	6.43 ± 0.8	0.00 ± 0.0
estigmasterol	8.85 ± 0.8	9.82 ± 1.3	10.0 ± 0.6	5.69 ± 0.5
Δ⁷-Campesterol	22.3 ± 12.3	19.5 ± 14	15.2 ± 10	13.9 ± 0.9
Clerosterol	1.60 ± 3.7	12.2 ± 6.3	17.2 ± 1.5	10.0 ± 0.5
β-Sitosterol	1020 ± 18	898 ± 122	883 ± 53	982 ± 67
Sitostanol	0.00 ± 0.0	2.15 ± 3.7	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
Δ⁵-Avenasterol	105.1 ± 3.2	95.1 ± 3.6	99.2 ± 13	112 ± 9.7
Δ⁵,24-Estigmastadienol	8.34 ± 0.4	8.74 ± 1.8	9.88 ± 0.8	5.25 ± 3.8
Δ⁷-Estigmastanol	5.81 ± 1.2	5.40 ± 2.0	6.98 ± 0.9	4.08 ± 2.5
Δ⁷-Avenasterol	8.16 ± 0.5	7.08 ± 0.5	8.34 ± 2.1	5.80 ± 1.7
Esteroles Totales	1254 ± 39	1114 ± 110	1111 ± 63	1189 ± 80
Σ β-Sitosterol (%)	91.2 ± 1.5	91.1 ± 1.4	90.8 ± 1.0	93.5 ± 0.8
Eritrodiol	7.20 ± 0.5	8.40 ± 2.3	10.9 ± 1.3	9.16 ± 1.9
Uvaol	2.93 ± 0.7	3.63 ± 0.5	3.06 ± 2.7	1.73 ± 0.4
Eritrodiol+Uvaol (%)	0.80 ± 0.1	1.06 ± 0.2	1.26 ± 0.4	0.90 ± 0.1

a, Media ± SD

En general, el molino Listello dio lugar a unos niveles más elevados de esteroides presentes en aceite de oliva, si bien, en la Figura VIII 2.9 se demuestra la diferencia significativa del contenido de Estigmasterol.

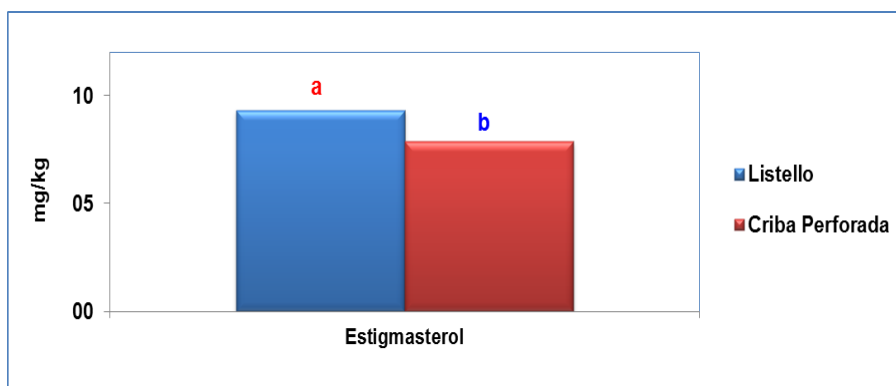


Figura VIII. 2.9. Diferencia significativa del contenido de Estigmasterol del aceite de oliva virgen obtenido por dos tipos de molino (Test de Tukey $p \leq 0.05$).

En cuanto a la velocidad de giro de los martillos se observaron diferencias significativas por algunos de los esteroides analizados como Colesterol, Campestanol, Estigmasterol y Δ^5 -Avenasterol. Sus contenidos fueron significativamente más elevados con velocidades de giro menores (Figura VIII 2.10).

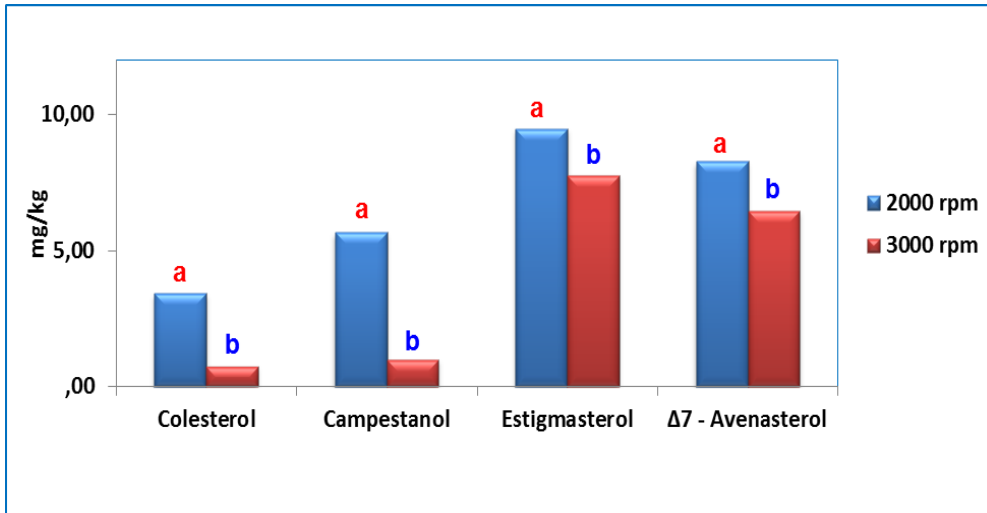


Figura VIII.2.10. Efecto de la velocidad de giro de los martillos en el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen obtenidos empleando los molinos de Listello y Criba Perforada (Test de Tukey $p \leq 0.05$).

En la Tabla VIII 2.6 está recogido el porcentaje de variabilidad expresado por el tipo de molino y la velocidad de giro de los martillos. Los dos molinos presentaron un efecto significativo ($P \leq 0.05$) en la composición esteroica del aceite de oliva virgen.

Tabla VIII 2.6 Porcentaje de variabilidad explicada por el tipo de molino y la velocidad de giro de los martillos para algunos esteroides presentes en el aceite de oliva virgen.

Esteroides	Molino (Ø) (mm)	Velocidad de giros (V) (rpm)	(Ø) (mm) x (V) (rpm)	Error
Colesterol	60.2 *	0.5 ^{NS}	12.6 ^{NS}	26.7
Campesterol	1.7 ^{NS}	88.5 ***	1.7 ^{NS}	8.1
Estigmasterol	15.1 *	20.4 *	50.4 **	14.1
β-Sitosterol	2.5 ^{NS}	0.5 ^{NS}	43.2 *	53.8
Δ⁵-Avenasterol	9.2 ^{NS}	0.3 ^{NS}	37.8 *	52.2
Δ⁷-Avenasterol	3.3 ^{NS}	35.6 *	5.9 ^{NS}	55.3
Esteroides Totales	3.9 ^{NS}	3.3 ^{NS}	39.4 *	53.4
Eritrodiol	35.3 *	0.6 ^{NS}	15.5 ^{NS}	48.6
Σ Eritrodiol y Uvaol	8.9 ^{NS}	0.9 ^{NS}	38.1 *	51.6

NS – no significativo, * – $P \leq 0.05$, ** – $P \leq 0.01$, *** – $P \leq 0.0001$

En general, el tipo de molino mostro un efecto significativo en el contenido de Colesterol y Estigmasterol ($P \leq 0.05$), en cuanto a la velocidad de giro de los martillos obtuvo diferencias significativas en el contenido de Campesterol con un nivel de significancia de $P \leq 0.0001$ y Δ^7 -Avenasterol ($P \leq 0.05$).

Además en la interacción entre el tipo de molino y la velocidad de giro de los martillos se observó que, el contenido en Campestanol mostró valores más elevados en cuando las aceitunas se molieron con el molino de Cribas Perforada a 2000 rpm (6.43 mg/kg), respecto a los obtenidos con el molino de Listello (4.86 mg/kg), aunque estos niveles no presentaron diferencias

significativas. Para velocidades de giro de los martillos 3000 rpm para los dos tipos de molino no mostraron esté esterol.

La Figura VIII 2. 11 muestra el efecto de la interacción del tipo de molino y la velocidad de giro de los martillos en el contenido en Estigmasterol. Se observa que cuando las velocidades de giro de los martillos se reducen de 3000 a 2000 rpm, para el molino de Criba Perforada el contenido en Estigmasterol se aumentó significativamente, sin embargo, para el molino de Listello la concentración de Estigmasterol fue más elevado cuanto se molidó 3000 rpm.

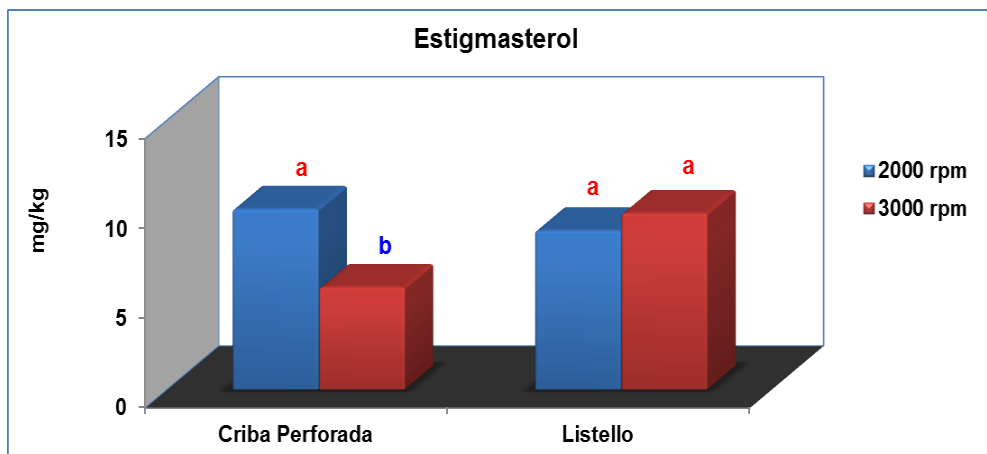


Figura VIII 2.11. Efecto de la interacción entre el tipo de molino y la velocidad de giro de los martillos en el contenido en Estigmasterol del aceite de oliva virgen extra (Test de Tukey $p \leq 0.05$).

Conclusiones

Se puede concluir que el proceso de la molienda es un factor determinante en el contenido en esteroides en el aceite de oliva. Se ha observado que para grados de moliendas de mayor tamaño, el contenido en esteroides totales y del perfil completo se incrementa tanto con el molino de Listello como de Criba Perforada.

Los dos molinos se comportaron de manera diferente en cuanto a al efecto de la velocidad de giro de los martillos. Los mayores contenidos en esteroides se obtienen a velocidades altas para el molino de Listello, mientras que el molino de Criba Perforada requiere velocidades bajas para este fin.

Los resultados de este estudio sugieren que para extraer el mayor contenido de esteroides en el aceite de oliva es aconsejable una trituración muy fina.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que es muy importante la elección del tipo de molino y los variables que se tiene utilizar para obtener diferentes contenidos en esteroides en aceite de oliva virgen. En este sentido el presente trabajo podría ser útil desde el punto de vista nutricional, debido a los efectos de los esteroides en la salud.

Referencias

- Allouche, Y., Jimenez, A., Uceda, M., Aguilera, M.P., Gaforio, J.J., Beltrán, G. (2010). *Influence of olive past preparation condition on virgin olive oil triterpenic compounds at laboratory – scale*. Food Chemistry. 119; 765 – 769.
- Angerosa, F., Di Giovacchino, L. (1995). *Caratteristiche di qualità dell'olio di oliva vergine in relazione ai metodi di frangitura*. Nota II. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse. 72; 1 – 6.
- Angerosa, F. (2002). *Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels*. European Journal of Lipid Science and Technology. 104; 639 – 660.
- Awad, A.B., Downie, A., Fink, C.S., Kim, U. (2000). *Dietary phytosterols inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice*. Anticancer Research. 20; 821 – 824.
- Beltran, G., Aguilera, M.P., Allouche, Y., Jimenez, A. (2011). *Efecto de las condiciones de molienda del molino Listello sobre el rendimiento del proceso y las características del aceite*. Expoliva'11. XV Simposio científico-técnico del aceite de oliva. Foro de la Industria, Tecnología y Calidad Oleícola: Ind – 45.
- Beltrán, G., Aguilera, M.P., Jiménez, A. (2011). *Elaboración de aceites de oliva singulares, un modo de diferenciación de la calidad*. Oleo. 143; 54 – 61.
- Bianchi, G., Murelli, C., Gomes, T. (1992). *Surface waxes from olive fruits*. Phytochemistry. 31; 3503 – 3506.

- Boskou, D. (1996). *Olive oil composition*. En: "Olive oil chemistry and technology" Boskou, D. Eds. AOCS Press. Champaign, Illinois.
- Bouic, P.J. (2002). *Sterols and sterolins: New drugs for the immune system?* Drug Discovery Today. 7; 775 – 778.
- Caponio, F., Alloggio, V., Gomez, T. (1999). *Phenolic compounds of virgin olive oil: Influence of past preparation techniques*. Food Chemistry. 64; 201 – 206.
- CEE (2003). *Characteristics of olive and olive pomace oils and their analytical methods*. EEC Regulation 1989/2003. Official Journal of the European Communities. 295; 57 – 66.
- Cert, A., Alba, J., Pérez – Comino, M.C., Riuz – Gómez, A., Hidalgo, F., Moreda, W. (1999). *Influencia de los sistemas de extracción sobre las características y de los componentes menores del aceite de oliva virgen extra*. Olivae. 79; 41 – 50.
- Christopoulou, E., Lazaraki, M., Alexiou, F., Synoury, S., Frangiscos, E. (1996). *Influence of certain factors on the composition of olive–pomace oils. Part II sterol, triterpenic dialcohols and aliphatic alcohols*. La rivista Italiana della Sostanze Grasse. 73; 201 – 211.
- Di Giovacchino, L. (1996). *Influencia de los sistemas de extracción en la calidad de aceite de oliva*. Olivae. 63; 52 – 63.
- Di Giovacchino, L., Costantini, N., Ferrante, M.L., Serraiocco, A. (2002). *Influence of melaxation time of olive paste on olive oil extraction yields and chemical and organoleptic characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving*. Grasas y Aceites. 53; 179 – 186.
- Frega, N., Lercker, G. (1986). *Lipid minor components of the olive drupe in different steps of ripening*. La rivista Italiana della Sostanze Grasse. 63; 393 – 398.

- Guillaume, C., Ravetti, L., Lala, D., Johnson, R.J. (2011). *Technological Factors Affecting Sterols in Australian Olive Oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 89; 29 -40.
- Gomez-Rico, A., Inarejos-Garcia, A.M., Salvador, M.D., Fregapane, G. (2009). *Effect of melaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive oils paste and the corresponding virgin olive oils (Olea europaea L. Cv. Cornicabra)*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 57; 3587 – 3595.
- Gregg, F.B. (2001). *US Patent*. 6; 319, 524.
- Hidalgo Casadp, F., Navas Fernández, M.A., Guinda Garín, A., Ruiz Gómez, A., León Camacho, M., Lanzón Rey, A., Maestro Duran, R., Janer del Valle, M.L., Pérez Camino, M.C., Cert Ventulá, A., Alba Mendoza, J., Gutiérrez Rosales, F., Dobarganes, M.C., Graciani Constante, E. (1993). *La calidad del aceite de oliva virgen: Posibles nuevos criterios para su evaluación*. Grasas y Aceites. 44; 10 – 17.
- Hidalgo, F.J., León, M.M., y Zamora, R. (2009). *Effect of β – Sitosterol in the antioxidante activity of oxidized lípido – amine reaction products*. Food Research International. 42; 1215 – 1222.
- Kalua, C.M., Bedgoog, D.R. Jr., Bishop, A.G., Prenzler, P.D. (2006). *Changes in volatile and phenolic compounds with melaxation time and temperature during virgin olive oil production*. Journal of Agriculture and Food Chemitry. 54; 7641 – 7651.
- Kiritsakis, A.K. (1998). Olive oil Handbook. Champaign (USA): AOCS Press.
- Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., Stefanodaki, E.J. (1999). *Effect of extarction System, Stage of ripeness, and Kneading Temperature on the sterol Composition of virgen olive oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 76; 1477 –1481.

- Parenti, P., Spugnoli, P., Masella, P., Calamai, L. (2008). *The effect of melaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions*. European Journal of Lipid Science and Tecnology. 110; 735 – 741.
- Patel, M.D., Thompson, P.D. (2006). *Phytosterols and vascular disease*. Atherosclerosis. 186; 149 – 158.
- Solinas, M. (1992). Principios de la extracción del aceite de las aceitunas. *Olivae*. 42; 31 – 35.
- Uceda, M., Frías, L. (1985). Épocas de recolección. Evolución del contenido graso del fruto de la composición y calidad del aceite. Proceeding II Seminario Oleícola Internacional. Córdoba.
- Van Rensburg, S.J., Daniels, W.M., van Zyl, J.M., Taljaard, J.J. (2000). A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, betasitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone sulphate and melatonin on in vitro lipid peroxidation. *Metab Brain Dis*. 15; 257 – 265.
- Zhao, C., Shao, J.H., Li, X., Xu, J., Zhang, P. (2005). Antimicrobial constituents from fruits of *Ailanthus altissima* SWINGLE. *Archives of Pharmacal Research*. 28; 1147 – 1151.

VIII.3. Capítulo III. Influencia de las condiciones de preparación de la pasta en el contenido de esteroides del aceite de oliva virgen.

Resumen

En este trabajo se estudia la influencia de las condiciones de preparación de la pasta de aceituna, molienda y batido, en la fracción esterólica del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.

El trabajo se realizó a escala de laboratorio utilizando un equipo Abencor ensayando diferentes grados de molienda (4 – 5 – 6 mm), temperaturas (20 y 30 °C) y tiempos de batido (20 y 40 min). Al aceite extraído se le analizó la fracción esterólica. El contenido en Brasicasterol, 24–Metilencolesterol, Campesterol, β –Sitosterol, Δ^5 –Avenasterol y Esteroles totales estuvo influenciado por el grado de molienda obteniéndose diferencias significativas para los tres grados de molienda estudiados. En general, el contenido total en esteroles fue más elevado cuando el fruto fue molido con cribas de diámetro pequeño.

Las condiciones de batido de la pasta constituyen uno de los factores determinantes sobre la fracción esterólica del aceite de oliva virgen. Los contenidos de β –Sitosterol y Δ^7 –Avenasterol mostraron valores significativamente más elevados cuando la pasta fue batida a 30 °C; no obstante, los contenidos de Δ^5 –Avenasterol y Esteroles Totales aumentaron cuando la pasta se batió a baja temperatura (20 °C).

En cuanto al tiempo del batido, se ha observado que para tiempos de batido más cortos (20 min), aumenta el contenido en Colesterol, 24-Metilencolesterol y Δ^5 -Avenasterol.

Por tanto, las condiciones de preparación de la pasta permiten modificar la composición y el contenido total de la fracción esterólica del aceite de oliva virgen.

Introducción

El aceite de oliva virgen es un producto con excelentes propiedades nutricionales y sensoriales (Matos et al., 2007). En los países de la cuenca Mediterránea este producto es de gran importancia en la economía y gastronomía. Además, debido a su composición en ácidos grasos y el contenido en componentes minoritarios, su consumo ha generado gran interés también fuera del área del Mediterránea (Bandelj et al., 2002).

Una fracción importante de los componentes minoritarios del aceite de oliva está constituida por los esteroides. Estos compuestos son parte de la fracción insaponificable y su contenido total varía entre 800 y 2600 mg/kg. En el aceite de oliva se han detectado alrededor de 15 esteroides, siendo los más abundantes β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol (Boskou, 1996).

Los esteroides son unos componentes de gran interés nutricional debido a su similitud estructural con el colesterol, los esteroides vegetales inhiben la absorción del colesterol en la sangre. Además presentan propiedades antiaterogénicas (Moghadasian et al., 1997; Moghadasian et al., 1999), antiinflamatorias (Bouic, 2001), anticancerígenas (Awad et al., 2003) y actividad antioxidante (Van Rensburg et al., 2000).

Diferentes estudios (Lerma-García et al., 2011; Aparicio y Luna, 2002; Christopoulou et al., 1996; Fiorino y Nizzi, 1991; De la Duarte y Martins, 1976) han demostrado que la fracción esteróica es característica para cada variedad y se puede utilizar para discriminar y clasificar los aceites de oliva vírgenes. Además, su determinación es una herramienta importante para detectar la adulteración de los mismos (CEE, 2003) con otros aceites.

Existen varios factores que influyen en el contenido y composición de la fracción esteróica en el aceite de oliva virgen, entre ellos, los más importantes son: las condiciones agronómicas (El Antari et al., 2000), la maduración del fruto (Koutsaftakis et al., 2000), las condiciones climáticas (Aparicio et al., 1994) y las condiciones de extracción del aceite (Christopoulou et al., 1996; Gutiérrez et al., 2000; Koutsaftakis et al., 1999).

En la actualidad existe gran interés en la mejora de los procesos tecnológicos, para obtener una mejor calidad y composición química

del aceite, especialmente en lo referente a los componentes biocativos y antioxidantes (polifenoles y tocoferoles).

Así, la etapa del proceso en la que se quede regular las condiciones de elaboración es la preparación de la pasta. Esta etapa se divide en dos: molienda y batido. De hecho, las condiciones de preparación de la pasta permiten actuar no sólo en el rendimiento del aceite, sino también sobre la composición y la calidad final del aceite de oliva virgen. Existen pocos trabajos que estudien el efecto de las condiciones del batido en el contenido de esteroides en el aceite de oliva. En los trabajos realizados por Koutsaftakis et al. (1999) se describe como temperaturas de batido por debajo de 30 °C permite obtener un producto de buena calidad, sin modificar el ratio de Campesterol/Estigmasterol. Asimismo, temperaturas de batido cercanas a 45 °C disminuyen el contenido de Δ^5 -Avenasterol del aceite (Koutsaftakis et al., 1999). No obstante, los trabajos realizados por Guillaume et al. (2011) muestran que el contenido de Estigmasterol y Δ^7 -Estigmastanol se incrementa con tiempos prolongados del batido, sin embargo, los esteroides totales aumentan significativamente su contenido en temperaturas altas.

El objetivo de este trabajo es determinar a nivel de laboratorio el efecto del grado de molienda y condiciones del batido de la pasta (temperatura y tiempo) en la composición y contenido total de esteroides del aceite de oliva virgen. Para realizar este estudio se han utilizado frutos de la variedad 'Picual', la variedad más importante en Jaén, Andalucía y España por producción y superficie cultivada

Material y Métodos

b) Material Vegetal

Los ensayos se han llevado a cabo durante la campaña 2007/08, utilizando frutos de la variedad 'Picual'. Para realizar el ensayo se han elegido cinco árboles, situados en el Centro IFAPA "Venta del Llano" de Mengíbar, Jaén. Los árboles, de 25 años de edad, están dispuestos a un marco de plantación de 7 × 7 m, y reciben las mismas prácticas agronómicas: sistema de cultivo en no laboreo, con utilización de herbicidas de pre-post emergencia con las frecuencias y dosis mínimas posible. De cada árbol se han tomado 25 kg de aceituna aproximadamente con un índice de madurez 3, basado en el cambio de color, por pigmentación, de la piel del fruto y del mesocarpio a lo largo del proceso de maduración (Uceda y Frías, 1975).

c) Extracción de aceite

Este proceso se llevó a cabo utilizando un sistema Abencor (Abencor series 100, MC2 Ingeniería y Sistemas, S.L, Sevilla, España). El experimento siguió un diseño factorial con tres grados de molienda (4, 5 y 6 mm.), dos temperaturas de batido (20 y 30 °C) y dos tiempos de batido de la pasta (20 y 40 min.), cada tratamiento se llevó a cabo por duplicado.

La molienda se realizó en un molino de martillos de criba fija con una velocidad de giro de los martillos de 3550 rpm. Una vez

molturado el fruto, se homogeneizó la pasta y se sometió a una termobatidora con temperatura controlable.

Tras el batido de la masa, ésta se centrifugó en una centrifuga de cesta de acero inoxidable a 3500 rpm durante un minuto. El mosto oleoso obtenido se dejó decantar para separar el aceite del resto de los componentes de la aceituna y, posteriormente se filtró con papel jarabe, con el fin de eliminar los restos sólidos y de humedad que aún le acompañaban. Las muestras recién filtradas se llevaron a congelación a una temperatura de -24 °C hasta el momento de ser analizadas.

c) Caracterización de la fracción esterólica

La determinación cualitativa y cuantitativa de los esteroides en el aceite de oliva se ha determinado utilizando el método oficial de análisis descrito en los anexos V y VI del Reglamento CEE, (2003).

Para caracterizar la fracción esterólica del aceite de oliva se utilizó un equipo de cromatografía de gases (FID) Helwett Packard modelo 6890, equipado con una columna capilar de HP-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). Las condiciones de análisis utilizadas fueron:

- temperatura del horno 260 °C
- temperatura del inyector 280 °C
- temperatura del detector 290 °C
- cantidad de sustancia inyectada 0.5 μ L.

La cuantificación se llevó a cabo mediante la adición como patrón interno de α -colestanol (0.2%) (Sigma España). Los resultados se expresaron como mg/kg de cada esteroles de forma independiente y del contenido total.

d) Análisis estadístico

En las Tablas los resultados se han expresado como valor medio \pm desviación estándar (SD). Se ha llevado a cabo el análisis de la varianza ANOVA para estudiar el efecto de cada uno de los tratamientos sobre el contenido de esteroides de los aceites estudiados. Para establecer diferencias entre medias se ha aplicado el Test de Tukey ($p \leq 0.05$). Se ha utilizado el programa Statistix, Versión 8.0 (Analytical Software).

Resultados y Discusión

En los aceites obtenidos se determinaron los parámetros de la calidad reglamentaria: acidez, índice de peróxidos, K_{232} , K_{270} (CEE, 2003) (datos no mostrados), siendo clasificados en su totalidad dentro de la categoría virgen extra.

En la Tabla VIII.3 1a, se encuentran recogidos los valores medios de los esteroides mayoritarios (β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol y β -Sitosterol Estimado) y esteroides totales, mientras que en la Tabla VIII.3.1b se muestran los

contenidos medios de los esteroides minoritarios presentes en los aceites de la variedad 'Picual' analizadas. El contenido en esteroides totales, de los aceites obtenidos mostró valores por encima de 1000 mg/kg, valor límite establecido por la Reglamento de CEE, (2003) para los aceites de oliva vírgenes.

Tabla. VIII.3.1a. Efecto de las condiciones de preparación de la pasta: grado de molienda, tiempo y temperatura del batido en el contenido de los esteroides mayoritarios y el contenido total de esteroides del aceite de oliva virgen de la verdad 'Picual'.

Condiciones de Procesado	Campesterol (mg/kg)	Estigmasterol (mg/kg)	β – Sitosterol (mg/kg)	$\Delta 5$ – Avenasterol (mg/kg)	Esteroides Totales (mg/kg)	$\Sigma\beta$ – Sitosterol (%)
\emptyset 4mm. T 20 °C. t 20 min.	38.51 \pm 0.46 ^a	8.38 \pm 0.16	1067 \pm 20.9	73.34 \pm 1.41	1232 \pm 22.2	94.7 \pm 0.20
\emptyset 4 mm. T 20 °C. t 40 min.	40.66 \pm 6.43	10.81 \pm 5.65	1054 \pm 59.7	76.76 \pm 6.20	1228 \pm 58.0	94.5 \pm 0.87
\emptyset 5 mm. T 20 °C. t 20 min.	35.29 \pm 0.63	7.08 \pm 0.41	1001 \pm 16.4	66.88 \pm 4.66	1157 \pm 18.9	94.9 \pm 0.34
\emptyset 5 mm. T 20 °C. t 40 min.	36.00 \pm 0.37	7.54 \pm 0.59	1011 \pm 12.1	62.72 \pm 2.19	1161 \pm 12.2	94.8 \pm 0.05
\emptyset 6 mm. T 20 °C. t 20 min.	35.57 \pm 0.77	6.46 \pm 0.26	975 \pm 12.1	67.18 \pm 2.27	1129 \pm 5.31	94.8 \pm 0.27
\emptyset 6 mm. T 20 °C. t 40 min.	37.58 \pm 1.70	7.74 \pm 0.84	1061 \pm 41.0	57.28 \pm 5.54	1212 \pm 44.2	94.8 \pm 0.17
\emptyset 4 mm. T 30 °C. t 20 min.	37.71 \pm 1.51	7.72 \pm 0.16	1041 \pm 16.1	76.86 \pm 3.64	1210 \pm 15.2	94.6 \pm 0.22
\emptyset 4 mm. T 30 °C. t 40 min.	39.59 \pm 0.87	8.22 \pm 0.16	1071 \pm 25.0	73.61 \pm 2.00	1237 \pm 27.4	94.7 \pm 0.10
\emptyset 5 mm. T 30 °C. t 20 min.	39.22 \pm 0.94	7.90 \pm 0.32	1070 \pm 25.7	62.49 \pm 0.70	1225 \pm 29.6	94.7 \pm 0.12
\emptyset 5 mm. T 30 °C. t 40 min.	37.64 \pm 1.85	7.44 \pm 0.48	1042 \pm 21.3	59.99 \pm 2.44	1194 \pm 21.7	94.8 \pm 0.18
\emptyset 6 mm. T 30 °C. t 20 min.	38.17 \pm 0.85	7.43 \pm 0.15	1051 \pm 11.0	51.68 \pm 0.36	1200 \pm 8.46	94.7 \pm 0.22
\emptyset 6 mm. T 30 °C. t 40 min.	38.48 \pm 0.56	8.96 \pm 3.50	1044 \pm 17.6	55.78 \pm 1.64	1193 \pm 14.1	94.5 \pm 0.65

\emptyset , Diámetro de la criba; T, Temperatura del batido; t, tiempo de batido; a, Valor medio \pm SD.

Tabla VIII.3.1b. Efecto de las condiciones de preparación de la pasta: grado de molienda, tiempo y temperatura del batido en el contenido de los esteroides minoritarios del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.

Condiciones de Procesado	Colesterol (mg/kg)	Brasicasterol (mg/kg)	24-Metilencolesterol (mg/kg)	Campestanol (mg/kg)	Clerosterol (mg/kg)	Sitostanol (mg/kg)	Δ 5,24-Estigmastadienol (mg/kg)	Δ 7-Estigmastanol (mg/kg)	Δ 7-Avenasterol (mg/kg)
Ø 4 mm. T 20 °C t 20 min.	3.28 ± 1.27 ^a	0.71 ± 0.26	3.22 ± 0.56	1.11 ± 0.09	14.18 ± 1.41	6.62 ± 0.28	5.45 ± 0.36	3.05 ± 0.14	5.76 ± 0.32
Ø 4 mm. T 20 °C t 40 min.	1.65 ± 0.05	0.34 ± 0.39	2.53 ± 0.64	1.60 ± 0.63	13.84 ± 1.15	10.2 ± 6.99	5.96 ± 0.48	3.12 ± 0.88	5.64 ± 0.76
Ø 5 mm. T 20 °C t 20 min.	2.50 ± 1.68	0.17 ± 0.22	1.96 ± 0.37	1.35 ± 0.38	13.88 ± 0.74	9.85 ± 2.64	6.70 ± 1.73	3.09 ± 0.25	5.15 ± 0.33
Ø 5 mm. T 20 °C t 40 min.	1.59 ± 0.17	0.20 ± 0.14	2.06 ± 0.14	1.07 ± 0.18	14.22 ± 1.07	7.16 ± 0.70	5.34 ± 0.32	3.34 ± 0.15	5.40 ± 0.29
Ø 6 mm. T 20 °C t 20 min.	1.95 ± 0.40	0.05 ± 0.11	2.31 ± 0.28	1.32 ± 0.05	12.98 ± 0.67	9.64 ± 2.78	5.56 ± 1.12	2.99 ± 0.26	5.02 ± 0.23
Ø 6 mm. T 20 °C t 40 min.	1.93 ± 0.42	0.06 ± 0.12	1.57 ± 0.22	1.36 ± 0.24	13.93 ± 0.77	12.3 ± 4.21	5.26 ± 0.37	3.52 ± 0.37	5.19 ± 0.74
Ø 4 mm. T 30 °C t 20 min.	5.23 ± 3.44	0.12 ± 0.16	2.72 ± 0.20	1.24 ± 0.06	13.10 ± 0.70	8.02 ± 2.83	6.02 ± 0.70	2.87 ± 0.14	5.62 ± 0.74
Ø 4 mm. T 30 °C t 40 min.	2.34 ± 0.25	0.34 ± 0.27	2.88 ± 0.20	1.14 ± 0.07	14.22 ± 0.48	6.65 ± 0.47	6.00 ± 0.28	2.69 ± 0.20	6.16 ± 0.31
Ø 5 mm. T 30 °C t 20 min.	2.26 ± 0.66	0.28 ± 0.32	2.32 ± 0.28	1.22 ± 0.22	14.40 ± 0.76	8.08 ± 0.09	5.49 ± 0.78	3.22 ± 0.30	6.16 ± 0.19
Ø 5 mm. T 30 °C t 40 min.	2.00 ± 0.21	0.15 ± 0.18	1.97 ± 0.38	1.31 ± 0.16	14.04 ± 0.83	9.88 ± 2.09	5.49 ± 0.73	3.10 ± 0.23	5.65 ± 0.66
Ø 6 mm. T 30 °C t 20 min.	2.09 ± 0.28	0.00 ± 0.00	1.57 ± 0.19	1.19 ± 0.02	13.78 ± 0.41	9.15 ± 0.38	7.53 ± 4.51	3.37 ± 0.14	6.05 ± 0.56
Ø 6 mm. T 30 °C t 40 min.	2.98 ± 1.99	0.17 ± 0.35	1.76 ± 0.22	1.28 ± 0.23	14.01 ± 1.03	9.71 ± 1.83	5.43 ± 0.56	3.43 ± 0.29	5.93 ± 1.18

Ø, Diámetro de la criba; T, Temperatura del batido; t, tiempo de batido; a, Valor medio ± SD.

Para establecer el efecto de cada uno de los variables de la fase de preparación de la pasta en la composición de la fracción esterólica y el contenido total de esteroides se ha calculado el porcentaje de variabilidad explicada a partir de los resultados del ANOVA (Tabla VIII 3.2) para los principales esteroides y contenido total. El diámetro de criba presentó un efecto significativo ($P \leq 0.0001$) para el contenido de 24-Metilcolesterol, Δ^5 -Avenasterol y Esteroides Totales. El contenido de β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Δ^7 -Avenasterol y Esteroides totales estuvo influenciado por la temperatura del batido. Por otro lado, el tiempo de batido afectó al contenido de Colesterol y Δ^5 -Avenasterol del aceite de oliva virgen presentando una significancia de $P \leq 0.05$.

El grado de molienda fue principal fuente de variación para el 24-Metilcolesterol, Δ^5 -Avenasterol y el contenido total de esteroides alcanzado un elevado nivel de significación.

Tabla VIII.3.2. Porcentaje de variabilidad explicada por las condiciones de preparación de la pasta para algunos esteroides presentes en el aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.

Condiciones de preparación de la pasta	Colesterol	24-Metilcolesterol	Campestanol	β -Sitosterol	Δ^5 -Avenasterol	Δ^7 -Avenasterol	Esteroides Totales
Diámetro de criba (\emptyset) (mm)	9.4 ^{NS}	56.5 ^{***}	0.6 ^{NS}	11.3 ^{**}	70.3 ^{***}	2.8 ^{NS}	25.6 ^{***}
Temperatura (T) (°C)	5.0 ^{NS}	0.4 ^{NS}	1.9 ^{NS}	11.5 ^{***}	5.3 ^{**}	19.6 ^{***}	8.5 ^{**}
Tiempo (t) (min)	7.2 [*]	3.7 [*]	1.1 ^{NS}	3.0 ^{NS}	1.4 [*]	0.1 ^{NS}	2.2 ^{NS}
(\emptyset) (mm) x T (°C)	3.0 ^{NS}	2.1 ^{NS}	3.1 ^{NS}	9.2 [*]	4.3 [*]	5.0 ^{NS}	8.6 [*]
(\emptyset) (mm) x t (min)	13.4 [*]	0.3 ^{NS}	5.4 ^{NS}	7.3 [*]	0.8 ^{NS}	1.1 ^{NS}	6.9 [*]
T (°C) x t (min)	0.02 ^{NS}	3.5 [*]	0.3 ^{NS}	3.9 ^{NS}	0.7 ^{NS}	0.3 ^{NS}	3.9 [*]
(\emptyset) (mm) x T (°C) x t (min)	2.6 ^{NS}	7.4 ^{**}	14.6 [*]	14.6 [*]	6.2 ^{**}	5.3 ^{NS}	9.5 ^{**}
Error	59.3	26.2	73.1	39.2	10.1	65.9	34.9

NS – no significativo * – $P \leq 0.05$, ** – $P \leq 0.01$, *** – $P \leq 0.0001$

En la Tabla VIII.3.3 se muestran los valores medios de los esteroides mayoritarios y minoritarios del aceite de oliva, que se ven afectados de forma significativa por el grado de molienda.

Tabla VIII.3.3. Efecto del grado de la molienda en el contenido de esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.

Esteroides (mg/kg)	Diámetro de criba		
	Ø 4 mm	Ø 5 mm	Ø 6 mm
Brassicasterol	0.37 ¹ a	0.20 ab	0.07 b
24–Metilencolesterol	2.84 a	2.08 b	1.80 b
Campesterol	39.1 a	37.0 b	37.4 ab
β–Sitosterol	1058 a	1033 b	1030 b
Δ⁵–Avenasterol	75.1 a	63.0 b	57.9 c
Δ⁷–Estigmastanol	2.93 b	2.19 ab	3.3 a
Esteroides Totales	1227 a	1184 b	1183 b

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Como se observa en la Tabla VIII.3.3 el contenido de Brassicasterol, 24–Metilencolesterol, Campesterol, β–Sitosterol, Δ⁵–Avenasterol y Esteroides totales son significativamente más elevados cuando las aceitunas se trituraron con la criba del diámetro más pequeño.

El comportamiento del Δ⁷–Estigmastanol fue diferente, aumentando su

contenido con el grado de molienda, alcanzando diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre el tamaño de criba más pequeña y el mayor.

Stiti et al. (2010) y Guillaume et al. (2011) han demostrado que la mayoría de los esteroides del aceite de oliva se encuentran en la drupa y en el hueso de la aceituna, por tanto el proceso de la molienda es un factor muy importante para liberar el mayor contenido de esteroides que se encuentran en el fruto. No obstante, existen pocos trabajos sobre la influencia de la molienda en el contenido de estos compuestos en el aceite de oliva. Guillaume et al. (2011) describieron un claro efecto de la molienda para aumentar el contenido total de los esteroides del aceite de oliva, sin embargo, en los trabajos realizados por Cert et al. (1999) el grado de la molienda no influyó en el contenido de estos compuestos.

Las condiciones de batido ejercen un efecto diferente en los esteroides presentes en el aceite de oliva virgen (Tablas VIII 3.1 a y b). Así, la temperatura de batido ha mostrado un efecto significativo sobre β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Δ^7 -Avenasterol y Esteroides Totales, como se puede observar en la Tabla VIII.3.4. El contenido de β -Sitosterol y Δ^7 -Avenasterol fueron significativamente más altos cuando el batido se llevó a cabo a 30 °C, mientras que Δ^5 -Avenasterol y Esteroides totales mostraron un efecto contrario alcanzando valores significativamente más elevados a 20 °C.

Tabla VIII.3.4. Influencia de la temperatura de batido de la pasta en el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.

Esteroides (mg/kg)	Temperatura del batido	
	20 °C	30 °C
β-Sitosterol	1028 ¹ b	1057 a
Δ⁵-Avenasterol	67.4 a	63.4 b
Δ⁷-Avenasterol	5.36 b	5.93 a
Esteroides Totales	1210 a	1187 b

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Al igual que la temperatura, el tiempo de batido ha ejercido una influencia significativa en el contenido de algunos esteroides del aceite de oliva: Colesterol, 24-Metilencolesterol y Δ⁵-Avenasterol. Estos compuestos mostraron un incremento significativo de su contenido al reducir la duración del batido de la pasta (Tabla VIII.3.5).

Tabla VIII.3.5. Influencia del tiempo del batido de la pasta de aceituna en el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.

Esteroides (mg/kg)	Tiempo del Batido	
	20 min	40 min
Colesterol	2.88 ¹ a	2.20 b
24-Metilencolesterol	2.35 a	2.13 b
Δ⁵-Avenasterol	66.4 a	64.3 b

Letras diferentes en la misma fila indican la diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

Además de los factores, por separado, la interacción entre tiempo y temperatura mostro un efecto significativo en el contenido de Colesterol, 24–Metilencolesterol, β –Sitosterol, Δ^5 –Avenasterol y Esteroles Totales del aceite. Se observó que para Colesterol, 24–Metilencolesterol, se aumentarían los contenidos cuando se utilizaron temperaturas bajas y tiempos de batido cortos (Tabla VIII 3.6).

Tabla VIII 3.6. Efecto de la interacción de la temperatura y el tiempo de batido de la pasta en el contenido en Colesterol, 24–Metilencolesterol, del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'

<i>Interacción Temperatura/Tiempo</i>	<i>Colesterol (mg/kg)</i>	<i>24– Metilencolesterol (mg/kg)</i>
20 °C x 20 min	3.19 ¹ a	2.2 ab
30 °C x 20 min	2.57 ab	2.5 a
20 °C x 40 min	2.44 ab	2.2 ab
30 °C x 40 min	1.73 b	2.0 b

Letras diferentes en la misma fila indican la diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

Sin embargo, para β –Sitosterol y Esteroles Totales el efecto de la interacción es el inverso ya que se obtienen valores significativamente más elevados cuando se emplean temperaturas bajas y se reduce el tiempo de batido (Tabla VIII 3.7).

Tabla VIII 3.7. Efecto de la interacción de la temperatura y el tiempo de batido de la pasta en el contenido en β -Sitosterol y Esteroles Totales del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'

Interacción Temperatura/Tiempo	β-Sitosterol (mg/kg)	Esteroles Totales (mg/kg)
20 °C x20 min	1054 a	1212 a
20 °C x 40 min	1052 a	1208 a
30 °C x 40 min	1042 ab	1200 ab
30 °C x 20 min	1014 b	1173 b

Letras diferentes en la misma fila indican la diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

En la Tabla VIII 3.8 se muestra el efecto de la interacción entre grado de molienda y temperatura de batido, para Campesterol, β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol. Estos compuestos mostraron contenidos significativamente más elevados cuando se empelaron grados de molienda de menor tamaño y temperaturas de batido de 30 °C.

Tabla VIII.3.8. Influencia de interacción entre el grado de molienda y la temperatura del batido en el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'.

Grado de molienda (Ø) × Temperatura (°C)	Campesterol (mg/kg)	β-Sitosterol (mg/kg)	Δ⁵-Avenasterol (mg/kg)	Esteroides Totales (mg/kg)
(Ø) 4 mm × 20 °C	38.6 ¹ ab	1056 ab	75.2 a	1224 a
(Ø) 4 mm × 30 °C	39.5 a	1060 a	75.0 a	1230 a
(Ø) 5 mm × 20 °C	38.4 ab	1056 ab	61.2 b	1210 ab
(Ø) 5 mm × 30 °C	35.6 b	1006 c	64.8 b	1159 c
(Ø) 6 mm × 20 °C	38.3 ab	1047 ab	53.7 c	1197 abc
(Ø) 6 mm × 30 °C	36.5 ab	1018 bc	62.2 b	1170 bc

¹ Letras diferentes en la misma columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Al mismo tiempo, la interacción entre el grado de la molienda y el tiempo de batido presento diferencias significativas para el contenido de Colesterol, β-Sitosterol y Esteroides Totales (Tabla VIII.3.9).

Tabla VIII.3.9. Efecto de la interacción entre el grado de molienda y del tiempo del batido para el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'

Grado de molienda (Ø) × Tiempo (min)	Colesterol (mg/kg)	β-Sitosterol (mg/kg)	Esteroides Totales (mg/kg)
(Ø) 4 mm × 20 min	4.25 ¹ a	1054 a	1221 ab
(Ø) 4 mm × 40 min	2.00 b	1062 a	1233 a
(Ø) 5 mm × 20 min	2.38 ab	1036 ab	1191 bc
(Ø) 5 mm × 40 min	1.79 b	1027 ab	1178 c
(Ø) 6 mm × 20 min	2.02 b	1013 b	1165 c
(Ø) 6 mm × 40 min	2.45 ab	1052 ab	1202 abc

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Como se observa en los resultados obtenidos, las condiciones de la preparación de la pasta influyen de forma significativa en la composición cualitativa y cuantitativa de los esteroides en el aceite de oliva. La interacción de todas condiciones de preparación de la pasta (molienda y batido) han demostrado un efecto significativo sobre el contenido de 24-Metilcolesterol, Δ^5 -Avenasterol y Esteroides totales obteniendo una significación de $P \leq 0.01$.

Diferentes autores describen que para obtener mayores contenidos en componentes minoritarios en el aceite de oliva, las temperaturas del batido no deben superar los 35 °C (Petraakis, 1994). Asimismo, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron unos niveles más elevados de esteroides de aceite de oliva virgen cuando las temperaturas de batido fueron 30 °C. Además, se ha observado que el contenido de Δ^5 -

Avenasterol es más elevado cuando se utilizan temperaturas bajas, estos resultados están en acuerdo a los obtenidos por Koutsaftakis et al. (1999) y Guillaume et al (2011). Estos autores en sus trabajos demuestran que en temperaturas de batido por encima de 45 °C se reduce el contenido de Δ^5 -Avenasterol, y se aumenta el contenido de Estigmasterol y el ratio de Campesterol/Estigmasterol. El ratio Campesterol/Estigmasterol es un parámetro que valora la calidad del aceite de oliva establecido por el Reglamento CEE, (2003). Por tanto, observando a los resultados obtenidos, las temperaturas óptimas para obtener el contenido de Campesterol y Estigmasterol dentro de los límites establecidos no deben pasar a los 30 °C.

Asimismo, el contenido de los esteroides en el aceite de oliva se vio influenciado también por los tiempos de batido. Los resultados obtenidos en este estudio y los trabajos previos realizados por Guillaume et al. (2011), obtiene como conclusión que los tiempos más largos de batidos reducen el contenido de esteroides del aceite de oliva virgen.

Conclusiones

Los resultados de este estudio han puesto de manifiesto la influencia de las condiciones de preparación de la pasta de aceituna en la composición de la fracción esteróica en el aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual'. La etapa de molienda es el principal factor determinante del contenido de esteroides en el aceite de oliva virgen, por encima de batido. Para incrementar el contenido en esteroides del aceite de oliva virgen es importante que el fruto se molture con un grado de molienda menor, con el

fin de liberar todo el contenido de esteroides que se encuentran en el fruto y favorecer su solubilización en el aceite.

En cuanto a las condiciones del batido, se observó que regulando la temperatura y el tiempo de batido la fracción esteróica varía en su contenido. Se obtuvo un incremento en el contenido de esteroides mayoritarios a una temperatura de 30 °C. El tiempo de batido medido en menor grado en el contenido de los principales esteroides en aceite de oliva, que aumentaron cuando el tiempo de batido se redujo a 20 min.

En definitiva, esta información es de gran interés no solo por modular la fracción esteróica desde el punto de interés nutricional, sino también como herramienta por regular los esteroides del aceite cuando se encuentren en los límites establecidos por el Reglamentación.

Referencias

- Amirante, R., Cini, E., Montel, G.L., Pasqualone, A. (2001). *Influence of mixing and extraction parameters on virgin olive oil quality*. *Grasas y Aceites*. 52; 198 – 201.
- Aparicio, R., Ferreiro, L., Alonso, V. (1994). *Effect of climate on the chemical composition of virgin olive oil*. *Analytica Chimica Acta*. 292; 235 – 241.

- Aparicio, R., Luna G. (2002). *Characterizacion of monovarietal virgin olive oils*. European Journal of Lipid Science and Technology. 104; 614 – 627.
- 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; 497 – 500.
- Bandelj, D., Jaksě, J., Javornik, B. (2002). *DNA Fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers*. Food Technology Biotechnology. 40; 185 – 190.
- Boskou, D. (1996). Olive oil chemistry and technology. Champaign, Illinois: AOCS Press.
- Bouc, P.J. (2001). *The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years*. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 4; 471 – 475.
- Bucci, R., Magri, A.D., Magri, A.L., Marini, D., Marini, F. (2002). *Chemical authentication of extra virgin olive oil varieties by supervised chemometric procedures*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50; 413 – 418.
- CEE (2003). *Characteristics of olive and olive pomace oils and their analytical methods*. EEC Regulation 1989/2003. Official Journal of the European Communities. 295; 57 – 66.
- Cercaci, L., Passalacqua, G., Poerio, A., Rodriguez – Estrada, M.T., Lercker, G. (2007). *Composition of total sterols (4-desmethyl-sterols) in extravirgin olive oils obtained with different extraction technologies and their influence on the oil oxidative stability*. Food Chemistry. 102; 66 – 76.

- Cert, A., Moreda, W., García-Moreno, J. (1997). *Determinación de esteroles y alcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico*. Grasas y Aceites. 48; 207 – 218.
- Christopoulou, E., Lazaraki, M., Alexiou, F., Synouri, S., Frangis-Cos, E. (1996). *Influence of certain factors on the composition of olive-pomace oils. Part II sterol, triterpenic dialcohols and aliphatic alcohols*. La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse. 73; 201 – 211.
- De la Duarte, H.M.P., Martins, R.M.B.S. (1976). *Insaponifiable des corps gras. Fraction st erolique des huiles d olive vierges portugaises*. Grasas y Aceites. 27; 101–106.
- Di Giovacchino, L., Sestili, S., Di Vincenzo, D. (2002). *Influence of olive processing on virgin olive oil quality*. European Journal of Lipid Science & Technology. 104; 578 –601.
- EEC (2003). *Characteristics of olive and olive pomace oils and their analytical methods*. EEC Regulation 1989/2003. Official Journal of the European Communities. 295; 57 – 66.
- El Antari, A., Hilal, A., Boulouha, B., El Moudni, A. (2000). *Estudio de la influencia de la variedad, los factores ambientales y la técnicas de cultivo en las características de los frutos y la composición química del aceite de oliva virgen extra de Marruecos*. Olivae. 80; 29 – 36.
- Fiorino, P., Nizzi Grifi, F. (1991). *Maturazione delle olive e variación di alcuni componente dell'olio*. Olivae. 35; 25 – 28
- Guillaume, C., Ravetti, L., Lala, D., Johnson, R.J. (2011). *Technological Factors Affecting Sterols in Australian Olive Oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 89; 29 -40.

- Gutiérrez, F., Varona, I., Albi, M.A. (2000). *Relation of acidity and sensory quality with sterol content of olive oil from stored fruit*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48; 1106 – 1110.
- Inarejos-García, A.M., Gómez-Rico, A., Salvador, M.D, Fregapane, G. (2009). *Influence of malaxation conditions on virgin olive oil yield, overall quality and composition*. European Food Research and Technology. 228; 671 – 677.
- Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., Stefanoudaki, E. (1999). *Effect of extraction system, stage of ripeness, and kneading temperature on the sterol composition of virgin olive oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 76; 1477–1481.
- Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., Stefanoudaki, E., Cert, A. (2000). *Estudio sobre las variaciones de determinados parámetros químicos y de los componentes menores de los aceites de oliva virgen obtenidos de aceitunas recolectadas en distintas fases de maduración*. Olivae, 80; 22–27.
- Lerma-García, M.J., Simó-Alfonso, E.F., Méndez, A., Lliberia, J.L., Herrero-Martínez, J.M. (2011). *Classification of extra virgin olive oils according to their genetic variety using linear discriminant analysis of sterol profiles established by ultra-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection*. Food Research International. 44; 103 – 108.
- Mariani, C., Bellan, G., Morchio, G., Pellegrino, A. (1999). *Free and esterified minor components of olive and hazelnut oils: Their potential utilisation in checking oil blend*. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse. 76; 297 – 305.

- Martínez Moreno, J.M., Gómez Herrera, C., Janer del Valle, C. (1957). *Estudios físico-químicos sobre las pastas de aceituna molidas. IV. Las gotas de aceite*. Grasas y Aceites. **8**; 112 – 120.
- Matos, L.C., Cunha, S.C., Amaral, J.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Olivera, B.P (2007). *Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobranc, osa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices*. Food Chemistry. 102; 406 – 414.
- Moghadasian, M.H., McManus, B.M., Pritchard, P.H., Frohlich, J.J: (1997). *"Tall oil"-derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 17; 119 – 126.
- Moghadasian, M.H., McManus, B.M., Godin, D.V., Rodrigues, B., Frohlich, J.J. (1999). *Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice: possible mechanisms of action*. Circulation. 99; 1733 – 1739.
- Petrakis, C. (1994). *Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines for Virgin Olive Oil production*. Grasas y Aceites. 45; 53 – 54.
- Salvador, M.D., Aranda, F., Fracapane, G. (1998). *Chemical composition of commercial Cornicabra virgin olive oil from 1995/96 and 1996/97 crops*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 75; 1305 – 1311.
- Siti, N., Triki, S y Hartmann, M.A. (2007). *Sterols and Non-steroidal Triterpenoids of the Developing Olive Fruit*. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. 23; 211 – 218.
- Uceda, M., Frías, L. (1985). *Épocas de recolección. Evolución del contenido graso del fruto de la composición y calidad del aceite*. Proceeding II Seminario Oleícola Internacional. Córdoba.

- Uceda, M., Jimenez, A., Beltran, G. (2006). *Olive oil extraction and quality*. *Grasas y Aceites*. 57; 25 – 31.
- Van Rensburg, S.J., Daniels, W.M., Van Zyl, J.M., Taljaard, J.J. (2000). *A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, betasitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone sulphate and melatonin on in vitro lipid peroxidation*. *Metabolic Brain Disease*. 15; 257 – 265
- Vichi, S., Pizzale, L., Toffano, E., Bortolomeazzi, R., Conte, L. (2001). *Detection of hazelnut oil in virgin olive oil by assessment of free sterols and triacylglycerols*. *Journal of AOAC International*. 84; 1534 – 1541.
- Uceda, M., Frías, L. (1985). *Épocas de recolección. Evolución del contenido graso del fruto de la composición y calidad del aceite*. *Proceeding II Seminario Oleícola Internacional*. Córdoba.
- Uceda, M., Jimenez, A., Beltran, G. (2006). *Olive oil extraction and quality*. *Grasas y Aceites*. 57; 25 – 31.
- Van Rensburg, S.J., Daniels, W.M., Van Zyl, J.M., Taljaard, J.J. (2000). *A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, betasitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone sulphate and melatonin on in vitro lipid peroxidation*. *Metabolic Brain Disease*. 15; 257 – 265
- Vichi, S., Pizzale, L., Toffano, E., Bortolomeazzi, R., Conte, L. (2001). *Detection of hazelnut oil in virgin olive oil by assessment of free sterols and triacylglycerols*. *Journal of AOAC International*. 84; 1534 – 1541.

***VIII.4. Capítulo IV. Evaluación de la actividad
antioxidante de los fitoesteroles del aceite de oliva
virgen extra.***

Resumen

Los esteroides en estos últimos años han suscitado gran interés por sus propiedades bioactivas. En este trabajo se ha estudiado la capacidad antioxidante de los fitoesteroides valorada mediante diferentes métodos. Los métodos utilizados para valorar la actividad antioxidante fueron: ABTS, DPPH, ORAC, blanqueamiento del β -Caroteno, la actividad quelante de Cu^+ así como la estabilidad oxidativa de los aceites para realizar este trabajo se evaluaron para los métodos 'in vitro cuatro' esteroides más abundantes en el aceite de oliva: β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol. En el caso de la estabilidad oxidativa se utilizó extracto esteroídico completo.

A partir de los resultados obtenidos, los fitoesteroides evaluados presentaron una actividad antioxidante moderada. Si bien para algunos métodos como ORAC el comportamiento de los esteroides fue el propio de un compuesto prooxidante. Tanto β -Sitosterol como Campesterol no presentaron actividad antioxidante con los métodos analizados. Δ^5 -Avenasterol y Estigmasterol han mostrado actividad antioxidante con tres de los métodos utilizados.

Finalmente, el extracto de la fracción esteroídica dio lugar a un ligero incremento en la estabilidad oxidativa de los aceites.

Introducción

Los fitoesteroles (esteroles vegetales) son componentes naturales de las plantas y forman parte del grupo de los isoprenoides. Los fitoesteroles juegan funciones esenciales en las células vegetales, al regular la fluidez y la permeabilidad de las membranas celulares, actuando como precursores biogénicos de los compuestos que intervienen en el crecimiento de las plantas. Además, son sustratos para la síntesis de numerosos metabolitos secundarios de las plantas como los glicoalcaloides y saponinas (Hartmann, 1998).

Por este motivo, están presentes normalmente en la dieta. Se estima que la ingesta diaria de fitoesteroles, que obviamente es muy variable ya que depende de los hábitos alimentarios de la población, se encuentra en un rango entre 160 y 500 mg/día (Pollak y Kritchevsky, 1981).

Hoy en día se conocen alrededor de 200 esteroides, aunque los más abundantes en la dieta son β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol (Figura. VIII 4.1) (Peter y Awad, 2007). Los fitoesteroides se pueden encontrar en forma saturada denominados "estanoles", siendo el más conocido de esta familia el Sitostanol, y/o en forma libre esterificada con los ácidos grasos y los glucósidos (Quilez, et al., 2003).

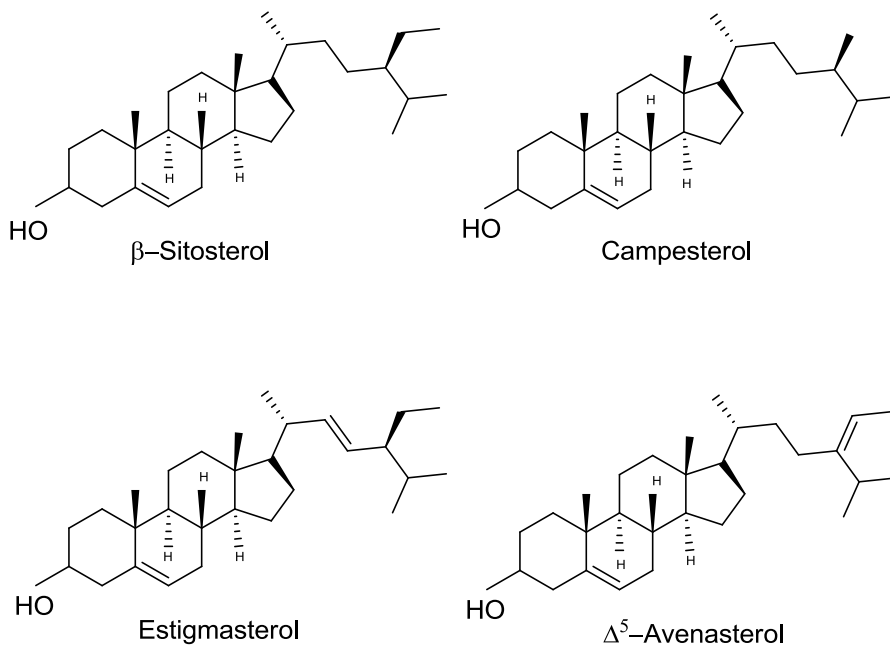


Figura VIII 4.1. Estructura química de los principales esteroides del aceite de oliva.

Los esteroides se caracterizan por poseer diferentes actividades biológicas y propiedades físicas. Los fitoesteroides en particular, son unos compuestos de gran importancia para la salud y nutrición humana, utilizándose además como suplementos de la cosmética y como precursores de hormonas farmacéuticas (Clark, 1996).

En los últimos años se han descrito para los fitoesteroides una gran variedad de efectos fisiológicos. Se les atribuye propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas (Ling y Jones, 1995). Sin embargo, el efecto mejor caracterizado y científicamente demostrado es el efecto hipocolesterolémico, tanto a nivel del colesterol total como del colesterol-LDL (Pollak y Kritchevsky, 1981).

Además, algunos autores han estudiado su efecto antioxidante en aceites y grasas (Gordon y Magos, 1983; White y Armstrong 1986; Titan y White, 1994; Kochhar, 2000; Wang et al., 2002), descubriéndose su efecto inhibidor en los procesos oxidativos de los aceites durante el proceso de la fritura (White y Armstrong 1986).

La presencia de un grupo “etilen” en la posición del carbono 24 de la estructura les confiere actividad antioxidante (Gordon y Magos, 1983) mientras que β -Sitosterol, Campesterol y Estigmasterol, que son los fitoesteroles más abundantes en la naturaleza no muestran esta tendencia. Por otro lado, se ha observado que debido a la presencia de los grupos hidroxilo de carácter hidrófilo y dobles enlaces en su estructura química, los fitoesteroles son susceptibles a la oxidación (Bortolomeazzi et al., 2003; Dutta, 1997; Grandgirard et al., 2004; Soupas et al., 2004).

El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de la capacidad antioxidante de los fitoesteroles principales del aceite de oliva valorada mediante diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante ‘in vitro’, así como el efecto de la fracción esterólica en la estabilidad del aceite de oliva.

Material y Métodos

Materiales: β -Sitosterol (97%), Δ^5 -Avenasterol (94%), Campesterol (65%), Estigmasterol (93%), ABTS (ácido 2.2-azino-bis 3-

etilenbenzotiazolin-6-sulfato), $K_2S_2O_8$ (persulfato potásico), $CuSO_4$, Trolox (6-hidroxi-2.5.7.8-tetrametilcromo-2 ácido carboxílico 97%), DPPH (2.2-difenil-1-picrilhidrazil), α -Tocoferol (96%), AAPH (2.2-azobis-(2-metilpropionamidine dihidroclorid) 97 %, ácido linoleico, β -Caroteno, Tween 20, etanol 96%, BHT (2.6-di-tert-butil-4-metilfenol), alumina neutral tipo 507 °C, aceite de oliva virgen ('Picual' cv.) obtenido en la almazara experimental del Centro IFAPA Venta del Llano, Mengibar, extracto de fitoesteroles de aceite de oliva.

a) Método DPPH.

El test DPPH está basado en la capacidad del radical libre 2.2-difenil-1-picrilhidrazil, de reaccionar con el H- donador del antioxidante descendiendo la absorbancia.

Para la medida de la actividad antioxidante de los fitoesteroles se ha utilizado el método descrito por Brand-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones. Se prepara una solución etanólica 100 μ M de DPPH que se ha mezclado con diferentes concentraciones de los fitoesteroles disueltos en etanol. Las concentraciones utilizadas dependerán de la relación entre moles antioxidante / moles DPPH que serán inicialmente de 0.06 – 0.13 – 0.25 – 0.50 y 1. α -Tocoferol se ha utilizado como antioxidante de referencia, como control se ha utilizado una muestra sin antioxidante. El protocolo consiste en añadir 150 μ M de DPPH en 96 pocillos con la ayuda de una pipeta multicanal añadiéndose rápidamente 50 μ M de los compuestos a ensayar y α -tocoferol.

El descenso de la absorbancia se ha medido a 520 nm de forma inmediata en un lector de placas (TECAN, GENios Plus) cada 5 minutos a 30 °C durante 2 horas. Cada determinación se ha llevado a cabo por triplicado.

Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad captadora de radicales libres, utilizando la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$$

Dónde:

$A_{C(0)}$ – Absorbancia del control a tiempo 0

$A_{A(t)}$ – Absorbancia de la muestra a tiempo t

b) Método de ABTS.

El test del ABTS es uno de los métodos mas utilizados, este método se describió por primera vez por Rice-Evans y Miller. (1996). Se basa en la medida de descenso de la absorbancia del radical libre del ABTS producido por la oxidación de 2.2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

En este trabajo se ha utilizado el protocolo modificado por Re *et al.* (1999). El radical de ABTS se obtiene tras la reacción de ABTS⁺ (0.5 mM) con persulfato potásico (K₂S₂O₈ 6.89 mM) incubado a temperatura

ambiente (25 °C) en oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS⁺, se diluye en agua miliQ hasta obtener un valor de absorbancia alrededor de 0.7 (± 0.1) a 734 nm.

Los fitoesteroles y el Trolox (antioxidante de referencia) se diluyeron en etanol a una concentración inicial de 10 mM. Para obtener las concentraciones de 6.25 – 12.5 – 25 – 50 – 100 – 400 – 800 µM, los compuestos se diluyeron con agua miliQ.

En una placa de 96 pocillos se añadieron 20 µM de cada esteroles, Trolox, blanco (agua miliQ) y control (etanol 80%) e inmediatamente se añadió 280 µL de ABTS⁺. La absorbancia a 734 nm se midió de forma continua cada 5 minutos a 30 °C durante 120 minutos utilizando un lector de placas (TECAN, GENios Plus). Cada concentración de esteroles se ha analizado por triplicado.

Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad captadora de radicales libres, y la fórmula utilizada es:

$$\% \text{ inhibición} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$$

Dónde:

$A_{C(0)}$ – Absorbancia del control a tiempo 0

$A_{A(t)}$ – Absorbancia de la muestra a tiempo t

c) *Test ORAC.*

El test ORAC se describió por primera vez por Guo et al. (1997) y consiste en el descenso de la fluorescencia de una proteína R-ficoeritrina (PE) en presencia de un radical peróxido. Se ha observado que por acción de un antioxidante el descenso de la fluorescencia es más lento.

La determinación del ORAC se ha llevado a cabo mediante el método descrito por Prior et al. (2003) con algunas modificaciones. Los fitoesteroles y el Trolox se disolvieron en etanol 96% a una concentración inicial de 10 mM y después, se diluyeron en una solución tampón PBS hasta conseguir diferentes concentraciones (6.25 – 12.5 – 25 – 50 – 100 – 400 – 800 mM). El ensayo se ha determinado en placas de 96 pocillos con un volumen final de 160 μ L.

La fluoresceína (48 nM) se mezcló con diferentes concentraciones de fitoesteroles y el estándar (Trolox). La placa se incubó durante 15 minutos a 37 °C. El ensayo comenzó al añadir el APPH⁺ (100 mM). La medida de la fluorescencia se llevó a cabo en un lector de placas TECAN, GENios Plus (Ex λ 485 / Em λ 520) cada 5 minutos a 37 °C durante 2 horas. Cada determinación se llevó a cabo por triplicado.

Los resultados se calcularon a partir de la diferencia en la área bajo de la curva (AUC) entre el blanco y cada compuesto. La fórmula para calcular el AUC es la siguiente:

$$AUC = 1 + f1/f0+f2/f0+f3/f0+f4/f0+\dots\dots+fn/f0$$

Los resultados se expresan en micro molar de equivalente de Trolox (TE) y se calcula utilizando la ecuación de la recta de la curva estándar.

$$TE = (Y - b)/m$$

Dónde:

Y – es AUC NET ($AUC_{\text{muestra}} - AUC_{\text{control}}$)

b – es el R^2 de la ecuación

m – es la pendiente

d) Blanqueamiento del β -caroteno.

El test se basa en el blanqueo del β -caroteno durante la auto-oxidación de una emulsión de ácido linoléico y como consecuencia el descenso de la absorbancia (Miller, 1971). La acción de los antioxidantes (Von Gadov et al., 1997) o de unos extractos naturales (Moure et al., 2000) causan el retraso de este descenso de absorbancia del β -caroteno.

El protocolo utilizado para determinar la actividad de los fitoesteroles fue el descrito por Amin et al. (2004) con algunas modificaciones. Este método consiste en la preparación de un 1 mL de β - caroteno (0.2

mg/mL en cloroformo) que se añade al balón que contiene 20 μ L de ácido linoleico y 200 μ L de Tween 20, la muestra se evapora en rotavapor a 40 °C durante 10 min. Una vez evaporado el cloroformo, se añadió 100 mL de agua miliQ poco a poco agitándose hasta la obtención de una emulsión.

En tubos de ensayo conteniendo 200 μ L de fitoesteroles, BHT (antioxidante estándar) y etanol 70% (como control) en diferentes concentraciones (6.25 – 12.5 – 25 – 50 – 100 mM) diluidos en etanol 70 %, se añadieron 4 mL de la emulsión. Los tubos del ensayo se agitan y se disponen a 45 °C durante 2 horas.

La absorbancia se mide en 470 nm (VARIAN Cary 50-BIO UV-Visible Spectrophotometer) en el momento inicial ($t = 0$) frente a un blanco, que consiste en una emulsión sin β -caroteno, con un intervalo de tiempo de 15 minutos durante un total de 120 minutos. Todas las concentraciones fueron analizadas por triplicado.

La actividad antioxidante (AA) se expresa como porcentaje de inhibición y se calcula con la siguiente ecuación:

$$AA = [1 - (A_0 - A_t)/(A_0^0 - A_t^0)] \times 100$$

Dónde:

A_0 y A_0^0 – son valores de la absorbancia medida en el tiempo de incubación inicial de la muestras y control respectivamente.

A_t y A_t^0 – son los valores de la absorbancia medida en el tiempo 120 minutos de la muestra y control.

e) *Test Rancimat.*

Para medir la actividad antioxidante de los fitoesteroles con el método de Rancimat se ha utilizado un aceite de oliva virgen de cv. '*Picual*'. El aceite de oliva se ha purificado con alumina activada a 200 °C utilizando el método descrito por Yoshida et al. (1992) para eliminar antioxidantes naturales.

Para comprobar la composición de la matriz se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: el contenido en polifenoles totales (Vázquez – Roncero *et al.*, 1973), tocoferoles mediante HPLC (IUPAC, 1992) y la composición de los esteroides según método de análisis descrito en Reglamento CEE. (2003).

La obtención del extracto de esteroides del aceite se realizó saponificando el aceite de oliva virgen, se extrajo la fracción insaponificable y se eliminó el disolvente.

Posteriormente, se separó la fracción esterólica mediante cromatografía de capa fina. El extracto final se obtuvo re disolviendo los esteroides en etanol.

La estabilidad oxidativa fue evaluada con un equipo Rancimat (Modelo 743, Metrohm Co. Basilea, Suiza). El aceite purificado se enriqueció aumentando diferentes concentraciones de extracto de fitoesteroides (500 – 1000 – 2000 mg/kg). La medida de la estabilidad oxidativa se llevó a cabo sobre 3 g de aceite, a 80 °C y un flujo de aire de 10–12 L/h.

Los resultados se expresaron como tiempo de inducción (IT) en horas, correspondiente a la estabilidad de la matriz de lípidos evaluados. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

f) Medida de actividad quelante de Cu^{2+} .

Para valorar la actividad antioxidante de los esteroides con el método de la actividad quelante de Cu^{2+} se utilizó el método descrito por Rahman et al. (1990).

Para este trabajo se han utilizado 50 μM de β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol añadiendo diferentes concentraciones de $CuSO_4$ (25 – 50 – 100 μM). La absorbancia se midió

en el rango de 200 – 600 nm, utilizando un espectrofotómetro Cary 50-BIO UV-Visible Spectrophotometer (Varían, España).

Los compuestos se disolvieron en etanol 96%, y el CuSO_4 se disolvió en agua MiliQ. Los espectros se compararon con las muestras sin cobre. El aumento de la concentración de metales causa la disminución de la amplitud del pico de absorbancia. Los resultados se expresan con el descenso de la absorbancia del metal cuando se aumentó la concentración del compuesto. Todas las concentraciones fueron analizadas por triplicado.

g) Análisis estadísticos

En las Tablas y en las Figuras los resultados se han expresado como valor medio \pm desviación estándar (SD).

Resultados

a) Valoración de la actividad captadora de radicales libres mediante el método de DPPH.

A la vista de los resultados mostrados en la Tabla VIII 4.1, se puede indicar que los fitoesteroles poseen una capacidad muy débil de capturar al radical de DPPH. A su vez, los fitoesteroles presentaron una actividad antioxidante diez veces menor respecto al antioxidante de referencia α -Tocoferol.

Tabla. VIII 4.1. Porcentaje de actividad captadora de radicales libre de los principales esteroides del aceite de oliva (β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol) medida mediante reducción del radical DPPH. α - Tocoferol fue usado como antioxidante de referencia

MolAntiox/ Mol DPPH	α-Tocoferol	β- Sitosterol	Δ^5- Avenasterol	Campesterol	Estigmasterol
0.06	5.20 \pm 0.01 ^a	1.88 \pm 0.00	1.20 \pm 0.00	1.06 \pm 0.00	4.82 \pm 0.07
0.13	8.02 \pm 0.00	1.38 \pm 0.00	1.60 \pm 0.00	1.18 \pm 0.01	4.46 \pm 0.08
0.25	14.4 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	1.87 \pm 0.01	1.29 \pm 0.01	4.13 \pm 0.08
0.5	28.2 \pm 0.01	0.60 \pm 0.01	1.80 \pm 0.01	1.47 \pm 0.01	4.94 \pm 0.10
1	52.5 \pm 0.02	0.47 \pm 0.01	1.37 \pm 0.00	5.11 \pm 0.09	4.73 \pm 0.06

a, Media \pm SD (n = 3)

los datos se analizaron a triplicado

Como se puede observar en la Tabla VIII 4.1 todos los esteroides presentaron valores de actividad antioxidante muy similares entre ellos, solo en el caso de Estigmasterol se obtuvieron valores más elevados.

En el caso del β -Sitosterol baja su actividad al aumentar la concentración, mientras Campesterol mostro una actividad similar al α -Tocoferol cuando se aumentaron las concentraciones.

b) Actividad captadora de radicales libres de los esteroides mediante el método ABTS.

En la Tabla VIII 4.2 se muestran los resultados de la actividad antioxidante de los cuatro esteroides evaluados con el método ABTS.

Tabla. VIII 4.2. Porcentaje de actividad captadora de radicales libre (β -Sitosterol, Δ^5 -Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol) medido mediante la decoloración del ABTS⁺. Trolox fue usado como antioxidante de referencia.

Concentraciones (μ M)	Trolox	β - Sitosterol	Δ^5 - Avenasterol	Campesterol	Estigmasterol
6.25	1.2 \pm 0.02 ^a	0.06 \pm 0.01	0.39 \pm 0.00	0.30 \pm 0.00	—
12.5	2.7 \pm 0.01	—	1.25 \pm 0.00	1.21 \pm 0.07	5.42 \pm 0.01
25	3.1 \pm 0.00	1.08 \pm 0.01	0.64 \pm 0.00	0.66 \pm 0.02	1.25 \pm 0.08
50	5.1 \pm 0.01	0.29 \pm 0.00	—	0.83 \pm 0.01	0.71 \pm 0.01
100	10.3 \pm 0.01	—	0.99 \pm 0.00	—	0.65 \pm 0.01

a, Media \pm SD (n= 3)

— Índica que no se detecto capacidad captadora de los radicales libre

El β -Sitosterol, no presentó ninguna actividad antioxidante, mientras que Δ^5 -Avenasterol y Campesterol presentaron una actividad antioxidante muy débil. Estigmasterol mostró la actividad antioxidante más elevada a una concentración de 12.5 μM , para disminuir a concentraciones mayores.

c) Actividad captadora de radicales libres valorada mediante el método de ORAC

En la Figura VIII 4.2 se presentan los resultados de la capacidad antioxidante de los fitoesteroles medida mediante el método ORAC. En general, los fitoesteroles analizados no presentaron actividad antioxidante, solo β -Sitosterol mostró cierta actividad antioxidante a 100 μM . Para concentraciones superiores a 100 μM (datos no mostrados) ningún esteroles de los evaluados mostró actividad antioxidante. Por tanto, los esterolés evaluados no presentaron efecto antioxidante frente a los radicales peróxidos.

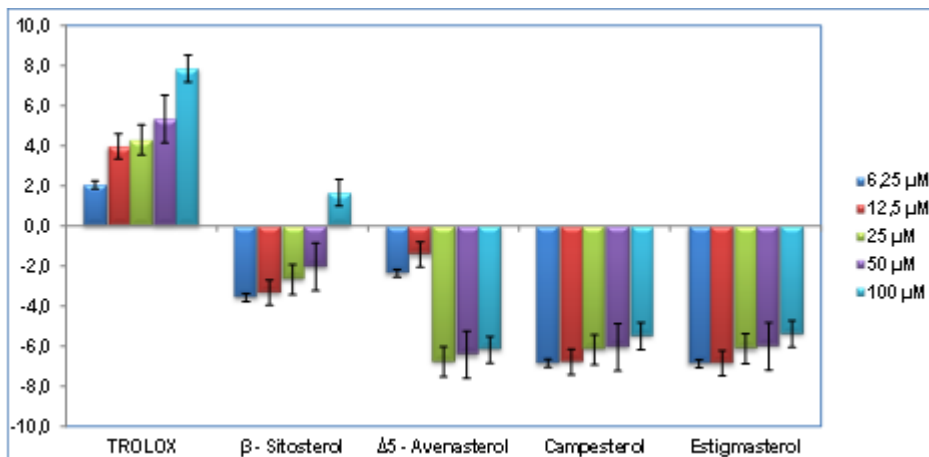


Figura VIII 4.2. Actividad captadora de radicales libres del β -Sitosterol, Δ^5 Avenasterol, Campesterol y Estigmasterol mediante el método ORAC

d) Actividad antioxidante mediante el método del Blanqueamiento del β – Caroteno.

Los resultados mostraron que (Tabla VIII 4.3), no todos los compuestos analizados fueron capaces de inhibir la formación de radicales libres catalizada por H_2O_2 . Como se puede observar en la Tabla VIII 4.3, el Δ^5 -Avenasterol y Estigmasterol presentaron una actividad antioxidante baja, mientras que los otros dos fitoesteroles no exhibieron efecto alguno. La mayor actividad antioxidante se obtuvo a bajas concentraciones

Tabla. VIII 4.3. Actividad antioxidante (expresado con porcentaje de inhibición de la cadencia) de los esteroides del aceite de oliva evaluado mediante el método blanqueamiento de β – Caroteno.

Concentraciones (μM)	BHT	β – Sitosterol	Δ^5 – Avenasterol	Campesterol	Estigmasterol
6.25	32.4 \pm 1.0 ^a	–	–	–	18.5 \pm 1.30
12.5	49.1 \pm 2.1	–	29.7 \pm 1.40	–	2.03 \pm 3.50
25	72.3 \pm 0.9	–	13.5 \pm 4.50	0.64 \pm 5.1	–
50	81.3 \pm 0.3	–	1.38 \pm 4.5	–	2.57 \pm 2.90
100	72.4 \pm 0.8	–	2.49 \pm 5.4	–	1.22 \pm 4.30

a, Media \pm SD (n: 3)

– *Índica que no se detecto capacidad captadora de los radicales libre*

e) *Actividad quelante de Cu⁺ de los esteroides.*

En la Figura VIII 4.3, se comparan los espectros obtenidos para cada compuesto (50 μM) en la presencia o ausencia de CuSO_4 (50 y 100 μM). Los esteroides presentaron un pico de absorbancia a (275 nm). La adición de CuSO_4 provocó el descenso de la absorbancia para todos los esteroides analizados. β -Sitosterol, Campesterol y Estigmasterol mostraron la mayor capacidad quelante a bajas concentraciones.

El Δ^5 -Avenasterol, (Figura VIII 4.3b), mostró una actividad quelante más alta respecto al resto de esteroides evaluados, aumentando con la concentración de Cu.

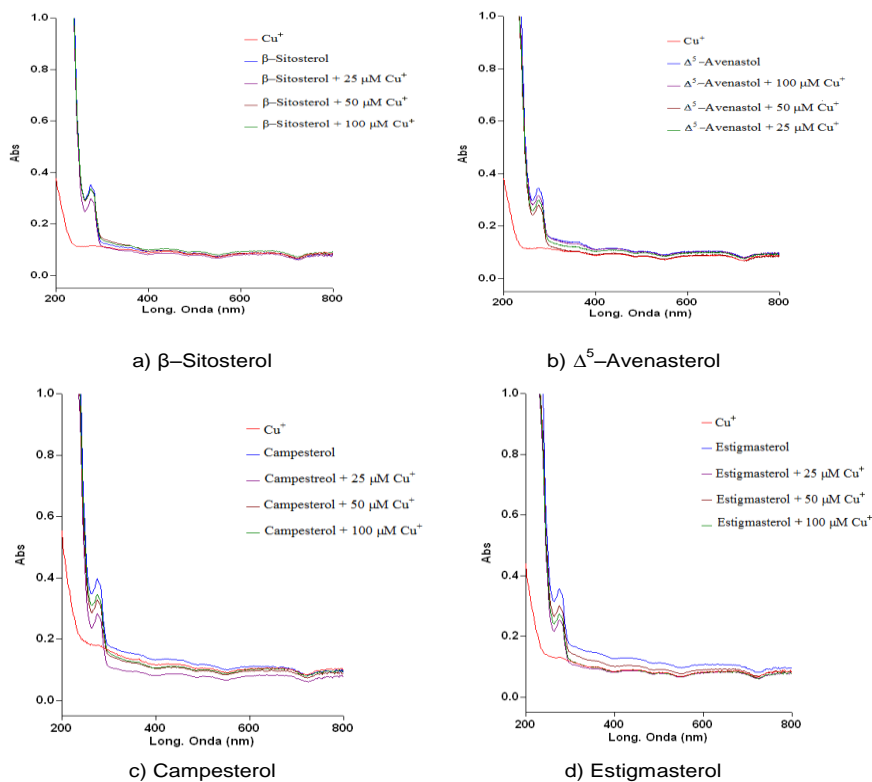


Figura VIII 4.3. Capacidad quelante de metal de los esteroides, a) β -Sitosterol, b) Δ^5 -Avenasterol, c) Campesterol y d) Estigmasterol y frente a las diferentes concentraciones de CuSO_4

f) Estabilidad Oxidativa del aceite de oliva virgen en la presencia de los esteroides

Para este ensayo se eliminaron de un aceite de oliva virgen extra los compuestos nutritivos y con capacidad antioxidante: polifenoles, tocoferoles y pigmentos. Este aceite fue fortificado con concentraciones crecientes de esteroides, adicionando diferentes cantidades de extracto esteróico.

El aceite de oliva virgen de partida mostro unos niveles de esteroides totales por encima de los límites establecidos por la Unión Europea (CEE, 2003). La Tabla VIII 4.4 recoge la composición de los esteroides del aceite de oliva estudiado.

Tabla VIII 4.4 Composición esteróica del aceite de oliva utilizado en ensayo.

Esteroides	%	mg/kg
Colesterol	1.0 ± 0.04 ¹	1.47 ± 1.3
Brassicasterol	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
24 – Metilencolesterol	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Campesterol	3.0 ± 0.11	63.3 ± 11
Campestanol	0.5 ± 0.37	1.96 ± 0.3
Estigmasterol	0.5 ± 0.07	9.23 ± 0.7
Clerosterol	0.9 ± 0.01	18.8 ± 4.3
β – Sitosterol	86.8 ± 0.22	1814 ± 414
Sitostanol	0.1 ± 0.03	1.47 ± 1.3
Δ⁵ – Avenasterol	6.5 ± 0.22	133.9 ± 23.9
Δ⁵ 24 – Estigmastadienol	1.0 ± 0.11	21.2 ± 7.8
Δ⁷ – Estigmastanol	0.2 ± 0.03	5.39 ± 2.6
Δ⁷ - Avenasterol	0.5 ± 0.06	9.57 ± 3.6
Esteroides Totales		2089 ± 485

¹ Media ± SD (n: 2)

La fortificación con esteroides del aceite de oliva purificado dio lugar a un incremento de su estabilidad oxidativa. Para un incremento en la concentración de 1000 mg/kg se alcanzaron los valores de estabilidad más altos aunque a concentraciones más elevadas se observó un ligero descenso.

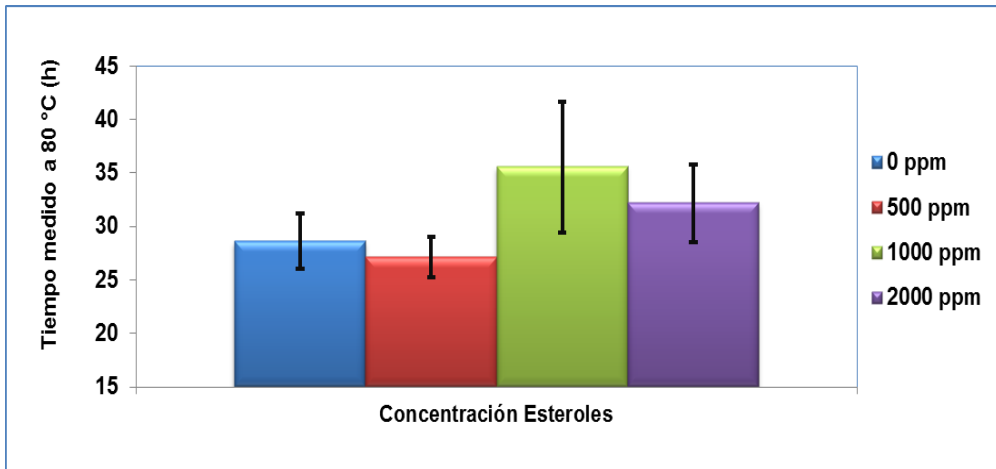


Figura VIII 4.4. Efecto de la fortificación de un aceite de oliva con diferentes concentraciones de esteroides en la estabilidad (valores medios \pm SD)

Discusión

En la literatura, se describe ampliamente la necesidad de utilizar más de un método cuando se evalúa la capacidad antioxidante de extractos vegetales debido a que los antioxidantes pueden actuar por mecanismos diferentes, dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria (Yu et al., 2002a).

Diferentes estudios han demostrado que los fitoesteroles poseen propiedades bioactivas. Sus efectos principales están relacionados con la reducción de los colesterol en la sangre (Plat y Mensink, 2002). Otros estudios han mostrado las propiedades de los fitoesteroles frente a enfermedades cardiovasculares y otras relacionadas con la inhibición de peroxidación de los lípidos (Van Rensburg et al., 2000). No obstante, los fitoesteroles presentan gran interés en estos últimos años por su efecto anticancerígeno (Raicht et al., 1980, Kassen et al., 2000).

Los fitoesteroles están considerados como compuestos que presentan actividad antioxidante. Diferentes estudios han mostrado este efecto a nivel celular (Paniagua Pérez et al., 2008) además protegen a los lípidos frente a la oxidación (Wang et al., 2002, Winkler y Warner, 2008, Hidalgo et al., 2009). En este estudio los ensayos utilizados evalúan la capacidad reductora de los fitoesteroles al actuar sobre radicales libres, obteniéndose una evaluación de un amplio rango del perfil metabólico de estos compuestos.

Los resultados obtenidos en este trabajo han mostrado que los fitoesteroles no se pueden considerar como unos compuestos de elevado actividad antioxidante a diferencia del comportamiento descrito en bibliografía. Cada esteroles estudiado en este trabajo se ha comportado en forma diferente en función de los métodos de medida de capacidad antioxidante utilizados.

Así, se ha observado que los fitoesteroles presentan una baja actividad para actuar como captadores libres medido tanto con el método DPPH como el ABTS⁺.

Así, el β -Sitosterol demostró de ser un compuesto con actividad muy débil o incluso neutral, medido mediante ambos métodos. No obstante, los resultados obtenidos para el β -Sitosterol con el método DPPH fueron similares a los descritos por Ferretti et al. (2010). A pesar de esto, se (Jayaprakasha et al. (2007) considera el β -Sitosterol como un compuesto con alta actividad antioxidante. En los estudios realizados por Paniagua et al. (2008) el β -Sitosterol fue capaz de prevenir la mutagénesis inhibiendo la formación de los radicales libres medido mediante el método DPPH.

Se ha estudiado la actividad quelante de los fitoesteroles con los iones metálicos como el hierro y el cobre, inhibiendo la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales están implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias (Ferretti et al., 2010). En este trabajo se ha observado que los fitoesteroles se podrían considerar como antioxidantes importantes, gracias a la capacidad de su estructura de atrapar los metales. La mayoría de los esteroides ensayados mostraron su mayor actividad quelante a dosis bajas, a excepción de Δ^5 -Avenasterol que presentó la mayor actividad quelante a elevadas concentraciones. Estos resultados se coinciden con los descritos por Ferretti et al. (2010) que observan como los fitoesteroides fueron capaces de proteger el LDL frente a la oxidación por cobre.

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, el β -Sitosterol y el Campesterol no presentaron en general efecto antioxidante, probablemente por presentar en su estructura solo un grupo metil en el carbono 24, lo que hace que estos esteroides sean más sensibles a la oxidación (Soupas, 2006).

En el caso particular de Estigmasterol su estructura química presenta un doble enlace en el carbono 5, capaz de formar radicales libres (Gordon y Magos, 1983), lo que explica la ausencia de actividad antioxidante (Nonhebel y Walton, 1974; Gordon y Magos, 1983). Sin embargo, en este estudio se ha observado una actividad antioxidante baja, valorada con los diferentes métodos de evaluación “*in vitro*”.

Habría de destacar, además como el Δ^5 -Avenasterol ha mostrado actividad antioxidante con más de tres métodos de los utilizados en este trabajo (Yo et al., 2002a). Su actividad antioxidante podría ser explicada por la presencia de grupo etilen en su estructura química (Gordon y Magos, 1983). Los autores White y Armstrong (1986), han demostrado la actividad antioxidante del Δ^5 -Avenasterol durante oxidación de los aceites con alto contenido en ácido linoleico además está la actividad antioxidante se ha confirmado cuando se ha analizado la estabilidad de diferentes aceites (Gordon y Magos, 1983).

En aceite de oliva, los fitoesteroles son los componentes mayoritarios de la fracción insaponificable. Diferentes autores han mostrado que los esteroides con un grupo etilo como Δ^5 -Avenasterol tienen efectos protectores de los aceites cuando se someten en temperaturas muy altas (Sims, et al., 1972; Gordon y Magos, 1983; White y Armstrong, 1986.), sin embargo, los esteroides que no tienen grupo etilo como β -Sitosterol y Campesterol mayoritarios en aceite de oliva, muestran efectos neutrales o ligeramente prooxidante (Sims et al., 1972; Gordon y Magos, 1983). Esto explicaría que el incremento de la concentración de fitoesteroides produzca solo un ligero incremento de la estabilidad del aceite de oliva virgen, resultados que discrepan de los descritos por Cercaci et al. (2007).

Conclusiones

Se puede concluir que el β -Sitosterol y el Campesterol no se pueden considerar como compuestos de carácter antioxidante, ya que han mostrado en este trabajo un comportamiento neutral o ligeramente prooxidante. Sin embargo, el Δ^5 -Avenasterol y Estigmasterol han mostrado en más de tres de los métodos empleados de evaluación de actividad antioxidante, que mostraron una capacidad moderada. La concentración o contenido de esteroides podría influir en la estabilidad oxidativa de los aceites de oliva.

Referencias

- Amin, I., Zamaliah, M.M., Chin, W.F. (2004). *Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables*. Food Chemistry. 87; 581 – 586.
- Bortolomeazzi, R., Cordano, F., Pizzale, L., Conte, L.S. (2003). *Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51; 2394 – 2401.
- Brand – Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 28; 25 – 30.
- CEE (2003). *Characteristics of olive and olive pomace oils and their analytical methods*. EEC Regulation 1989/2003. Official Journal of the European Communities. 295; 57 – 66.

- Cercaci, L., Passalacqua, G., Poerio, A., Rodriguez – Estrada, M.T., Lercker, G. (2007). *Composition of total sterols (4-desmethyl-sterols) in extravirgin olive oils obtained with different extraction technologies and their influence on the oil oxidative stability*. Food Chemistry. 102; 66 – 76.
- Clark, J.P. (1996). *Tocopherols and Sterols from Soybean*. Lipid Technology. 8; 111 – 114.
- Dutta, P. C. (1997). *Studies of phytosterol oxides II: Content in some vegetable oils and in French fries prepared in these oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 74; 659 – 666.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V. (2010). *Effect of phytosterols on copper lipid peroxidation of human low – density lipoproteins*. Nutrition. 26; 1 – 9.
- Gordon, M.H., Magos, P. (1983). *The effect of sterols on the oxidation of edible oils*. Food Chemistry. 10; 141 – 147.
- Grandgirard, A., Martine, L., Joffre, C., Juaneda, P., Berdeaux, O. (2004). *Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxycholesterol derivatives. Application to a phytosterol-enriched food*. Journal of Chromatography A. 1040; 239 – 250.
- Guo, C., Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). *High-performance liquid chromatography coupled with colometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: Relationship to oxygen radical absorbance capacity*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45, 1787–1796.
- Hartmann, M.A. (1998). *Plant sterols and the membrane environment*. Trends in Plant Science. 3; 170 – 175.

- Hidalgo, F.J., León, M.M., y Zamora, R. (2009). *Effect of β – Sitosterol in the antioxidante activity of oxidized lípido – amine reaction products*. Food Research International. 42; 1215 – 1222.
- IUPAC. (1992). *Determination of tocopherols and tocotrienol in vegetable fats by HPLC*. Method No. 2432. Standard method of analyses of oils, fats and derivatives. Oxford: Blackwell.
- Jayaprakasha, G.K., Mandali, K.K., Poullose, S.M., Jadegoud, Y., Nagana Gowda, G.A., Patila, B.S. (2007). *Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from Poncirus trifoliata (L.) Raf.* Bioorganic and Medicinal Chemistry. 15; 4923 – 4932.
- Kassen, A., Berges, R., Senge, T. (2000). *Effect of β – Sitosterol on transforming growth factor – beta – 1 expression and translocations protein kinase C alpha in human prostate stromal cells in vitro*. European Urology, 37; 735 – 741.
- Kochhar, S.P. (2000). *Stable and healthful frying oil for the 21st century*. Inform. 11; 642 – 647.
- Ling, W.H., Jones, P.J. (1995). *Dietary Phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects*. Life Sciences. 57; 195 – 206.
- Miller, H. E. (1971). *A simplified method for the evaluation of antioxidants*. Journal of the American Oil Chemical Society. 48; 91.
- Moure, A., Quimica, E., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., & Lema, J. M. (2000). *Evaluation of extracts from Gevuina avelana Hulls as antioxidants*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 48; 3890 – 3897.
- Nonhebel, D.C., Walton, J.C. (1974). *Free-radical chemistry*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Paniagua–Pérez, R., Madrigal–Bujaidar, E., Reyes–Cadena, S., Álvarez–González, I., Sánchez–Chapul, L., Pérez–Gallaga, J., Hernández, N., Flores–Mondragón, G., Velasco, O. (2008). *Cell protection induced by β – Sitosterol: inhibition of genotoxic damage, stimulation of lymphocyte production, and determination of its antioxidante capacity*. Archives of Toxicology. 82; 615 – 622.
- Peter, G.B., Awad. A.B. (2007). Phytosterols as anticancer compounds. Molecular Nutrition & Food Research. 52; 161 – 170. Quillez, J., García – Lorda, P., Salas – Salvado, J. (2003). *Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions*. Clinical Nutrition. 22; 343 – 351.
- Plat, J., Mensink, R.P. (2002). *Effects of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of healthy men and women*. The FASEB Journal. 16; 258 – 260.
- Pollak, O.J., Kritchevsky, D. (1981). *Sitosterol*. Monographs on Atherosclerosis. 10; 1 – 219.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch – Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R., (2003). *Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL)) of plasma and other biological and food samples*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 51; 3273 – 3279.
- Quilez J., Garcia – Lorda, P., Salas – Salvador, J. (2003). *Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions*. Clinical Nutrition. 22; 343 – 351.

- Rahman, A., Shahabuddin, S.M.H., Parish, J.H. (1990). *Complexes involving quercetin, DNA and Cu (II)*. *Carcinogenesis*. 11; 2001 – 2003.
- Raicht, R.F., Cohen, B.I., Fazzini, E.P., Sarwal, A.N., Takahashi, M. (1980). *Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats*. *Cancer Research*. 40; 403 – 405.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice – Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. *Free Radical Biology and Medicine*. 26; 1231 – 1237.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). *Structure– antioxidant activity relationships for flavonoids and phenolic acids*. *Free Radical Biology and Medicine*. 20; 933 – 956.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*. *Food Chemistry*. 66; 401 – 436.
- Sims, R.J., Fioriti, J.A., Kanuk, M.J. (1972). *Sterol additives as polymerisation inhibitors for frying oils*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 49; 298 – 301.
- Soupas, L., Juntunen, L., Lampi, A.M., Piironen, V. (2004). *Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52; 6485 – 6491.
- Soupas, L. (2006). *Oxidative stability of phytosterols in food models and foods*. *EKT-series 1370*. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Pg 58 – 110.

- Titan, L.L., White, P.J. (1994). *Antipolymerization activity of oat extract in soybean and cottonseed oils under frying conditions* Journal of the American Oil Chemists' Society. 71; 1087 – 1094.
- Van Rensburg, S.J., Daniels, W.M., van Zyl, J.M., Taljaard, J.J. (2000). *A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, betasitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone sulphate and melatonin on in vitro lipid peroxidation*. Metabolic Brain Disease. 15; 257 – 265.
- Von Gadov, A., Joubert, E., Hansmann (1997). *Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (Aspalathus linearis), α -tocopherol, BHT, and BHA*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 45; 632 – 638.
- Vázquez-Roncero, A., Janer del Valle, C., Janer del Valle, M.L. (1973). *Determinación de polifenoles totales del aceite de oliva*. Grasas y Aceites. 24; 350 – 357.
- Wang, T., Hicks, K.B., Moreau, R. (2002). *Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol con-jugates*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 79; 1201 – 1206.
- White PJ, Armstrong LS. 1986. *Effect of selected oat sterols on the detection of heated soybean oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 63; 525 – 529.
- Winkler, J.K., Warner, K. (2008). *The effect of phytosterol concentration on oxidative stability and thermal polymerization of heated oils*. European Journal of Lipid Science and Tecnology. 110; 455 – 464.
- Yoshida, H., Kondo, I., Kajimoto, G. (1992). *Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating*. Journal of the American Oil Chemical Society. 69; 1136 – 1140.

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson., J., Qian, M. (2002a). *Free radical scavering properties of wheat extract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50; 1619 – 1624.

DISCUSIÓN GENERAL

El aceite de oliva es un producto que presenta un elevado precio en el mercado, por lo que es relativamente frecuente diferentes mezclas fraudulentas con aceites de menor valor (Al Ismail et al., 2010). Por tanto, la determinación de la fracción esterólica es un parámetro muy importante en la detección de dichos fraudes (Chrisopoulou et al., 1996).

Teniendo en cuenta la importancia bioactiva del aceite de oliva existen límites establecidos por el Reglamento de la CE para proteger su autenticidad (Chrisopoulou et al., 1996). Entre los parámetro más importantes para evaluar la autenticidad del aceite de oliva virgen se encuentra el contenido y composición de los compuestos esterólicos. No obstante, el contenido de esta fracción puede mostrar gran variabilidad por la diversidad genética y la interrelación de diferentes factores que pueden influir sobre ella (Sánchez et al., 2004).

Entre los factores que influyen en el contenido de esteroides del aceite se encuentran factores agronómicos (clima, suelo y agua) (El Antari et al., 2000; Stefanoudakis et al., 2001), la recolección de los frutos (cultivar y madurez) (De la Torre et al., 1985; Fiorino y Nizzi, 1991; Mariani et al., 1991; Hajana et al., 1998; Koutsaftakis et al., 1999; Gutiérrez et al., 1999; Koutsaftakis et al., 2000), factores tecnológicos (almacenamiento del fruto y sistemas de extracción) (Koutsaftakis et al., 1999; Gutiérrez et al., 2000; Soledad, 2001; Salvador et al., 2003), factores geográficos (altura, latitud) (Durante y Matins, 1976; Christopoulou et al., 1996; Harwood y Aparicio, 2000) y procesos industriales (refinación y extracción con disolventes) (De Blas et al., 1996; Reina et al., 1997; Määttä et al., 1999; Piironen et al., 2000; Pasqualone y Catalano, 2000).

Además, los esteroides contribuyen en diferentes procesos bioactivos tanto en la planta como a nivel nutricional en humanos. Low (2000) demostró que los esteroides compiten con el colesterol cuando se absorben en el intestino, lo que le confieren un papel muy importante en proteger las LDLs frente a la oxidación (Andrikopoulous et al., 2002). También presentan propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes (Berger et al., 2004).

Por tanto, en esta memoria se ha estudiado la variabilidad de la composición en esteroides del aceite de algunas variedades principales y locales precedentes de diferentes países localizados en el Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba, así como la influencia de las condiciones de la preparación de la pasta de aceitunas y la actividad antioxidante de los esteroides principales encontrados en el aceite de oliva.

En principio en esta tesis se estudió la variabilidad en el contenido de esteroides del aceite de 43 variedades de olivo cultivadas en las mismas condiciones agronómicas y cuyo aceite fue extraído en las mismas condiciones. Se observó una gran variabilidad genética entre las variedades estudiadas, al igual que se ha descrito en la bibliografía existente. El contenido total de los esteroides en los aceites analizados se encuentran dentro de los límites establecidos (CEE, 2003) con alguna excepción para los aceites de la variedad 'Khashabi' que presento contenidos por debajo de estos límites (848 mg/kg); no obstante la variedad 'Sevillenca' dio lugar a unos aceites con un elevado contenido en esteroides que osciló alrededor de 2419 mg/kg.

Además del contenido total, se analizó la composición de la fracción esterólica especialmente en aquellos compuestos con los límites establecidos por la Reglamentación de la Comunidad Europea como son el Colesterol, Brasicasterol, Campesterol, Estigmasterol, β -Sitosterol Estimado y Δ^7 -Estigmastanol. En general, los aceites de las variedades estudiadas presentan un perfil de esteroides que se encuentra dentro de los límites establecido por CEE (2003), con alguna excepción para los aceites de las variedades 'Kalinjot' y 'Mixani' que presentan niveles de colesterol por encima del límite (≤ 0.5 %). Además, se observó que el 23 % de los aceites de oliva analizados mostraron un contenido en β - Sitosterol Estimado en unos niveles que no supera el límite (CEE, 2003).

Brasicasterol es un esteroide cuya presencia en el aceite de oliva virgen está en niveles muy bajos o trazas por lo que es difícil de cuantificar (Moreda et al., 1995). Además Gutiérrez et al. (1999) y Koutsaftakis et al. (2000) en sus trabajos mencionan que este esteroide está ausente en el aceite de oliva. Sin embargo, en los aceites estudiados el 68 % de las variedades mostraron la presencia de este esteroide que varía entre 0.08 y 0.01 %. Estos resultados demostraron no solo la presencia del Brasicasterol en los aceites monovarietales, sino que los diferentes contenidos obtenidos permiten discriminar de esta manera las variedades analizadas según el componente genético.

En cuanto la presencia del 24-Metilcolesterol en el aceite de oliva virgen, este compuesto indica el estado de la maduración del fruto (Sánchez et al., 2004; Koutsaftakis et al., 2000), es un metabolito de la síntesis del Campesterol (Sánchez et al., 2004), y su mayor contenido se encuentra en la pulpa de la aceituna (Chritopoulou et al., 1996). No obstante, se ha observado que en los aceites de las variedades 'Amigdalolia Nana',

'Frantoio', 'Lastovka' y 'Ulliri i Kuq' no se detectó este esteroide; la ausencia podría ser característica de la variedad teniendo en cuenta que el índice de madurez del fruto para todas variedades fue 3.

Algunas variedades tales como 'Morrut', 'Razzola', 'Kalinjot', 'Dolce Agogia' y 'Cepresino' han mostrado un elevado contenido en Campesterol superando el límite establecido por la Reglamentación de la Comunidad Europea (CEE, 2003). En general, los contenidos en Campesterol y Estigmasterol están relacionados con la calidad de los aceites (García, 2001) y la autenticidad de los mismos (Al Ismail et al., 2010), además se han descrito contenidos más elevados cuando la acidez del aceite es muy alta (Campera et al., 1978; Gutiérrez et al., 2000). Dado que los aceites de estas variedades han presentado unos niveles de acidez bajos (datos no publicados), el alto contenido en Campesterol podría ser un carácter genético propios de estas variedades.

Los demás esteroides presentes en los aceites analizados se encontraron dentro de los límites establecidos y presentan una gran variabilidad discriminado en esta manera las variedades estudiadas.

Los resultados obtenidos son similares a los trabajos descritos por Sánchez et al. (2004) y Lerma – García et al. (2011) por lo que se podría utilizar como una herramienta para discriminar y clasificar los aceites de oliva virgen monovarietales según el perfil de esteroides presentes en el mismo. De hecho el análisis de Componentes Principales clasificó los aceites analizados en cinco categorías según los esteroides principales y su contenido total.

La mayoría de las variedades estudiadas se encuentran en la categoría media, alta y muy altas.

Categoría I: Muy Alto.....	> 2200 mg/kg
Categoría II: Alto.....	1999 – 2200 mg/kg
Categoría III: Medio.....	1650 – 1999 mg/kg
Categoría IV: Bajo.....	1300 – 1650 mg/kg
Categoría V: Muy Bajo.....	< 1300 mg/kg

Sin embargo, el análisis Multivariante clasifica la composición de esteroides de los aceites, en cinco grupos, en los cuales la mayoría de las variedades se encuentran en el grupo IV, con bajo contenido en β -Sitosterol y alto contenido en Δ^5 -Avenasterol. Los grupos son los siguientes:

Grupo I: Muy Alto contenido en β -Sitosterol, muy bajo en Δ^5 -Avenasterol.

Grupo II: Alto contenido en β -Sitosterol, bajo contenido en Δ^5 -Avenasterol.

Grupo III: Valor medio en β -Sitosterol y Δ^5 -Avenasterol y alto contenido en Campesterol y Estigmasterol.

Grupo IV: Bajo contenido en β -Sitosterol, alto contenido en Δ^5 -Avenasterol.

Grupo V: Muy bajo contenido en β -Sitosterol, muy alto contenido en Δ^5 -Avenasterol.

Una vez estudiado el perfil de los esteroides de las variedades elegidas, otro ensayo de este trabajo estudió la influencia de la etapa de preparación de la pasta de la aceituna. Diferentes autores han descrito que el proceso de extracción del aceite de oliva es un factor determinante en el perfil de los esteroides. La preparación de la pasta ha mostrado una gran influencia en otros componentes minoritarios tales como: tocoferoles, pigmentos (Beltrán et al., 2011), polifenoles (Catalano y Caponio, 1996; Servili et al., 1994), ácidos triterpenicos (Cert et al., 1999; Allouche et al., 2010), compuestos volátiles (Angerosa et al., 2002), y etc. Sin embargo, existen pocos estudios que relacionen esta etapa del proceso con el contenido de esteroides en el aceite de oliva virgen.

En este trabajo se han estudiado el efecto de las condiciones de molienda a nivel industrial evaluado por los dos molinos ensayados; Listello y Criba perforada, el efecto del grado de molienda y la velocidad de giro de los martillos; por otro lado, se ha estudiado de forma combinada el efecto del grado de molienda (con molino de criba fija) y las condiciones de batido de la pasta a nivel de laboratorio.

En general, se observa que hay un incremento de los niveles de esteroides en el aceite de oliva cuando se muele con un grado de molienda más fino, que permite una mayor liberación de los compuestos esteroidicos.

A la vista de los resultados se observó que el contenido de los esteroides totales aumentó cuando se utilizó el molino de Listello con elevadas velocidades de giro. Además, el porcentaje de la variabilidad explicada mostró que la velocidad de giro de los martillos influyo de forma más

importante que el grado de la molienda. Para algunos esteroides como Campesterol, Δ^5 -Avenasterol y Esteroides Totales la velocidad de giro de los martillos alcanzó un nivel de significación de $P \leq 0.0001$.

Cuando las aceitunas se trituraron con el molino de Criba Perforada, se observó un mayor contenido en esteroides, cuando se utilizan velocidades de giro muy bajas, y grados de molienda mayores ($P \leq 0.05$).

En cuanto el efecto de tipo de molino en la fracción esteróica se observó que los frutos triturados con el molino de Listello en velocidades de giro menores obtuvieron aceite de oliva virgen con elevado contenido de esteroides ($P \leq 0.05$) en comparación a los triturados con Criba Perforada.

El molino de Criba fija (utilizado en los ensayos a nivel de laboratorio) produjo elevados contenidos de esteroides cuando los frutos de trituraron utilizando grados de molienda pequeños ya que las velocidades utilizadas en este ensayo fueron más elevadas que las ensayados en los otros molinos. En general, los contenidos de esteroides en todos los casos se encontraron dentro de los límites establecidos (CEE, 2003), con alguna excepción para el molino de Listello molturado con un grado de molienda y velocidad de giro de los martillos muy bajos.

Cert et al. (1997) han descrito que la molienda no influye en el contenido de esteroides en el aceite de oliva, no obstante, en este trabajo se ha demostrado que la molienda es un factor muy importante en el contenido de esteroides.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron una estrecha relación entre la velocidad de los martillos y el grado de la molienda para obtener una molienda adecuada para mayores contenidos de esteroides en el aceite de oliva virgen. Asimismo, la elección tipo determinado de molino permite además la modulación de estos compuestos.

El batido es otra etapa de gran interés en la extracción del aceite de oliva; durante este proceso se reúnen todas las gotas del aceite que se liberan por el proceso de la molienda. En los resultados obtenidos en este trabajo, se observó cómo los contenidos en esteroides presentaron niveles significativamente diferentes en función del tiempo y la temperatura utilizada. Koutsaftakis et al. (1999) describe que el contenido en esteroides disminuye cuando se utilizan temperaturas alrededor de 45 °C durante el batido, aumentando el ratio entre Campesterol y Estigmasterol. No obstante, Guillaume et al. (2011) describió que el contenido de esteroides en aceite de oliva aumenta al incrementar la temperatura del batido.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo con los descritos por Koutsaftakis et al. (1999), que obtuvieron contenidos en esteroides más elevados durante el batido con temperaturas que no superen los 30 °C. Además los contenidos en Campesterol y Estigmasterol se encuentran dentro de los límites establecidos por la Reglamentación de la CEE, (2003).

En cuanto al tiempo del batido, se obtuvieron mayores contenidos de esteroides en el aceite de oliva cuando la pasta de aceituna se batió durante 20 minutos. Sin embargo, Di Giovachino et al. (2002) describieron que las

condiciones del batido (tiempo y temperatura) no dan lugar a diferencias significativas en la composición de los esteroides del aceite de oliva virgen.

En general, las condiciones de la preparación de la pasta influyen de forma significativa en la fracción esteróica del aceite de oliva. La interacción de todas las condiciones de preparación de la pasta (molienda y batido) han mostrado un efecto significativo sobre el contenido de 24-Metilcolesterol, Δ^5 -Avenasterol y Esteroides totales alcanzando una significación de $P \leq 0.01$.

A pesar de la bibliografía existente, los resultados de este trabajo han demostrado estadísticamente que las etapas de preparación de la pasta son un factor determinante en el contenido de los esteroides del aceite de oliva, lo que podría permitir la modulación de la fracción esteróica del aceite tanto para mejorar su potencial bioactivo como para adaptar la composición y contenido a los límites establecidos por la Reglamentación vigente.

Otro aspecto de gran interés de los esteroides en estos últimos años son las propiedades bioactivas que han mostrado. Diferentes autores (Ferretti et al., 2010; Hidalgo et al., 2009; Paniagua et al., 2008; Winker y Warner, 2008; Wang et al., 2002; White y Armstrong, 1986; Gordon y Magos, 1983) han sostenido la teoría de que los esteroides presentan actividad antioxidante y que esta actividad podría mostrar beneficios frente a diferentes enfermedades como la aterosclerosis (Loscalzo, 2003) y cáncer (Quong et al., 2002). Además Wang et al. (2002) y Peterson, (2001) sugieren que la

actividad antioxidante del aceite de soja, arroz y avena puede estar en parte relacionada con su contenido de esteroides.

En este trabajo se eligieron los cuatro esteroides más abundantes (β -Sitosterol, Campesterol, Estigmasterol y Δ^5 -Avenasterol) del aceite de oliva virgen y un extracto de esteroides extraído por el aceite de oliva virgen para la evaluación de su actividad antioxidante mediante diferentes métodos. En general, solo Δ^5 -Avenasterol y Estigmasterol presentaron una capacidad antioxidante moderada valorada con los métodos ABTS, DPPH y Blanqueamiento del β -Caroteno. Sin embargo, los cuatro esteroides ensayados mostraron una elevada actividad quelante, esta actividad se reflejó también en los trabajos realizados por Ferretti et al. (2010).

Δ^5 -Avenasterol es un esteroide que se encuentra en el aceite de oliva en un rango de < 0.02 % (Itoh et al., 1973), según Gordon y Magos (1983) este esteroide muestra una ligera actividad antioxidante en esta concentración cuando el aceite se calienta a 180 °C, sin embargo, esta actividad podría ser un efecto sinérgico con otros compuestos insaponificables presentes en el aceite de oliva virgen (Gordon y Magos, 1983).

Según Gordon y Magos (1983) existe una hipótesis que explica la eficacia de los esteroides como antioxidantes. Este efecto está relacionado con la estructura del esteroide que le permite reaccionar rápidamente con los radicales libres, para formar radicales libres relativamente estables. Los radicales libres relativamente estables interrumpen la reacción en cadena de la auto-oxidación de triglicéridos. El efecto antioxidante es mayor cuando la formación de radicales libres del esteroide es relativamente rápida debido a

la presencia de átomos de hidrógeno, sobre un átomo de carbono alílico (Nonhebel y Walton, 1974). Por tanto, los esteroides con un grupo etileno en la cadena lateral son más eficaces como antioxidantes, pero el efecto antioxidante pueden derivarse por la presencia y posición de uno o más dobles enlaces endocíclicos.

A pesar de los trabajos realizados por Cercaci et al. (2007) que describen los esteroides como unos compuestos que no interfieren en la estabilidad del aceite de oliva, este trabajo demostró que la fortificación del aceite con un extracto de esteroides en concentraciones de 1000 mg/kg incrementó la estabilidad del aceite purificado. Teniendo en cuenta que los aceites de las variedades estudiadas tales como 'Beyaz Yangl', 'Callosina', 'Frantoio', 'Galega Vulgar', 'Kerkiras', 'Kotruvsi', 'Lechin de Granada', 'Mision de San Visente', 'Nevado Azul', 'Pajarero', 'Picholin Marrocaïne', 'Plementa Bjelica', 'Racimal', 'Saloneque', 'St Goerge Grey', 'Zalmati' y 'Zarza' han mostrado unos contenidos similares a los concentraciones que se utilizaron en este ensayo.

CONCLUSIONES

En la memoria de esta Tesis Doctoral se ha obtenido las siguientes conclusiones:

1. Existe una gran variabilidad en la fracción esterólica presentes en los aceites monovarietales. Esta variabilidad, se debe al componente genético, teniendo en cuenta que las condiciones agronómicas, el estado de maduración del fruto y las condiciones de extracción del aceite fueran similares.
2. El analizador de componente principal utilizado en este trabajo pudo discriminar y clasificar los aceites de oliva virgen según a los niveles de los esteroides presentes en el mismo.
3. El proceso de molienda presenta una gran influencia en el contenido de los esteroides del aceite de oliva virgen. Sus niveles varían en función del tipo de molino y las condiciones utilizadas.
4. La molienda con el molino de Listello permite en obtener niveles más elevados de esteroides con grado de molienda más gruesa y elevado régimen de giro de los martillos, mientras que en molino de Criba Perforada se mejora con velocidades de giro más bajas.
5. Durante el proceso del batido de la pasta de la aceituna las condiciones del batido (Temperatura y Tiempo), son dos factores muy importantes para el contenido en esteroides en el aceite.
6. Los esteroides muestran niveles significativamente más altos cuando las temperaturas utilizadas durante el proceso del batido no superan a los 30 °C y el tiempo de batido es menor.
7. De la evaluación de la actividad antioxidante de los esteroides mediante diferentes métodos, se puede establecer que estos compuestos muestran una baja actividad antioxidante.

8. β -Sitosterol y Campesterol no presentaron ningún efecto antioxidante con la mayoría de los métodos utilizado en este estudio. No obstante estos dos esteroides presentaron una cierta actividad quelante frente a los metales como el resto de los esteroides analizadas en este estudio.
9. Δ^5 -Avenasterol y Estigmasterol presentaron en obtener una actividad antioxidante moderada.
10. Los resultados obtenidos en este estudio presentaron que los esteroides influyen en la estabilidad del aceite de oliva virgen en concentraciones 1000 mg/kg.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahrens, E.H. Jr., Boucher, C.A. (1978). *The composition of a simulated American diet. Comparison of chemical analyses and estimates from food composition tables.* Journal of the American Dietetic Association. 73: 613 – 620.
- Ahrens, E.H. Jr., Insull, W. Jr., Blomstrand, R., Hirsch, J., Tsaltas, T.T., Peterson, M.L. (1957). *The influence of dietary fats on serum-lipid levels in man.* Lancet. 272: 943 – 953.
- Akihisa, T., Kokke, W., Tamura, T. (1991). *Naturally occurring sterols and related compounds from plants. In Physiology and biochemistry of sterols. Edited by G.W. Patterson & W.D. Nes.* The American Oil Chemists Society, Champaign. Illinois. pg.172 – 228.
- Alba, J. (2004). *Elaboración del aceite de oliva virgen. Cultivo de olivo, 5ª edición, Junta de Andalucía, Conserjería de Agricultura y Pesca, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid Barcelona México.* pg. 629.
- Al-Ismail, K.M., Alsaed, A.K., Ahmad, R., Maher Al-Dabbas, M. (2010). *Detection of olive oil adulteration with some plant oils by GLC analysis of sterols using polar column.* Food Chemistry. 121: 1255 – 1259.
- Allouche, Y., Jimenez, A., Uceda, M., Aguilera., M.P., Gaforio, J.J., Beltrán, G. (2010). *Influence of olive past preparation condition on virgin olive oil triterpenic compounds at laboratory – scale.* Food Chemistry. 119: 765 – 769.
- Amelotti, G., Morchio, G. (1977). *Sulla composizione sterolica dell olio di oliva di pressione de la provincia dei Lumperia.* Rivista italiana di scienza degli alimenti. 6: 239 – 242.
- Amr, A.S., Abu, A., Rub, A.I. (1993). *Evaluation of the Bellier Test in the Detection of Olive Oil Adulteration with Vegetable Oils.* Journal of the Science of Food and Agriculture. 61: 435 – 437.

- Angerosa, F. (2002). *Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels*. European Journal of Lipid Science and Technology. 104: 639 – 660.
- Aparicio, R., Luna G. (2002). *Characterizacion of monovarietal virgin olive oils*. European Journal of Lipid Science and Technology. 104: 614 – 627.
- Arnqvist, L. (2007). *Plant Sterol Metabolism with Emphasis on Glycoalkaloid Biosynthesis in Potato*. Tesis Doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences. Pg. 14.
- Awad, A.B., Chen, Y.C., Fink, C.S., Hennessey, T. (1996). *Beta-Sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids*. Anticancer Research. 16: 2797 – 804.
- Awad, A.B., Fink, C.S. (2000). *Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action*. Journal of Nutrition. 130: 2127 – 2130.
- Awad, A.B., Hernández, A.Y., Fink, C.S., Mendel, S.L. (1997). *Effect of dietary phytosterols on cell proliferation and protein kinase C activity in rat colonic mucosa*. Nutrition and Cancer. 27: 210 – 215.
- Awad, A.B., Smith, A.J., Fink, C.S. (2001). *Plant sterols regulate rat vascular smooth muscle cell growth and prostacyclin release in culture*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 64: 323 – 330.
- Bach, T.J., Benveniste, P. (1997). *Cloning of cDNAs or genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants and other eukaryotes: heterologous expression and complementation analysis of mutations for functional characterization*. Progress in Lipid Research. 36: 197 – 226.

- Barrio Pérez-Cerezal, A., Del Gutiérrez Rosales, F., Cabrera Martín, J., González-Quijano, R. (1983). *Aplicación de la cromatografía gas-líquido, técnicas de espacios de cabeza, al problema del atrojado de los aceites de oliva* 11. *Grasas y Aceites*. 34: 1 – 5.
- Beltran, G., Aguilera, M.P., Allouche, Y., Jimenez, A. (2011). *Efecto de las condiciones de molienda del molino Listello sobre el rendimiento del proceso y las características del aceite*. Expoliva'11. XV Simposio científico-técnico del aceite de oliva. Foro de la Industria, Tecnología y Calidad Oleícola: Ind – 45.
- Benveniste, P. (2002). *Sterol metabolism*. In *The Arabidopsis Book*. Edited by C. Somerville & E. Meyerowitz. The American Society of Plant Biologists. Rockville. Maryland.
- Benveniste, P. (2004). *Biosynthesis and accumulation of sterols*. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 429 – 457.
- Beneke, F.W. (1862). *Cholesterin im Pflanzenreich aufgefunden*. *Annalen der Chemie und Pharmacie*. 122: 249 – 255.
- Berger, A., Jones, P.J., Abumweis, S.S (Review) (2004). *Plant sterol: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients*. *Lipids in Health and Disease*. 3 – 5: 1 – 19.
- Berges, R.R., Windeler, J., Trampisch, H.J., Senge T. (1995). *Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia*. *Beta-sitosterol Study Group*. *Lancet*. 345: 1529 – 1532.
- Berthelot. (1859). *Sur plusieurs alcools nouveaux. Combinaisons des acides avec la cholestérine, l'éthyl, le camphre de Bornéo et la méconine*. *Annual Review of Physical Chemistry*. 56 : 51 – 98.

- Bianchi, G., Giansante, L., Shaw, A. Kell, D.B. (2001). *Chemometric criteria for the characterisation of Italian Protected Denomination of Origin (DOP) olive oils from their metabolic profiles*. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 103: 141 – 145.
- Bills, C.E. (1935). *Physiology of the sterols, including vitamin D*. *Physiological Reviews*. 15: 1 – 97.
- Blair, S.N., Capuzzi, D.M., Gottlieb, S.O., Nguyen, T., Morgan, J.M., Cater, N.B. (2000). *Incremental reduction of serum total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol with the addition of plant stanol ester-containing spread to statin therapy*. *American Journal of Cardiology*. 86: 46 – 52.
- Blanch, G.P., Villen, J., Herraiz, M. (1998). *Rapid Analysis of Free Erythrodiol and Uvaol in Olive Oils by Coupled Reversed Phase Liquid Chromatography–Gas Chromatography*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 1027 – 1030.
- Boskou, D. (1996). *Olive oil composition*. En: “Olive oil chemistry and technology” Boskou, D. Eds. AOCS Press. Champaign. Illinois.
- Boskou, D., Morton, I.D. (1975). *Changes in the sterol composition of olive oils on heating*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 26: 1149 – 1154.
- Boskou, D., Vlachopoulou, J. (1986). *On the level of sterol esters in olive oil*. *Lebensmittelwiss u Technol*. 19: 156 – 160.
- Bouic, P.J., Clark, A., Lamprecht, J. (1999). *The effects of B-sitosterol (BSS) and Bsitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: Inhibition of post marathon immune suppression and inflammation*. *International Journal of Sports Medicine* 20: 258 – 262.

- Bruckdorfer, K.R., Demel, R.A., De Gier, J., Van Deenen, L.L. (1969). *The effect of partial replacements of membrane cholesterol by other steroids on the osmotic fragility and glycerol permeability of erythrocytes*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 183: 334 – 345.
- Burón, I., García Teresa, R. (1979). *La calidad del aceite de oliva*. *Comunicaciones INIA*. Madrid.
- Calapaj, R., Chiricosta, S., Saija, G., Binova, V. (1993). *Evaluation of gas chromatographic and spectrophotometric analytical results to check the presence of seed oils in olive sample*. *La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse* 70. 585 – 590.
- Camera, L., Angerosa, F., Cucurachi, A. (1978). *The influence of olive storage on the constituents of oil sterolic fraction*. *La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse*: 107 – 110.
- Casas, J.S., Bueno, E.O., García, A.M.M., Cano, M.M. (2004). *Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain)*. *Food Chemistry*. 87: 225–230.
- Catalanol, P., Caponio, F. (1996). *Machines for olive paste preparation producing quality virgin olive oil*. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 98: 408 – 412.
- Cercaci, L., Passalacqua, G., Poerio, A., Rodriguez – Estrada., M.T., Lercker, G. (2007). *Composition of total sterols (4-desmethyl-sterols) in extravirgin olive oils obtained with different extraction technologies and their influence on the oil oxidative stability*. *Food Chemistry*. 102: 66 – 76.
- Cerqueira, M.T., Fry, M.M., Connor, W.E. (1979). *The food and nutrient intakes of the Tarahumara Indians of Mexico*. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 32: 905 – 915.

- Cert, A., Moreda, W., García-Moreno, J. (1997). *Determinación de esteroides y alcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico*. Grasas y Aceites. 48: 207 – 218.
- Cert, A., Alba, J., Pérez – Comino, M.C., Riuz – Gómez, A., Hidalgo, F., Moreda, W. (1999). *Influencia de los sistemas de extracción sobre las características y de los componentes menores del aceite de oliva virgen extra*. Olivae. 79: 41 – 50.
- Chartzoulakis, K., Patakas, A. Bosabalidis, A.M. (1999). *Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivar*. Environmental and Experimental Botany. 142, 113 – 117.
- Chevreul, M.E. (1815). *Recherches chimiques sur plusieurs corps gras et particulièrement sur leurs combinaisons avec les alkalis*. Annual Chemistry. 94: 113 – 144.
- Child, P., Kuksis, A. (1982). *Differential uptake of cholesterol and plant sterols by rat erythrocytes in vitro*. Lipids. 17: 748 – 754.
- Christakis, G., Fordyce, M.K., Kurtz, C. (1982). *Aspectos biológicos y médicos del aceite de oliva*. Ed. COI.
- Christopoulou, E., Lazaraki, M., Alexiou, F., Synouri, S., Frangiscos, E. (1996). *Influence of certain factors on the composition of olive – pomace oils. Part II Sterols, triterpenic dialcohols and aliphatic alcohols*. La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse. 73. 201 – 211.
- Civantos, L., Conteras, R., Grana, R. (1992). *Obtención de aceite de oliva virgen*. Editorial Agrícola Española, S.A., Madrid.

- Clifton, P. (2002). *Plant sterol and stanols—comparison and contrasts. Sterols versus stanols in cholesterol-lowering: Is there a difference?* *Atherosclerosis*. 3: 5 – 9.
- COI. (1991). *Colección de manuales prácticos. Mejora de la calidad del aceite de oliva*. Madrid. España. pg. 79.
- Comisión Europea (1991). *Reglamento 2568/91. Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.
- Comisión Europea (1993). *Reglamento 183/93. Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.
- Consejo Oleícola Internacional (1987). *Valoración organoléptica del aceite de oliva virgen*. T-20.
- Conte, L.S., Caboni, M.F., Larcker, G. (1993). *Gli oli di oliva della Romagna Nota II: gli oli del riminese*. *La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse*. 70: 249 – 254.
- De Blas, O.J., Del Valle, A. (1996). *Determination of Sterols by Capillary Columns Gas Chromatography. Differentiation Among Different Types of Olive Oil: Virgin, Refined and Solvent – Extracted*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 73: 1685 – 1689.
- De Jong, A., Plat, J., Mensink, R.P. (2003). *Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review)*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 14: 362 – 369.
- De la Duarte, H.M.P., Martins, R.M.B.S. (1976). *Insaponifiable des corps gras. Fraction stérolique des huiles d'olive vierges portugaises*. *Grasas y Aceites*. 27: 101–106.

- De La Torre, M.C., López, M.C., Coleil, J. (1985). *Evolución de la fracción esterólica durante la maduración de las aceitunas*. *Grasas y Aceites*. 36: 198 – 202.
- Denke, M.A. (1995). *Lack of efficacy of low-dose sitostanol therapy as an adjunct to a cholesterol- lowering diet in men with moderate hypercholesterolemia*. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 61: 392 – 396.
- Di Giovacchino, L., Costantini, N., Ferrante, M.L., Serraiocco, A. (2002). *Influence of melaxation time of olive paste on olive oil extraction yields and chemical and organoleptic characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving*. *Grasas y Aceites*. 53: 179 – 186.
- Dobarganes, M.C. (1984). *Proceeding of the first International on "Frying of food"*. *Expoliva – 89*, Jaén.
- EEC (2003). *Characteristics of olive and olive pomace oils and their analytical methods*. EEC Regulation 1989/2003. *Official Journal of the European Communities*, 295, 57–66.
- El Agaimya, M.A., Netta, W.E., El-Sayedb. M., Awatif, I.I. (1994). *Effect of Saline Irrigation Water on Olive Oil Composition*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 71: 1287 – 1291.
- El Antari, A., Hilal, A., Boulouha, B. y El Moudni, A. (2000). *Estudio de la influencia de la variedad, de los factores ambientales y las técnicas de cultivo en las características de los frutos y la composición química del aceite de oliva virgen extra de Marruecos*. *Olivae*. 80, 29 – 33.
- Ellis, M.T. (1918). *Contributions to our knowledge of the plant sterols. Part I. The sterol content of wheat (Triticum sativum)*. *Biochemical Journal*. 12: 160 – 172.

- Fanguin J. (1990). *Procedimientos para medir los resultados de la centrifugación*. *Oleagineux* 45: 237 – 239.
- Farhoosh, R., Tavassoli-Kafrani, M.H., Sharif, A. (2011). *Antioxidant activity of the fractions separated from the unsaponifiable matter of bene hull oil*. *Food Chemistry*. 126: 583 – 589.
- Favier, J.P., Bicanic, D., Cozijnsen, J., Veldhuizen, B., Helander, P. (1998). *CO₂, Laser Infrared Optothermal Spectroscopy for Quantitative Adulteration Studies in Binary Mixtures of Extra-Virgin Olive Oil*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75: 359 – 362.
- Fedeli, E. (1977). *Lipids of olives*. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. 15: 57 – 61.
- Ferreiro, L., Aparicio, R. (1991). *Influencia de la altitud en la composición química de los aceites de oliva vírgenes de Andalucía. Ecuaciones matemáticas de clasificación*. *Grasas y Aceites*. 43: 149 – 156.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V. (2010). *Effect of phytosterols on copper lipid peroxidation of human low – density lipoproteins*. *Nutrition*. 26: 1 – 9.
- Fiorino, P., Nizzi Grifi, F. (1991). *Maturazione delle olive e variación di alcuni componente dell'olio*. *Olivae*. 35: 25 – 28.
- Flath, R.A., Forrey, R.R., Guadagni, D.G. (1973). *Aroma compounds of olive oil*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 21: 948 – 951.
- Frías, L., Ruano, M.T. (1989). *Comportamiento de diferentes aceites vegetales en la fritura de los alimentos*. 1. Er. Simposio Nacional del Aceite de Oliva. Expoliva – 89, Jaén.

- García, J.M., Gutiérrez, F., Barrera, M.J., Albi, M.A. (1996). *Storage of oil mill olives on an industrial scale*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 550 – 554.
- Giglioti, C., Daghetta, A., Sidoli, S. (1993). *Study of Triglyceride Composition of Seed oils with High Oleic Acid Content*. La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse. 70: 533 – 539.
- Gracia, M. S. (2001). *Composición química de distintas calidades de aceites de oliva virgen de la variedad "Empetre" en el bajo Aragón*. Grasas y Aceites. 52: 52–58.
- Gordon, M.H., Magos, P. (1983). *The effect of sterols on the oxidation of edible oils*. Food Chemistry. 10: 141 – 147.
- Graciani Constante, E., Vázquez Roncero, A. (1981). *Estudio de los componentes polares del aceite de oliva por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) III. Aplicación a diversos tipos de aceites vírgenes*. Grasas y Aceites. 32: 365 – 371.
- Grob, K., Lanfranchi, M., Miriani, C. (1990). *Evaluation of olive oil through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 67: 626 – 630.
- Guillaume, C., Ravetti, L., Lala, D., Johnson, R.J. (2011). *Technological Factors Affecting Sterols in Australian Olive Oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. Published online 26 June 2011.
- Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruiz, A., Albi, M.A (1999). *Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin oil extracted from the varieties 'Picual' and 'Hojiblanca' and the different components involved*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 121 – 127.

- Gutiérrez, F., Varona, F., Albi, A. (2000). *Relation of Acidity and Sensory Quality with Sterol Content of Olive Oil from Stored Fruit*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 1106 – 1110.
- Gylling, H., Miettinen, T.A. (1994). *Serum cholesterol and cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholesterolaemic NIDDM patients before and during sitostanol ester-margarine treatment*. Diabetologia. 37: 773 – 780.
- Gylling, H., Puska, P., Vartiainen, E., Miettinen, T.A. (1999). *Serum sterols during stanol ester feeding in a mildly hypercholesterolemic population*. The Journal of Lipid Research. 40: 593 – 600.
- Gylling, H., Radhakrishnan, R., Miettinen, T.A. (1997). *Reduction of serum cholesterol in postmenopausal women with previous myocardial infarction and cholesterol malabsorption induced by dietary sitostanol ester margarine: Women and dietary sitostanol*. Circulation. 96: 4226 – 4231.
- Hallikainen, M.A., Sarkkinen, E.S., Uusitupa, M.I. (2000). *Plant stanol esters affect serum cholesterol concentrations of hypercholesterolemic men and women in a dosedependent manner*. Journal of Nutrition. 130: 767 – 776.
- Hallikainen, M.A., Uusitupa, M.I. (1999). *Effects of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low-fat diet in hypercholesterolemic subjects*. The American Journal of Clinical Nutrition. 69: 403 – 410.
- Hajana, H., El Antari, A., Hafifi, A. (1998). *Fatty acids, sterol evolution during the ripening of olives from the Moroccan Picholine cultivar*. Grasas y Aceites. 49: 405–410.

- Hendriks, H.F., 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: 319 – 327.
- Hermoso, M., Uceda, M., García-Ortiz, A., Morales, J., Frías, L., Fernández, A. (1991). *Elaboración de aceite de oliva de calidad*. Dirección General de Investigación, Tecnología y Formación Agroalimentaria y Pesquera. Junta de Andalucía, pg. 176.
- Hidalgo, F.J., León, M.M., y Zamora, R. (2009). *Effect of β – Sitosterol in the antioxidante activity of oxidized lípido – amine reaction products*. Food Research International. 42: 1215 – 1222.
- Hirai, K., Shimazu, C., Takezoe, R., Ozeki, Y. (1986). *Cholesterol, phytosterol and polyunsaturated fatty acid levels in 1982 and 1957 Japanese diets*. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 32: 363 – 372.
- Howell, T.J., Mac Dougall, D.E., Jones, P.J. (1998). *Phytosterols partially explain differences in cholesterol metabolism caused by corn or olive oil feeding*. The Journal of Lipid Research. 39: 892 – 900.
- Inglese, P., Barone, E., Gullo, G. (1996). *The effect of complementary irrigation on fruit ripening pattern and oil characteristics of olive (Olea europea L) cv. Carolea*. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 71: 257 – 261.
- Itoh, T., Tamura, T., Matsumoto, T. (1973a). *Sterol composition of 19 vegetable oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 50: 122 – 125.

- Itoh, T., Tamura, T., Matsumoto, T. (1973b). *Methylsterol composition of 19 vegetables oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 50: 300 – 304.
- Itoh, T., Yoshida, K., Yatsu, T., Tamura, T., Matsumoto, T. (1981). *Triterpene alcohols and sterol of Spanish olive oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 58: 545 – 550.
- Janezic, S.A., Rao, A.V. (1992). *Dose-dependent effects of dietary phytosterol on epithelial cell proliferation of the murine colon*. Food and Chemical Toxicology. 30: 611 – 616.
- Jiang, Y., Wang, T. (2005). *Phytosterols in cereal by-products*. Journal of American Oil Chemist's Society. 82: 439 – 444.
- Jones, P.J., Raeini-Sarjaz, M., Ntanios, F.Y., Vanstone, C.A., Feng, J.Y., Parsons, W.E. (2000). *Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters*. The Journal of Lipid Research. 41: 697 – 705.
- Jonker, D., Van der Hoeck, 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 – 951.
- Kennedy, A.R. (1995). *The evidence for soybean products as cancer preventive agents*. Journal of Nutrition. 125: 733 – 743.
- Kiechl, S., Willeit, J. (1999). *The natural course of atherosclerosis. Part I: Incidence and progression*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 19: 1484 – 1490.
- Klippel, K.F., Hiltl, D.M., Schipp, B. (1997). *A multicentric, placebo-controlled, doubleblind clinical trial of beta-sitosterol (phytosterol) for*

- the treatment of benign prostatic hyperplasia. German BPH-Phyto Study group. British Journal of Urology International.* 80: 427 – 432.
- Kochhar, S.P. (1983). *Influence of processing on sterols of edible vegetable oils.* Progress in Lipid Research. 22: 161 – 188.
- Kornfeldt, A. (1981). *4-dimethyl, 4-monomethyl and 4,4-dimethylsterols in some vegetable oils.* Lipids. 16, 306 – 310.
- Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., Stefanoudaki, E. (1999). *Effect of extraction system, stage of ripeness and kneading temperature on the sterol composition of virgin olive oils.* Journal of the American Oil Chemical Society. 76: 1477 – 1481.
- Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., Stefanoudaki, E., Cert, A. (2000). *Estudio sobre las variaciones de determinados parámetros químicos y de los componentes menores de los aceites de oliva virgen obtenidos de aceitunas recolectadas en distintas fases de maduración.* Olivae. 80: 22 – 27.
- Lees, A.M., Mok, H.Y., Lees, R.S., McCluskey, M.A., Grundy, S.M. (1977). *Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance.* Atherosclerosis. 28: 325 – 338.
- Leikin, A.I., Brenner, R.R. (1989). *Fatty acid desaturase activities are modulated by phytosterol incorporation in microsomes.* Biochimica et Biophysica Acta. 1005: 187 – 191.
- Lerma-García, M.J., Simó-Alfonso, E.F., Méndez, A., Lliberia, J.L., Herrero-Martínez, J.M. (2011). *Classification of extra virgin olive oils according to their genetic variety using linear discriminant analysis of sterol profiles established by ultra-performance liquid chromatography with*

mass spectrometry detection. Food Research International. 44: 103 – 108.

Lindenmeyer, O. (1863). *Beiträge zur Kenntniss des cholesterins*. Journal für Praktische Chemie. 90: 321 – 331.

Ling, W.H., Jones, P.J. (1995). *Dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects*. Life Sciences. 57: 195 – 206.

Ling, W.H., Jones, P.J. (1995). *Enhanced efficacy of sitostanol-containing versus sitostanol-free phytosterol mixtures in altering lipoprotein cholesterol levels and synthesis in rats*. Atherosclerosis. 118: 319 – 331.

Loscalzo, J. (2003). *Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis*. Biochemical Society Transactions. 31: 1059 – 1061.

Määttä, K., Lampi, A.M., Petterson, J., Fogelfors, B.M., Pironen, V., Kamal El din, A. (1999). *Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 79: 1021 – 1027.

Maki, K.C., Davidson, M.H., Umporowicz, D.M. (2001). *Lipid responses to plantsterol-enriched reduced-fat spreads incorporated into a National Cholesterol Education Program Step I diet*. The American Journal of Clinical Nutrition. 74: 33 – 43.

Mariani, C., Fedeli, E., Grob, K., Artho, A. (1991). *Indagine sulle variazioni dei componenti minori liberi ed esterificati di oli ottenute da olive in funzione della maturazione e dello stoccaggio*. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse. 68: 197 – 187.

Mariani, C., Venturini, S., Bondioli, P., Fedeli, E., Grob, K. (1992). *Evaluation of the variations producing by bleaching process on the*

more meaningful minor components, free and Esterified in olive oil. La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse. 69: 393 – 397.

Mattson, F.H., Grundy, S.M., Crouse, J.R. (1982). *Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man.* The American Journal of Clinical Nutrition. 35: 697 – 700.

Mattson, F.H., Volpenhein, R.A., Erickson, B.A. (1977). *Effect of plant sterol esters on the absorption of dietary cholesterol.* Journal of Nutrition. 107: 1139 – 1146.

Mensink, R.P., Plat, J. (1998). *Efficacy of dietary plant stanols.* Postgraduate Medical Special Report. Noviembre, 27- 31.

Miettinen, T.A., Kesaniemi, Y.A. (1989). *Cholesterol absorption: Regulation of cholesterol synthesis and elimination and within-population variations of serum cholesterol levels.* The American Journal of Clinical Nutrition. 49: 629 – 635.

Moghadasian, M.H. (1999). *Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors.* Life Sciences. 65: 1329-1337.

Moghadasian, M.H., McManus, B.M., Pritchard, P.H., Frohlich, J.J. (1997). *Tall oil"- derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 17: 119 – 126.

Montedoro, G., Bertuccioli, M., Anichini, F. (1978). *Flavor of Foods and Beverages* - Academic Press.

Montedoro, G.F., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Perretti, G, Magnarini, C., Cassignani, L. y Damiani, P. (1995) *Characterization of*

- some Italian virgin olive oils in relation to origin area.* La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse. 72: 403 – 406.
- Mora, M.P., Tourne-Peteilh, C., Charveron, M., Fabre, B., Milon, A., Muller, I. (1999). *Optimisation of plant sterols incorporation in human keratinocyte plasma membrane and modulation of membrane fluidity.* Chemistry and Physics of Lipids. 101: 255 – 265.
- Moreau, R.A, Whitaker, B.D., Hicks, K.B. (2002). *Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses.* Progress in Lipid Research. 41: 457 – 500.
- Moreda, W., Pérez Camino, M. E., Cert, A. (1995). *Determinación de algunos parámetros de pureza en aceites de oliva. Resultados de un estudio colaborativo.* Grasas y Aceites. 46: 279–284.
- Morton, G.M., Lee, S.M., Buss, D.H., Lawrance, P. (1995). *Intakes and major dietary sources of cholesterol and phytosterols in the British diet.* Journal of Human Nutrition and Dietetics. 8: 429 – 440.
- Moss, G.P. (1989). *The nomenclature of steroids: Recommendations by the IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature.* European Journal of Biochemistry. 186: 429 – 458.
- Mousaa, Y.M., Gerasopoulos, D. (1996). *Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of "Mastoides" olives.* Journal of the Science of Food and Agriculture. 71: 345 – 350.
- Nair, P.P., Turjman, N., Kessie, G. (1984). *Diet, nutrition intake, and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. Dietary cholesterol, beta-sitosterol, and stigmasterol.* The American Journal of Clinical Nutrition. 40: 927 – 930.

- Normen, A.L., Brants, H.A., Voorrips, L.E., Andersson, H.A., Van den Brandt, P.A., Goldbohm, R.A. (2001). *Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer*. The American Journal of Clinical Nutrition. 74: 141 – 148.
- Ordovas, J.M. (2000). *Olives and olive oils*. En: Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology 2nd Ed., Frederic J.F. (Ed.). John Wiley & Sons Inc., New York. EE.UU. pg. 1745 – 1779.
- Ostlund, R.E. Jr. (2002). *Phytosterols in human nutrition*. Annual Review of Nutrition. 22: 533 – 549.
- Ostlund, R.E. Jr., Racette, S.B., Okeke, A., Stenson, W.F. (2002). *Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans*. The American Journal of Clinical Nutrition. 75: 1000 – 1004.
- Paganuzzi, V. (1979). *On the composition of Iranian olive oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 56: 925 – 928.
- Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Reyes-Cadena, S., Álvarez-González, I., Sánchez-Chapul, L., Pérez-Gallaga, J., Hernández, N., Flores-Mondragón, G., Velasco, O. (2008). *Cell protection induced by β - Sitosterol: inhibition of genotoxic damage, stimulation of lymphocyte production, and determination of its antioxidante capacity*. Archives of Toxicology. 82: 615 – 622.
- Pasqualone, A., Catalano, M. (2000). *Free and total sterols in olive oils. Effects of neutralization*. Grasas y Aceites. 51: 180 – 182.

- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P., Delmer, D. (2002). *Sitosterol-beta-glucoside as primerfor cellulose synthesis in plants*. Science. 295: 147 – 150.
- Peterson, D.M. (2001). *Oat Antioxidants*. Journal of Cereal Science. 33: 115 – 129.
- Piironen, V., Lindsay, G.D., Miettinen, A.T., Toivo, J., Lampi, A.M. (2000). *Review Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 939 – 966.
- Plat, J., Mensink, R.P. (2002) *Effects of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of healthy men and women*. Faseb Journal. 16: 258 – 260.
- Plat, J., Van Onselen, E.N., Van Heugten, M.M., Mensink, R.P. (2000). *Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters*. European Journal of Clinical Nutrition. 54: 671 – 677.
- Quong, J., Eppenberger –Castori, S., Moore, D., Scott, G.K., Birrer, M.J., Kueng, W., Eppenberger, U., Benz, C.C. (2002). *Age – dependent changes in breast cancer hormone receptors and oxidant stress markers*. Breast Cancer Research and Treatment. 76: 221 – 236.
- Raicht, R.F., Cohen, B.I., Fazzini, E.P., Sarwal, A.N., Takahashi, M. (1980). *Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats*. Cancer Research. 40: 403 – 405.

- Ranalli, A., Angerosa, F. (1996). *Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products*. Journal of the American Oil Chemical Society. 73: 417 – 422.
- Ratnayake, W.M., L'Abbe, M.R., Mueller, R. (2000). *Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Journal of Nutrition. 130: 1166 – 1178.
- Read, S.M., Bacic, T. (2002). *Plant biology. Prime time for cellulose*. Science. 295: 59 – 60.
- Reina, R.J., White, K.D., Jahngen, E.G.E. (1997). *Validated Method for Quantitation and Identification of 4,4- Desmethylsterols and Triterpene Diols in Plant Oils by Thin-Layer-Chromatography-High Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Journal of AOAC International. 80: 1272 – 1280.
- Ritthausen, H. (1863). *Chemische Notizen. IV. Cholesterin im fett des weizen*. Journal für Praktische Chemie. 88: 145 – 146.
- Rogers, E.J., Rice, S.M., Nicolosi, R.J., Carpenter, D.R., McClelland, C.A., Romanczyk, L.J. (1993). *Identification and quantitation of gamma-oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 70: 301 – 307.
- Ruiz del Castillo, M.L., Caja, M.M., Herraiz, M., Blanch, G.P. (1998). *Rapid Recognition of Olive Oil Adulterated with Hazelnut Oil by Direct Analysis of the Enantiomeric Composition of Filbertone*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46: 5128 – 5131.
- Sakouhi, F., Absalon, C., Harrabi, S., Vitry, C., Sebei, K., Boukhchina, S., Fouquet, E., Kallel, H. (2009). *Dynamic accumulation of 4-*

- desmethylsterols and phytosterols during ripening of Tunisian Meski olives (Olea europea L.)*. Food Chemistry 112: 897 – 902.
- Salivaras, M., Mc Curdy, A.R. (1993). *Adulteracion of olive oils detection through reversed phase high performance liquid chromatography*. Food Flavors Ingredients and Composition, edited by G. Charalambous, Elsevier Science Publisher Amsterdam, 279.
- Salvador, M.D., Aranda, F., Gomez-Alonso, S., Fregapane, G. (2003). *Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: A study of five crop seasons*. Food Chemistry. 80: 359–366.
- Sánchez Casas, J., Osorio Bueno, E., Montañó García, A. M., Martínez Cano, M. (2004). *Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain)*. Food Chemistry. 87: 225 – 230.
- Schaller, H. (2004). *New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants*. Plant Physiology and Biochemistry. 42: 465 – 476.
- Servili, M., Baldioli, M., Montedoro G. (1994). *Phenolic composition of virgin olive oil in relationship to some chemical and physical aspects of malaxation*. Acta Horticulturae. Olive Growing II. 356: 331-336.
- Sims, R.J., Fioriti, J.A., Kamuk, M.J.J. (1972). *Sterol additives as Polymerization Inhibitors for Frying Oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 49: 298 – 301.
- Siti, N., Triki, S y Hartmann, M.A. (2007). *Sterols and Non-steroidal Triterpenoids of the Developing Olive Fruit*. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. 23: 211 – 218.

- Soledad, M. (2001). *Composición química de distintas calidades de aceites de oliva virgen de la variedad "Empetre" en el bajo Aragón*. *Grasas y Aceites*. 52: 52 – 58.
- Solinas, M., Di Giovacchino, L., Mascolo, A. (1978). *Il polifenoli delle olive e dell'olio Nota III. Influenza de la temperatura e della durata de la gramolatura sul contenuto in polifenoli degli oli*. *La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse*. 55, 19 – 23.
- Stefanouadaki, E., Chartzoulakis, K., Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F. (2001). *Effect of drought stress on qualitative characteristics of olive oil of cv Koroneiki*. *Grasas y Aceites* 52, 202 – 206.
- Termime, S.B., Manai, H., Methenni, K., Baccouri, B., Abaza, L., Daoud, D., Sanchez, J., Osorio, E., Zarrouk, M. (2008). *Sterolic composition of Chétoui virgin olive oil: Influence of geographical origin*. *Food Chemistry*. 110, 368 – 374.
- Trichopoulou, A. (2010). *Olive oil, Mediterranean diet and health*. *Clínica e investigación en arteriosclerosis*. 22: 19 – 20.
- Uceda M., Hermoso, M., Frías, L. (1989). *Factores que influyen en la calidad del aceite de oliva*. 1º Simposio Científico-Técnico- Expoliva. Jaén.
- Uceda, M., Jiménez, A., Beltrán, G. (2006). *Olive oil extraction and quality*. *Grasas y Aceite*. 57: 25 – 31.
- Vance, D.E., Van den Bosch, H. (2000). *Cholesterol in the year 2000*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1529: 1 – 8.
- Van Rensburg, S.J., Daniels, W.M., Van Zyl, J.M., Taljaard, J.J. (2000). *A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, betasitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone sulphate and*

- melatonin on in vitro lipid peroxidation*. *Metabolic Brain Disease*. 15: 257 – 265.
- Vanhanen, H.T., Blomqvist, S., Ehnholm, C. (1993). *Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols in hypercholesterolemic subjects with different apoE phenotypes during dietary sitostanol ester treatment*. *The Journal of Lipid Research*. 34: 1535 – 1544.
- Varela, G. (1994). *La fritura de los alimentos en aceite de oliva*. Consejo Oleícola Internacional. Madrid.
- Vázquez Roncero, A., Janer del Valle, M.C., Janer del Valle, M-L. (1975). *Polifenoles naturales y estabilidad del aceite de oliva*. *Grasas y Aceites*. 26: 14 – 18.
- Venkatramesh, M., Karunanandaa B., Sun, B., Gunter, C. A., Boddupalli, S., Kishore, G.M (2003). *Expression of a Streptomyces 3-hydroxysteroid oxidase gene in oilseeds for converting phytosterols to phytosteranols*. *Phytochemistry*. 62: 39 – 64.7
- Verpoorte, R. (2000). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Edited by Verpoorte, R. & Alfermann, A.W. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. pg. 1 – 29.
- Visioli, F., Galli, C. (1994). *Oleuropein protects low-density proteins from oxidation*. *Life Sciences*. 55: 1565 – 1670.
- Wang, T., Hicks, K.B., Moreau, R. (2002). *Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79: 1201 – 1206.
- Weihrauch, J.L., Gardner, J.M. (1978). *Sterol content of foods of plant origin*. *Journal of the American Dietetic Association*. 73: 39 – 47.

White PJ, Armstrong LS. 1986. *Effect of selected oat sterols on the detection of heated soybean oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 63: 525 – 529.

Winkler, J.K., Warner, K. (2008). *The effect of phytosterol concentration on oxidative stability and thermal polymerization of heated oils*. European Journal of Lipid Science and Tecnology. 110: 455 – 464.

Xyloyiannis, C., Dicho, B., Nuzzo, V., Celano, G. (1999). *Defence strategies of olive against water stress*. Acta Horticulturae. 474: 423 – 426.