



Revalorización de subproductos de la industria oleícola y aplicación de la espectroscopia Raman en la identificación de aceites



Córdoba, Enero 2016

**María de los Ángeles
Carmona Castellano**

TITULO: REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA
OLEÍCOLA Y APLICACION DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN EN
LA IDENTIFICACION DE ACEITES

AUTOR: *María de los Ángeles Carmona Castellano*

© Edita: UCOPress. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



Tesis doctoral

**REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA
INDUSTRIA OLEÍCOLA Y APLICACIÓN DE LA
ESPECTROSCOPIA RAMAN EN LA IDENTIFICACIÓN DE
ACEITES**

María de los Ángeles Carmona Castellano

Directores:

Prof. Dr. José Rafael Ruiz Arrebola

Prof. Dr. César Jiménez Sanchidrián

Universidad de Córdoba

Facultad de Ciencias



TÍTULO DE LA TESIS: REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA OLEÍCOLA Y APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN EN LA IDENTIFICACIÓN DE ACEITES

DOCTORANDA: María de los Ángeles Carmona Castellano

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Doña María de los Ángeles Carmona Castellano ha llevado a cabo durante los últimos años un excelente trabajo que ha culminado con la elaboración de esta Memoria de Tesis Doctoral. En este tiempo la doctoranda ha adquirido una gran experiencia en diferentes técnicas de separación y purificación de productos de alto valor añadido contenido en matrices complejas como son los destilados de desodorización. Asimismo podemos afirmar que se ha convertido en una experta en el manejo de la técnica Raman y en su aplicación a determinaciones en aceites vegetales. Toda esta experiencia ha dado como resultado la publicación de los tres artículos que conforman el grueso de esta Tesis Doctoral y que se enumeran a continuación:

· *“Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate”* María A. Carmona, Carlos Jiménez, César Jiménez-Sanchidrián, Fernando Peña, J. Rafael Ruiz. *Journal of Food Engineering* 101(2010) 210-213.

En este artículo se describe un nuevo método de separación de los esteroides contenidos en un destilado de desodorización de aceite de girasol. El concentrado de esteroides final obtenido posee una pureza superior al 99%.

· *“Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures”* María A. Carmona, Fernando Lafont, César Jiménez-Sanchidrián, José R. Ruiz. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116 (2014) 1451-1456.

En este trabajo se describe por primera vez en la bibliografía la caracterización de los aceites de macadamia y de nuez pecanera por espectroscopia Raman. Además, se pone de manifiesto el potencial de esta técnica para diferenciar estos aceites, de alto valor añadido, de otros más baratos como son los de maíz o girasol. Por otro lado, con la espectroscopia Raman también se pueden detectar mezclas de aceite de macadamia con estos aceites de maíz y girasol.

· *“Characterization of macadamia and pecan oils and detection of mixtures from other edible seed oils by Raman spectroscopy”*. M. A. Carmona, F Lafont, C. Jiménez-Sanchidrián, J.R. Ruiz. *Grasas y aceites* 66 (3) (2015) 94-102.

En este trabajo se muestran las posibilidades y eficacia de la técnica espectroscópica Raman para distinguir entre diferentes aceites vegetales comestibles. Además, es posible correlacionar algunos parámetros determinados por espectroscopia Raman con los determinados por otros métodos físico-químicos. Finalmente, la evolución de la oxidación de aceites de oliva de distinta categoría comercial, puede ser monitorizada por espectroscopia Raman.

Aparte de estas publicaciones, también han sido resultado de este trabajo otro artículo científico y varias comunicaciones a congresos como fruto de su etapa de formación y que no forman parte de esta Memoria de Tesis Doctoral.

Parte de este trabajo experimental ha sido posible gracias a la firma de varios contratos de investigación con la empresa SOS- Cuétara, lo que ha permitido a Doña María de los Ángeles Carmona Castellano adquirir una formación adicional en el ámbito industrial, al realizar diferentes trabajos en las instalaciones de dicha empresa.

La iniciativa mostrada por la doctoranda a la hora de plantear el trabajo a desarrollar, así como la dedicación prestada y la excelente formación tanto a nivel académico como

científico alcanzados hacen que la valoración que hagamos de esta Tesis Doctoral sea muy positiva.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, a de de 2015.

Firma de los directores

J. Rafael Ruiz Arrebola

César Jiménez-Sanchidrián

D. Antonio Ángel Romero Reyes, Director del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA OLEÍCOLA Y APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN A LA IDENTIFICACIÓN DE ACEITES**” que constituye la Memoria presentada por D^a María de los Ángeles Carmona Castellano para optar al Título de Doctora en Química, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los profesores José Rafael Ruiz Arrebola y César Jiménez-Sanchidrián.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Córdoba a de de 2015.

Fdo: Antonio Ángel Romero Reyes

**INFORME DEL DIRECTOR DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN FQM 346:
“Catálisis Orgánica y Materiales Nanoestructurados”.**

Las investigaciones realizadas en la presente Memoria de Tesis Doctoral forman parte de un Plan de Investigación desarrollado por el **Grupo de Investigación: FQM 346: “Catálisis Orgánica y Materiales Nanoestructurados”**.

Este Plan de Investigación ha sido subvencionado con cargo a los Contratos de Investigación “Enriquecimiento de esteroides del destilado de desodorización de aceite de girasol”, “Revalorización de subproductos”, con la Empresas SOS CUÉTARA S.A. y “Revalorización de subproductos II” con la Empresa SOS CORPORACIÓN ALIMENTARIA S.A. Asimismo, estas investigaciones han recibido subvenciones de Fondos FEDER.

Aunque los objetivos de este trabajo y su metodología no se ajustan a las operaciones convencionales de un trabajo en Catálisis Heterogénea, a los que el Grupo FQM 346 está acostumbrado, la experiencia que poseen los directores en el área de la Química orgánica y la Catálisis les ha permitido dirigir este trabajo con eficacia.

De la misma manera, la incorporación de D. María de los Ángeles Carmona Castellano en el Grupo de Investigación FQM 346 le ha proporcionado una serie de conocimientos complementarios que han contribuido a aumentar su formación como científica.

En Córdoba, a de de 2015.

Fdo: César Jiménez-Sanchidrián

Director del Grupo de Investigación FQM 346

INDICE

<i>PREÁMBULO</i>	<i>1</i>
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	<i>5</i>
<i>RESUMEN/SUMMARY</i>	<i>17</i>
<i>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</i>	
- <i>Revalorización de subproductos de la industria oleícola</i>	<i>41</i>
- <i>Aplicación de la espectroscopia Raman a la identificación de aceites</i>	<i>59</i>
<i>CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)</i>	<i>91</i>
<i>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 2)</i>	<i>109</i>
<i>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)</i>	<i>131</i>
<i>INDICIOS DE CALIDAD</i>	<i>161</i>
<i>OTRAS APORTACIONES CIENTÍFICAS</i>	<i>169</i>
<i>ANEXO: PUBLICACIONES</i>	<i>171</i>

PREÁMBULO

PREÁMBULO

Mediante la presentación y defensa de esta Memoria de Tesis Doctoral, D^a. María de los Ángeles Carmona Castellano, desea obtener el Título de Doctora en Química. Dicha Memoria de Tesis Doctoral se presenta como compendio de publicaciones, habida cuenta de que se reúnen los requisitos exigidos para ello, según se recogen en el artículo 24 de la Normativa Reguladora de los Estudios de Doctorado de la Universidad de Córdoba:

1.- La Tesis Doctoral está constituida por el conjunto de trabajos publicados por la doctoranda sobre el plan de investigación de la Tesis Doctoral.

2.- El conjunto de trabajos está constituido por un mínimo de tres artículos publicados en revistas incluidas en los tres primeros cuartiles de la relación de revistas del ámbito de la especialidad y referenciadas en la última relación publicada por el *Journal Citation Reports*. En este caso, la Memoria de Tesis Doctoral está soportada en tres artículos incluidos en el primer, segundo y tercer cuartiles de la categoría a la que pertenece cada una de las revistas en la que dichos artículos han sido publicados.

3.- En los artículos anteriormente citados, la doctoranda es la primera autora.

4.- La Memoria de Tesis Doctoral incluye la siguiente estructura y documentación:

- Introducción, en la cual se justifica la unidad temática de la Tesis.
- Hipótesis y objetivos a alcanzar, indicando en qué publicación o publicaciones se abordan.

PREÁMBULO

- Primera página de cada uno de los artículos incluidos, en la que figura el nombre y adscripción de los autores, así como la referencia completa de la revista en la que el trabajo ha sido publicado.
- Conclusiones, indicando de qué publicación se desprenden.
- Resúmenes en español y en inglés.
- Otras aportaciones científicas derivadas directamente de la Tesis Doctoral.
- Informe con el factor de impacto y cuartil del *Journal Citation Reports* de los artículos que constituyen la Memoria de Tesis Doctoral.
- Informe de los directores de Tesis.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los objetivos generales de esta Tesis Doctoral son, por un lado, la obtención de esteroides a partir del destilado de desodorización de aceite de girasol y, por otro, la aplicación de la espectroscopia Raman al análisis de aceites. Los objetivos e hipótesis específicos son los que se enumeran a continuación:

Hipótesis 1.

La desodorización de los aceites vegetales tiene como finalidad eliminar las sustancias que imparten sabores y olores indeseables a los mismos. Esta operación es una de las etapas finales en el proceso de refinación de aceites vegetales utilizado actualmente, y se lleva a cabo por destilación, mediante arrastre de vapor, de las sustancias más volátiles presentes en el aceite extraído. Junto con las sustancias que producen aromas indeseables en el aceite (productos de oxidación como aldehídos, cetonas, etc.) se destilan, en parte, algunos componentes minoritarios del aceite, tales como ácidos grasos libres, tocoferoles, esteroides, escualeno, mono y diglicéridos, algo de triglicéridos, hidrocarburos pesados y otros componentes menores. Esta corriente de subproducto recibe el nombre de Destilado de Desodorización (DOD, en su nomenclatura anglosajona). Las condiciones de desodorización (temperatura, presión, tiempo de residencia, etc.), influyen en la composición del DOD (Pramparo, 2005).

Este subproducto normalmente se mezcla con otras corrientes efluentes del proceso de refinación y de esta manera se vende con un bajo valor añadido, a industrias relacionadas. Sin embargo, las características de algunos de los componentes presentes sugieren la conveniencia de un tratamiento de purificación que permita separar los componentes de mayor valor añadido. En algunas industrias de refinación de aceites, este destilado se vende a empresas que recuperan algunos de sus componentes. El precio de este destilado está basado generalmente en su contenido de tocoferoles y esteroides.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A la vista de la bibliografía, existen descritos procesos en los que, conjugando etapas de saponificación, esterificación, transesterificación, destilación a vacío y enfriamiento, se consiguen concentrados de esteroides de elevada pureza y con un alto rendimiento (Fernandes & Cabral, 2007). Los principales problemas que se presentan para la extracción de fitoesteroides son dos: la degradación térmica que tiene lugar si el destilado se expone a elevadas temperaturas durante largos períodos de tiempo, y los elevados puntos de ebullición de los fitoesteroides.

La composición porcentual de estos destilados de desodorización varía sensiblemente en función de la calidad de la semilla de partida, de los procesos mecánicos extractivos del aceite, de las constantes físicas de la propia planta de refino, etc.

Destilados de desodorización procedentes de la refinación de aceite de soja, muy empleados en los métodos descritos en la bibliografía como material de partida, contienen un porcentaje de esteroides en torno al 10-12% mientras que los procedentes de la refinación de aceite de girasol contienen en torno a un 2,5-5%. Por ello, es importante resaltar la dificultad de conseguir un concentrado en esteroides a partir de destilados de desodorización procedentes de aceite de girasol en comparación con la obtención de los mismos partiendo de materias primas similares.

Objetivo 1.

Como primer objetivo nos planteamos la recuperación de esteroides a partir de DOD de aceite de girasol. La investigación desarrollada con tal fin y el proceso final a través del cual se consigue dicho objetivo, recuperándose los esteroides con una pureza superior al 99%, se recogen en el artículo “ *Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate*”.

Hipótesis 2.

Las grasas y los aceites suponen uno de los componentes esenciales en la dieta de los humanos y desde hace miles de años son muy consumidos, bien de manera directa o bien formando parte de alimentos elaborados. Esta importancia estriba en el elevado poder energético que poseen y su contenido en ácidos grasos esenciales, necesarios para el correcto desarrollo de los tejidos humanos. También se ha demostrado que algunos de los aceites vegetales poseen sustancias con unas propiedades excelentes para la protección de la piel de los seres humanos, por lo que también se emplean desde la antigüedad en tratamientos médicos y estéticos en todo el mundo.

En los últimos años, la espectroscopia Raman ha experimentado un espectacular crecimiento en sus aplicaciones en el campo de los aceites vegetales, sobre todo en la detección cuantitativa de aceites de oliva virgen extra adulterados con otros aceites comestibles más baratos (Zhang et al, 2011), en la autenticación de los mismos (R.Konfi et al, 2011) e incluso en la determinación de algunas especies químicas presentes no solo ya en el aceite de oliva, sino en otros aceites vegetales, como son antioxidantes (Paiva-Martins et al, 2011) o ácidos grasos libres (El-Abassy et al, 2009).

Los espectros Raman de los aceites vegetales únicamente presentan bandas de absorción de interés para la discriminación entre ellos en las regiones espectrales de 800-1800 cm^{-1} y de 2800-3050 cm^{-1} . La asignación de las bandas que aparecen en un espectro Raman de un aceite vegetal ha tardado bastantes años en ser completamente dilucidada. En aceites de oliva virgen extra, unos de los más estudiados por esta técnica, las señales del espectro están inequívocamente asignadas. Empleando como base estos resultados y su perfil de ácidos grasos, la asignación de las bandas de absorción de aceites de origen vegetal que todavía no han sido descritos en la literatura, como el de las nueces de macadamia, pecanera y de Brasil, puede ser realizada.

Objetivo 2.

Como segundo objetivo nos planteamos emplear la espectroscopia Raman para la diferenciación de aceites de origen vegetal. Se caracterizaron así por Raman distintos aceites: aceites de oliva virgen extra, aceite de oliva refinado, aceite de orujo de oliva, aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de nuez de nogal, aceite de nuez pecanera, aceite de nuez de macadamia y aceite de nuez de Brasil.

Este objetivo queda recogido en los artículos *“Characterization of macadamia and pecan oils and detection of mixtures from other edible seed oils by Raman spectroscopy”* y *“Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures”*.

Hipótesis 3.

Muchos aceites vegetales se venden como especiales debido a su aroma, gusto o características que los diferencian de otros. Los consumidores son cada vez más conscientes del potencial para la salud y los beneficios terapéuticos de los aceites de alta calidad, como son el aceite de oliva virgen extra y el aceite de nuez de macadamia, y eligen estos aceites.

En el caso del aceite de oliva virgen extra, al extraerse mediante procedimientos mecánicos, lo convierten en un zumo natural que conserva su composición única y su delicado aroma, por lo que se puede consumir sin más tratamientos. En el caso del aceite de nuez de macadamia se trata del más estable de los aceites de nueces, presentando altos niveles de ácido oleico y los más bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (4%) (Madawaal et al., 2012)

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Debido a la creciente demanda y su alto coste de producción el precio de los aceites especiales es más alto que el de otros aceites vegetales, lo que hace muy tentador la posibilidad de mezclarlos con otros aceites de menor calidad y, por tanto, más baratos. (Boskous, 2006)

Estos aceites más baratos, como por ejemplo el de girasol o maíz, tienen como característica común y que los diferencia de los de alto valor añadido, una elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico). Esto hace que el número de dobles enlaces y por lo tanto, el grado de insaturación, sea más alto en estos aceites.

Los espectros Raman de los aceites vegetales presentan bandas asociadas a las vibraciones de tensión de C-H en los átomos de carbono de dobles enlaces y a las vibraciones de tensión de los dobles enlaces C=C. Por lo tanto, la intensidad de estas bandas debe estar relacionada con el grado de insaturación de los aceites estudiados. Al ser el grado de insaturación menor en los aceites de alto valor añadido, se debería observar un aumento en la intensidad de las bandas asociadas a los dobles enlaces a medida que se aumente la concentración de aceites de menor calidad. Esta situación se daría en el caso de la adulteración de aceites ricos en ácido oleico, como son el aceite de oliva virgen extra y el aceite de nuez de macadamia, con aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados, como son el aceite de girasol y el aceite de maíz.

Objetivo 3.

El tercer objetivo que se propuso en la presente Tesis Doctoral fue la detección de mezclas de aceites vegetales usando la espectroscopia Raman. Este objetivo queda recogido en el artículo *“Characterization of macadamian and pecan oils and detection of mixtures from other edible seed oils by Raman spectroscopy”*.

Hipótesis 4.

El deterioro de un alimento por la oxidación de su contenido lipídico es un problema importante en la industria alimentaria. La oxidación de lípidos insaturados, además de producir aromas y sabores desagradables, se traduce en una disminución de las propiedades nutricionales del alimento que contenga dichos lípidos. En muchos aceites vegetales comestibles, el contenido en lípidos insaturados, en forma de ácidos grasos insaturados en su inmensa mayoría, es muy elevado, por lo que son muy susceptibles a sufrir procesos de oxidación. Estos procesos se ven muy favorecidos con el incremento de la temperatura y la presencia de aire, de manera que en muchas prácticas culinarias, como fritura u horneado, que emplean altas temperaturas, son inevitables estas oxidaciones de los ácidos grasos.

El principal mecanismo por el que se lleva a cabo esta oxidación de los dobles enlaces de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos insaturados es de tipo radicalario. La oxidación se produce en el carbono α al doble enlace, conduciendo a hidroperóxidos alílicos, por lo que las cadenas hidrocarbonadas siguen manteniendo sus insaturaciones, aunque pueden producirse cambios en sus posiciones y en sus configuraciones. En el siguiente paso de la reacción de oxidación los hidroperóxidos se transforman en productos más oxidados, tales como aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos o epóxidos (Frankel, 1980).

El método oficial indicado para determinar el número de peróxidos en un aceite de oliva virgen extra está basado en la medida del denominado índice de yodo, que se obtiene por una valoración del aceite con una disolución estandarizada de tiosulfato sódico.

En los últimos años se están desarrollando nuevos métodos basados en técnicas espectroscópicas capaces de medir no solo el grado de oxidación de un aceite, sino también otros muchos parámetros. Entre estas técnicas, las espectroscopias vibracionales de

infrarrojo y/o Raman están jugando un papel determinante. Por ejemplo, la espectroscopia de infrarrojo, cercano o medio, se ha empleado para determinar la adulteración de aceites de oliva con aceite de palma (Rohman & Che Man, 2010) o para discriminar entre aceites de oliva monovarietales (Sinielli et al., 2010). La espectroscopia Raman se ha empleado en la detección cuantitativa de aceites de oliva adulterados con otros aceites comestibles más baratos (Baeten et al., 2009; El-Abbasy et al., 2009; Zhang et al., 2011; Zou et al., 2009) o en la autenticación de los mismos (Baeten & Meurens, 1996; Zou et al. 2009). La resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-NMR}$) ha sido empleada para evaluar el grado de oxidación de diferentes aceites comestibles después de un tratamiento térmico a 70 y 190 °C (Guillén & Ruiz, 2005; Guillén & Ruiz., 2008). En estos trabajos se muestra que el grado de oxidación de un aceite depende tanto de la naturaleza del aceite como de la temperatura a la que ha sido tratado. La espectroscopia Raman también ha sido empleada en estudios similares de diferentes aceites comestibles (Guzmán et al., 2011; Muik et al., 2005, Muik et al. 2007). El único aceite de oliva que se estudia en estos trabajos es el de oliva virgen extra que, sin embargo, es el menos empleado en fritura debido a su mayor precio. Por esta razón, nos planteamos llevar a cabo un estudio por espectroscopia Raman de la estabilidad frente a la oxidación térmica de los diferentes tipos de aceites de oliva comerciales en la Unión Europea, y que son los más recomendables para su uso en frituras porque son más estables e impregnan menos el alimento que los de semillas.

Objetivo 4.

Como cuarto objetivo se planteó la aplicación de la espectroscopia Raman al estudio de la estabilidad frente a la oxidación de diferentes aceites de oliva, que son comúnmente usados para fritura, como son: aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva refinado y aceite de orujo de oliva. La relación entre el índice de insaturación y la intensidad de la banda en torno a 3011 cm^{-1} y el estudio de la estabilidad frente a la oxidación a distintos tiempos de

fritura, quedan recogidos en el artículo *“Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures”*.

BIBLIOGRAFÍA

- Baeten V, Meurens M, Morales MT, Aparicio R. “Detection of Virgin Olive Oil Adulteration by Fourier Transform Raman Spectroscopy” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, (1996) 2225-2230.
- Baeten, V., Fernández- Pierna, J.A., Doudenne, P., Meurens, M., García-González, D.L., Aparicio-Ruiz, R. “Detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by FT-NIR spectroscopy” 53 (2005) 6201-6206.
- Boskous, Dimitrios “Oilseed monograph. Olive oil: Chemistry and Technology” (2006) American Oil Chemists’ Society Press.
- El-Abassy, R.M., Donfack, P., Materny, A. “Rapid determination of free fatty acid in extra virgin olive oil by Raman spectroscopy and multivariate analysis” *Journal of American Oil Chemists’ Society* 86 (2009) 507-511.
- El-Abassy, R.M., Donfack, P., Materny, A. “Visible Raman spectroscopy for the discrimination of olive oils from different vegetable oils and the detection of adulteration” 40 (2009) 1284-1289.
- Fernandes, P., Cabral, J.M.S. “Phytosterols: applications and recovery methods”. *Biorresource Technology* 98 (2007) 2335-2350.
- Frankel, E.N. “Lipid oxidation” *Progress in Lipid Research* 19 (1980) 1-22.
- Guillén, M. D., Ruiz, A.. “Monitoring the oxidation of unsaturated oils and formation of oxygenated aldehydes by proton NMR” *European Journal of Lipid Science and Technology* 107 (2005) 36-47.
- Guillén, M. D., Ruiz, A.. “Monitorin of heated-induce degradatino of edible oils by proton NMR” *European Journal of Lipid Science and Technology* 110 (2008) 52-60.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- Guzmán, E., Baeten, V., Pierna, J.A.F., García-Mesa, J.A. “A portable Raman sensor for the rapid discrimination of olives according to fruit quality” *Talanta* 93 (2012) 94-98.
- Korifi, R., Le Dreau, Y., Molinet, J., Artaud, J., Dupuy, N. “Composition and authentication of virgin olive oil from French PDO regions by chemometric treatment of Raman spectra” *Journal of Raman Spectroscopy* 42 (2011) 1540-1547.
- Madawala, S.R.P., Kochnar, S.P., Dutta, P.C. “Lipid components and oxidative status of selected specialty oils” *Aceites y grasas* 63(2) (2012) 143-151.
- Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., Ayora-Cañada, M. J. “Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy”. *Chemistry and Physics of Lipids* 134 (2005) 173-182.
- Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., Valcárcel, M., Ayora-Cañada, M.J. “Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy” *Analytica Chimica Acta* 593 (2007) 54-57.
- Paiva-Martins, F., Rodrigues, V., Calheiros, R., Marques, M. “Characterization of antioxidant olive oil biophenols by spectroscopic methods” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 91 (2011) 309-314.
- Pramparo, M., Prizzon, S., Martinello, M.A. “Study of purification of fatty acids, tocopherols and sterols from deodorization distillate” *Grasas y aceites* 56 (2005) 228-234.
- Rohman, A., Che Man, Y.B., Ismail, A., Hashim, P. “Application of FTIR spectroscopy for the determination of virgin coconut oil in binary mixtures with olive oil and palm oil”. *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 87 (6) (2010) 601-606.
- Sinelli, N., Casale, M., Di Egidio, V., Oliveri, P., Bassi, D., Casiraghi, E. “Varietal discrimination of extra virgin olive oils by near and mid infrared spectroscopy” *Food Research International* 43 (8) (2010) 2126-2131.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- Zhang, X.F., Zou, M.Q., Qi, X.H., Liu, F., Zhang, C., Yin, F. “Quantitative detection of adulterated olive oil by Raman spectroscopy and chemometrics” *Journal of Raman Spectroscopy* 42 (2011) 1784-1788.
- Zou, M.Q., Zhang, X.F., Qi, X.H., Ma, H.L., Dong, Y., Liu, C.W., Guo, X., Wang, H. “Rapid authenticatin of olive oil adulteration by Raman spectrometry” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (2009) 6001-6006.
-
-

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL “REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA OLEÍCOLA Y APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN EN LA IDENTIFICACIÓN DE ACEITES”**1. INTRODUCCIÓN O MOTIVACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL****1.1 Revalorización de subproductos de la industria oleícola: fitosteroles.**

La familia química de los fitosteroles incluye una amplia variedad de moléculas que son estructuralmente similares al colesterol; algunos de los ejemplos más representativos son el β -sitosterol, el campesterol o el estigmasterol. En la naturaleza pueden existir como esteroides libres, esterificados con ácidos grasos o como glicósidos (figura 1). De forma natural los fitosteroles se encuentran en diversos productos de origen vegetal, fundamentalmente aceites, aunque también los podemos encontrar en legumbres y en frutos secos (Piivonen et al, 2000). La importancia de los fitosteroles en la industria alimentaria ha crecido de manera espectacular en los últimos años. Es conocido el hecho de que cuando estos compuestos son incluidos en nuestra dieta en cantidades suficientes (2-3 g/día), reducen significativamente la concentración de colesterol en el suero, al reducir su adsorción desde el tracto digestivo. La reducción media en colesterol total es de un 10% y de un 15% en colesterol LDL (Katon et al, 2003; Miettinen et al, 1995), sin producir ninguna alteración en el colesterol HDL del suero o en la concentración de triglicéridos. Hoy día, en nuestros mercados podemos encontrar una amplia variedad de alimentos enriquecidos con fitosteroles (margarinas, yogures, leches, etc.) que han sido añadidos durante el procesado del alimento.

Industrialmente, una fuente importante de fitosteroles son los destilados de desodorización (DODs) de los aceites comestibles. El tratamiento de desodorización es el último paso en el proceso de refinado de los aceites comestibles y consiste en la

eliminación de algunos componentes que se encuentran en las grasas y aceites naturales y que no son deseables en el producto final. La desodorización consiste en un tratamiento a 200 °C a vacío durante varias horas. El subproducto obtenido de dicho tratamiento se conoce como DOD. Este DOD es una mezcla compleja de diferentes familias de compuestos tales como esteroides, ésteres de esteroles, hidrocarburos, mono-, di- y triglicéridos y compuestos carbonílicos (Winters, 1990). Dentro de estos DODs, el obtenido a partir del aceite de girasol es muy importante por la elevada cantidad de productos interesantes que posee.

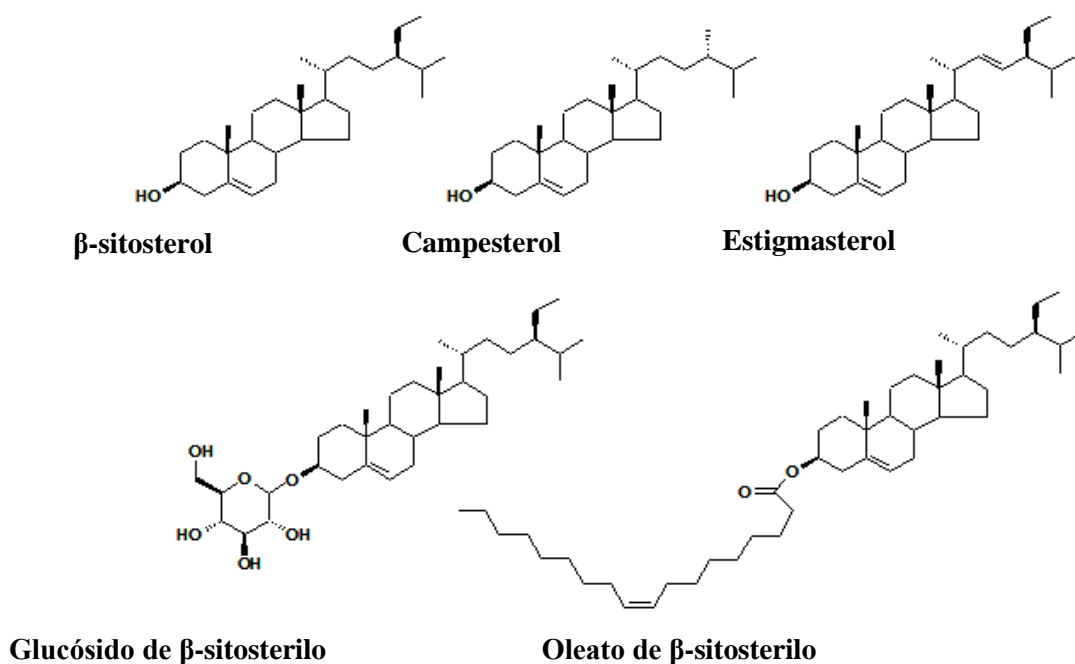


Figura 1. Estructuras químicas de algunos fitosteroles en forma libre, en forma de glucósidos y esterificados con ácidos grasos.

En la actualidad, existen diferentes métodos de extracción y aislamiento de los esteroides a partir de DODs de diferentes aceites. Se han descrito métodos que emplean tratamientos enzimáticos para hidrolizar los ésteres de esteroide y los ácidos grasos seguidos por una destilación (Ghosh & Bhattacharyya, 1996; Watanabe et al, 2004), métodos basados en extracción con CO₂ supercrítico (Glüciü-Üstündag & Temelli, 2007; Fang et al, 2006; Vázquez et al, 2006) u otros basados en las técnicas clásicas de hidrólisis, destilación y cristalización (Rohr & Trujillo-Quijano, 2005). En una excelente revisión realizada por Fernandes y Cabral se recogen estos métodos y otros de menor importancia (Fernandes & Cabral, 2007).

1.2 Aplicación de la espectroscopia Raman en la identificación de aceites.

La industria alimentaria ha mostrado un creciente interés por el desarrollo y la adaptación de técnicas espectroscópicas no destructivas para la monitorización automática del procesado de alimentos en tiempo real o en línea. Las ventajas de usar técnicas espectroscópicas son mejoras significativas en los productos alimentarios y el desarrollo de procesos para mantener y mejorar la calidad de los alimentos, la seguridad y la autenticación. En general, las técnicas espectroscópicas consiguen un tiempo de muestreo bajo con una sensibilidad alta para tamaños de muestras muy pequeños. Así, se da un aumento en la eficiencia del proceso y se reducen los residuos. Los equipos espectroscópicos deben ser robustos de forma que puedan estar integrados en la infraestructura existente y sean capaces de funcionar en variados entornos de procesado. Muchas técnicas espectroscópicas están siendo desarrolladas en todo el mundo basándose en diferentes principios. La interacción de la radiación electromagnética con los electrones y los núcleos de las moléculas da lugar a una serie de técnicas espectroscópicas que se basan en procesos de absorción, transmisión, emisión y dispersión (Ghosh & Jayas, 2009).

La primera aplicación de la espectroscopia Raman al estudio de aceites encontrada en la bibliografía es la investigación de Ch.V. Jogarao en la que realiza los espectros Raman de tres aceites vegetales, publicado en 1936 (Jogarao, 1936). En este estudio se lleva a cabo la asignación de varias bandas de los espectros Raman obtenidos para estos aceites y se utilizó para dilucidar la fórmula del principal constituyente de la mantequilla Ghee, una mantequilla india. La aparición de la banda en la región de 1650 cm^{-1} fue determinante para la elección del ácido linoleico como el tercer ácido graso esterificado en el triglicérido mayoritario. Los primeros estudios Raman requerían de un tiempo de exposición de la muestra de 48 horas y de dos espectros para cada muestra (uno con filtro de una disolución de sulfato de quinina para disminuir la fluorescencia y otro sin filtro) y la instrumentación era, además de cara, casi casera. Pese a los buenos resultados obtenidos, la aplicación de la espectroscopia Raman al estudio de aceites no es referenciada nuevamente hasta la década de los 70 (Bailey & Horvat, 1972) en un trabajo en el que se aplica esta técnica al estudio de la composición de isómeros *cis/trans* en aceites, siguiendo la banda cercanas a 1656 cm^{-1} y 1670 cm^{-1} . Encontrándose ya los métodos cromatográficos establecidos como oficiales (pese a tediosos y caros, también), no todas las técnicas espectroscópicas han tenido la misma aplicación a lo largo del tiempo debido a la falta de avances en la instrumentación que hicieran esta aplicación más rápida, precisa y robusta.

La espectroscopia Raman es una herramienta muy prometedora en estos procesos analíticos ya que se pueden examinar muchas muestras en un corto periodo de tiempo siendo además una técnica no destructiva y que no necesita preparación de muestra. Además, el espectro Raman muestra bandas bien resueltas de las transiciones vibracionales lo que nos da mucha información sobre el contenido de las estructuras moleculares. En combinación con métodos quimiométricos, la espectroscopia Raman es una herramienta poderosa capaz de extraer información química cuantitativa incluso de matrices complejas. Los recientes avances en la instrumentación han contribuido de forma decisiva al rápido aumento de la aplicación de la espectroscopia Raman en la industria. En el caso concreto

del análisis de aceites comestibles, la técnica está siendo ya aplicada con éxito para la determinación del grado de insaturación total en aceites, la clasificación de aceites y grasas y en la detección de adulteraciones en aceite de oliva virgen. (Muik et al, 2003).

2. CONTENIDO DE LA INVESTIGACIÓN

En la presente Tesis Doctoral se desarrolla un nuevo proceso para el aislamiento de esteroides a partir de DOD de aceite de girasol y se aplica la espectroscopia Raman al estudio de aceites. Así, se realizan por primera vez los espectros Raman de distintos aceites, se detectan por espectroscopia Raman mezclas de aceites vegetales con distinto grado de insaturación y se emplea la espectroscopia Raman para el estudio de la estabilidad frente al calentamiento de distintos aceites de oliva.

· En el artículo *“Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate”*, se desarrolla un nuevo método para el aislamiento de esteroides a partir de DOD de aceite de girasol. De forma resumida, en el método se usa metanol en presencia de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador para transformar los ácidos grasos libres y los acilglicéridos presentes en el DOD en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES). La glicerina resultante y el exceso de reactivos se eliminan mediante lavados con agua y, finalmente, el producto se enfría en ausencia de disolventes para obtener un precipitado de esteroides con una pureza del 92±2%.

· En el artículo *“Characterization of macadamia and pecan oils and detection of mixtures from other edible seed oils by Raman spectroscopy”* se caracterizan por Raman distintos aceites: aceites de oliva virgen extra, aceite de oliva refinado, aceite de orujo de oliva, aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de nuez de nogal, aceite de nuez pecanera, aceite de nuez de macadamia y aceite de nuez de Brasil. Asimismo, se emplea la

espectroscopia Raman para la detección de mezclas de aceite de maíz o girasol con aceite de nuez de macadamia.

· En el artículo ***“Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures”***, se aplica la espectroscopia Raman al estudio de la estabilidad frente a la oxidación de diferentes aceites de oliva, que son comúnmente usados para fritura, como son: aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva refinado y aceite de orujo de oliva. El seguimiento de la oxidación se hace a partir de la intensidad de la banda en torno a 3011 cm^{-1} , previa demostración de su relación con el índice de insaturación de los aceites estudiados.

3. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se desprenden de los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral son, analizándolas por artículo, las siguientes:

· ***“Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate”***

- La reacción de esterificación de los ácidos grasos libres y la transesterificación de los acilglicéridos presentes en el DOD se da con un mayor rendimiento empleando ácido *p*-toluensulfónico en medio metanólico como catalizador, en una concentración de 0.05M de ácido y una relación metanol/DOD (v/v) de 5.2. El tiempo y temperatura de reacción óptimos han resultado ser 1h y 65°C .

- La glicerina formada y el exceso de reactivos se eliminan fácilmente con tres lavados con agua a 40°C , teniendo una relación agua/DOD (v/v) de 1.5, 1 y 1, respectivamente.

- Aunque en un principio se contempló la eliminación de los FAMEs formados por destilación a vacío (140-195°C) como una etapa previa a la cristalización de esteroides, los diferentes ensayos de aislamiento de esteroides con varios disolventes, concluyeron que los propios FAMEs constituían el disolvente con el cual, por enfriamiento, se obtenían los mejores resultados en cuanto a porcentaje de recuperación. La cristalización a -5°C y durante 24h resultaron el tiempo y temperatura óptimos.

- La purificación de esteroides por lavados con hexano condujo a la obtención de esteroides de una pureza superior al 99%.

- Por tanto, se ha desarrollado un método para el aislamiento de esteroides a partir de DOD de girasol, cuya principal característica frente a otras alternativas, es que no requiere destilación.

· ***“Characterization of macadamia and pecan oils and detection of mixtures from other edible seed oils by Raman spectroscopy”***:

- Se describe por primera vez en la bibliografía el estudio de los aceites de macadamia y pecanera por espectroscopia Raman.

- La espectroscopia Raman es una técnica útil para la comparación de aceites con distinto grado de insaturación.

- Se ha demostrado la potencialidad de la espectroscopia Raman para la detección de adulteraciones de aceite de macadamia con aceites más baratos, como son el de maíz o el de girasol. Esta aplicación puede ser extensible a la adulteración de cualquier aceite con un grado de insaturación diferente al de los utilizados para la adulteración.

· “Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures”:

- La espectroscopia Raman es una técnica muy apropiada para la discriminación de aceites con un contenido diferente de ácidos grasos insaturados.
- La posición y la intensidad de las bandas Raman de las tensiones del enlace C-H de los átomos de carbono que participan en dobles enlaces y las tensiones de los enlaces C=C dependen del grado de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos.
- El aceite de oliva virgen extra es el que ha mostrado mayor estabilidad tras el calentamiento a 190°C durante 5h, debido a su mayor contenido en antioxidantes.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Bailey, G.F., horvat, R.J. “Raman spectroscopic analysis of the dcis/trans isomer composition of edible vegetable oils” Journal of the American Oil chemists’ Society 49 (8) (1972) 494-498.
- Fang, T., Goto, M., Wang, X., Ding, X., Geng, J., Sasaki, M., Hirose, T. “Seperation of natural tocopherols from soybean oil byproduct with supercritical carbon dioxide”. Journal of Supercritical Fluids 40 (2006) 50-58.
- Fernandes, P., Cabral, J.M.S. “Phytosterols: applications and recovery methods”. Biorresource Techonology 98 (2007) 2335-2350.
- Fohr, R., Trujillo-Quijano, J.A. “Process for separating unsaponifiable valuable products from raw materils”. US Patent No. 846941 (2005).

- Ghosh, P.K., Jayas, D.S. “Use of spectroscopic data for automation in food processing industry”. *Sensing and instrumentation for Food Quality and Safety* 3(1) (2009) 3-11.
- Ghosh, S., Bhattacharyya, D. K. “Isolation of tocopherol and sterol concentrate from sunflower oil deodorizer distillate” *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 73 (1996) 1271-1274
- Glücü-Üstündang, Ö., temelli, F. “Column fractionation of canola oil deodorizer distillate using supercritical carbon dioxide”. *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 84 (2007) 953-961.
- Jogarao, Ch. V. “An optical investigation of some Indian oils. II. Raman effect” *Proceedings of the Indian Academy of Sciences A* 4 (1936) 327-331.
- Katon, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R. “Efficacy and safety of plants sterols in the management of blood cholesterol levels”. *Mayo Clinic Proceedings* 78 (2003) 965-978.
- Miettinen, T. A., Puska, P., Gylling, H., Vanhanen, H., Vartiainen, E. “Reduction of serum cholesterol with sitostanol ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population”. *New England Journal of Medicine* 333 (1995) 1308-1312.
- Muik, B., Lendl, Molina-Díaz, A., Ayora-Cañada, M.J. “Direct, reagent-free determination of free fatty acid content in olive oil and olives by Fourier transform Raman spectrometry”. *Analytica Chimica Acta* 487 (2) (2003) 211-220.
- Piivonen, V., Lindsay, D. G. , Miettinen, T. A., Toiva, J., Lampi, A. M. “Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition” *Journal of the Science of food and Agriculture* 80 (2000) 939-966.
- Vázquez, L., Torres, C.F., Fornari, T., Grigelmo, N., Señorans, F.J., Reglero, G. “Supercritical fluid extraction of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates”. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108 (2006) 659-665.

- Watanabe, Y., Nagao, t., Hirota, Y., Kitano, M., Shimada, Y. “Purification of tocopherols and phytosterols by a two-step in situ enzymatic reaction”. Journal of the American Oil Chemists’ Society 81 (2004) 339-345.
- Winters, R. L. “Deodorizer distillate”. In: Erickson, D. R. (Ed), World Conference Proceedings, Edible Fats and Oils Processing Basic Principles and Modern Practices. AOCS Press, Chamaing, IL (1990) 402-405.
- .

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS "ENHANCEMENT OF BY-PRODUCTS OF VEGETABLE OILS INDUSTRY AND APPLICATION OF RAMAN SPECTROSCOPY TO IDENTIFY EDIBLE OILS"**1. INTRODUCTION OR MOTIVATION OF THE DOCTORAL THESIS****1.1 Enhancement of by-products of the oil industry: phytosterols.**

The phytosterol chemical family encompasses a wide variety of compounds structurally similar to cholesterol, specially prominent among which are β -sitosterol, campesterol and stigmasterol naturally occurring phytosterols can be found in free form and also as esters of fatty acids or glycosides (Figure 1). These compounds are present in various plants and plant products (particularly oils, but also legumes and nuts) (Piivonen, Lindsay, Miettinen, Toivo & Lampi, 2000). The significance of phytosterols to the food industry has grown dramatically in recent years. Their presence in adequate amounts (2-3 g/day) in human diet is known to substantially reduce cholesterol absorption by the digestive tract and its concentration in serum as a result. In fact, phytosterols are known to reduce total and LDL cholesterol levels by 10% and 15%, respectively, on average (Katon et al., 2003; Miettinen et al., 1995) without altering HDL or triglyceride concentrations. A wide variety of foods enriched with phytosterols (fat spread, yoghurt and milk) that are added during their processing is commercially available at present.

Deodorizer distillates from edible oils constitute a major industrial source of phytosterols. Deodorization is the last step in the refining of edible oils and involves the removal of some undesirable components of natural fats and oils. The treatment is conducted at 200°C in vacuo for several hours. The by-products thus obtained is called “deodorizer distillate” (DOD) and consists of a complex mixture of various compound families including sterols, steryl esters, hydrocarbons, mono, di- and triglycerides, and

carbonyl compounds (Winter, 1990). Sunflower oil DOD is especially interesting on account of the large amount of useful products it contains (Fizet, 1996; Pramparo et al., 2005).

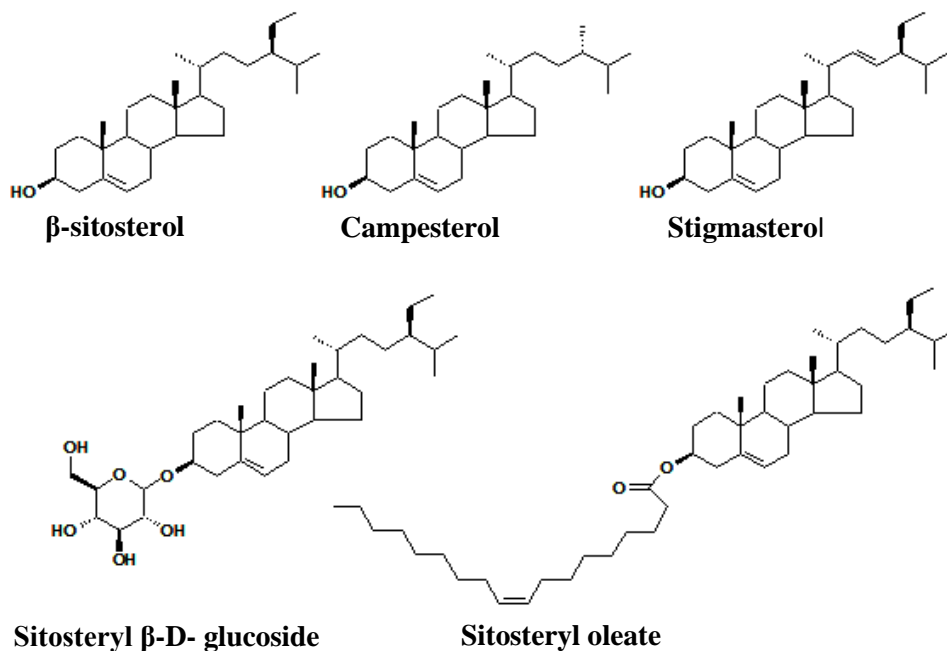


Figure 1. Chemical structures of some phytosterols in free form, as esters of fatty acids and glycosides.

Sterols in DOD can be extracted and isolated by using various methods. Some use enzymes to hydrolyse sterol esters and fatty acids prior to distillation (Ghosh & Bhattacharyya, 1996; Watanabe et al., 2004) others are based on extraction with supercritical CO₂ (Fang et al., 2006; Glücü-Üstündag & Temelli, 2007; vázquez et al., 2006) and still others employ classical hydrolysis, distillation and crystallization procedures (Rohr & Trujillo-Quijano, 2005). Many of these and other, less popular methods for this purpose are discussed in an excellent review (Fernandes & Cabral, 2007).

1.2 Use of Raman spectroscopy to identify oils.

The food industry has shown a steadily increasing interest in developing and adapting nondestructive spectroscopic techniques for automatic monitoring of food processes in real time on- or in-line. The advantages of using spectroscopic techniques are the significant improvements in food products and process development for maintaining and improving food quality, safety and authenticity. In general, the spectroscopic technique allows for a high throughput with high sensitivity in a short response time from very small samples. . Consequently, it increases efficiency of the process and reduces waste. The spectroscopic equipment must be robust so that it can be integrated with the existing infrastructure and be capable of functioning in variety of processing environments. Several spectroscopic techniques are evolving around the world based on different scientific principles. The interactions of electromagnetic radiation with electrons and nuclei of molecules give rise to a host of spectroscopic techniques that are based on absorption, transmission, emission, and scattering processes (Ghosh & Jayas, 2009).

The first application of Raman spectroscopy to the study of oils to be found in literature is the research of Ch.V. Jogarao in performing the Raman spectra five vegetable oils, published in 1936 (Jogarao, 1936). This study carried out the assignment of several bands of Raman spectra obtained for these oils and used to elucidate the main constituent formula butter. The appearance of the band in the region of 1650 cm^{-1} was decisive for the choice of linoleic acid as the third esterified fatty acid triglyceride in the majority. The first Raman studies required an exposure time of 48 hours and shows two spectra for each sample (one filter of a quinine sulfate solution to reduce the fluorescence filter and one without) and instrumentation was also expensive almost homemade. Despite the good results obtained, the application of Raman spectroscopy in the study of oils is not found again until the 70s (Bailey & Horvat, 1972) in a work in which this technique is applied to study the composition of cis / trans isomers in oils, following the band near 1656 cm^{-1} and

1670 cm⁻¹. Chromatographic methods were established as official methods, although tedious and expensive. But not all spectroscopic techniques have had the same application over time due to the lack of progress in instrumentation to do this implementation faster, more accurate and robust.

Raman spectrometry is a very promising tool in processing analytical chemistry because many samples can be examined non-destructively in short time without any sample preparation. Moreover, Raman spectra exhibit well-resolved bands of fundamental vibrational transitions hence providing a high content of molecular structure information. In combination with chemometric data evaluation, Raman spectrometry is a powerful tool capable of extracting quantitative chemical information also from complex matrices. Recent advances in instrument technology have decisively contributed to a rapid increase in industrial applications of Raman spectrometry. In the field of edible oil analysis, the technique has already been successfully applied to the determination of the total unsaturation in oils, oil and fat classification, and to the detection of adulterations in virgin olive oil (Muik, B. et al, 2003).

2. CONTENT OF THE RESEARCH

In this Doctoral Thesis a new method for isolating sterols from sunflower oil deodorizer distillate (DOD) was developed and Raman spectroscopy has been applied to study edible oils. Moreover, Raman spectra of various edible oils have been registered for the first time, and vegetable oils blend with various degrees of unsaturation have been detected by using Raman spectroscopy, which has also been employed to study the stability against heating of a variety of olive oils.

- In the paper "*Isolation of sterols from deodorizer distillate sunflower oil*", a new method for isolating sterols from sunflower oil deodorizer distillate (DOD) was developed. The most salient feature of which is that, unlike most alternatives, it requires no distillation. Briefly, the method uses methanol in the presence of p- toluenesulphonic acid as catalyst to convert free fatty acids and acyl glycerides in DOD into fatty acid methyl esters (FAMES). The resulting glycerin and excess reagents are removed by washing with water and, finally, the product is cooled in the absence of solvents to obtain sterols in $92 \pm 2\%$.

- In the paper "*Characterization of macadamia and pecan oils and detection of Mixtures from other edible seed oils by Raman spectroscopy*" different oils (extra virgin olive oil, refined olive oil, olive pomace oil, corn oil, sunflower oil, walnut oil, pecan nut oil, macadamia nut oil and Brazilian nut oil) have been characterized by Raman spectroscopy. In addition, the Raman spectroscopy for the detection of mixtures of corn or sunflower oil with macadamia nut oil is also used.

- In "*Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures*", Raman spectroscopy is applied to study the stability against oxidation of different olive oils, which are commonly used for frying, as: extra virgin olive oil, refined olive oil and olive pomace oil. The monitoring of the oxidation is based on the intensity of the band around 3011 cm^{-1} , upon proof of their relationship with the unsaturation of the oils studied.

3. CONCLUSIONS

The conclusions derived from studies in this doctoral thesis are detailed.

· *"Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate"*

- Esterification of free fatty acids and transesterification of the acyl glycerides present in the DOD occurs with a higher yield by using p-toluenesulfonic acid as catalyst in methanolic medium at a concentration of 0.05M acid and methanol / DOD (w / w) ratio of 5.2. The optimum time and temperature of reaction have proved to be 1h and 65°C.
- The formed glycerin and excess reagents are easily removed by three washings with water at 40°C, in a water / DOD (v / v) ratio of 1.5, 1 and 1 respectively.
- At first, distillation of FAMES in the reaction mass by vacuum distillation (140°-190°C) was tested as a previous step to allow sterols to be preconcentrated. Nonetheless, various tests of crystallization of sterols with different solvents have shown that FAMES formed in the previous step provide a suitable medium for cold crystallization of sterols. In fact, this medium provided the best results in recovery of sterols. The best sterol yields was obtained by cooling at -5°C for 24 h.
- Sterols Purification by washings with hexane led to obtaining sterol purity higher than 99%.
- Therefore, a method for isolating sterols from DOD sunflower oil has been developed, requires no distillation.

- ***"Characterization of macadamia and pecan oils and detection of mixtures from other edible seed oils by Raman spectroscopy"***

- We used Raman spectroscopy for the first time to characterize macadamia and pecan nut oils with a view to their differentiation from other seed oils including corn and sunflower oils.

- Raman spectroscopy is a useful technique for comparing oils with different degrees of unsaturation.

- It has demonstrated the potential of Raman spectroscopy for the detection of adulteration macadamia oil with cheaper oils such as corn oil or sunflower. This application can be extended to any adulteration of oil with a different degree of unsaturation used for adulteration.

- ***"Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures"***

- Raman spectroscopy is a highly suitable technique for distinguishing edible oils on the bases of the difference in unsaturated fatty acids they contain.

- The position and intensity of the Raman bands for C- H stretching vibrations in unsaturated carbon atoms and stretching vibrations in C=C bonds depend on the degree of unsaturation of the hydrocarbon chains in the fatty acids.

- Extra virgin olive oil proved the most stable after heating at 190°C for 5h by virtue its increased content in antioxidants.

4. BIBLIOGRAPHY

- Bailey, G.F., horvat, R.J.“Raman spectroscopic analysis of the dcis/trans isomer composition of edible vegetable oils” Journal of the American Oil chemists’ Society 49 (8) (1972) 494-498.
- Fang, T., Goto, M., Wang, X., Ding, X., Geng, J., Sasaki, M., Hirose, T.“Seperation of natural tocopherols from soybean oil byproduct with supercritical carbon dioxide”. Journal of Supercritical Fluids 40 (2006) 50-58.
- Fernandes, P., Cabral, J.M.S. “Phytosterols: applications and recovery methods”. *Biorresource Techonology* 98 (2007) 2335-2350.
- Fohr, R., Trujillo-Quijano, J.A.“Process for separating unsaponifiable valuable products from raw materils”. US Patent No. 846941 (2005).
- Ghosh, P.K., Jayas, D.S. “Use of spectroscopic data for automation in food processing industry”. *Sensing and instrumentation for Food Quality and Safety* 3(1) (2009) 3-11.
- Ghosh, S., Bhattacharyya, D. K. “Isolation of tocopherol and sterol concentrate from sunflower oil deodorizer distillate” *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 73 (1996) 1271-1274
- Glücü-Üstündang, Ö., temelli, F. “Column fractionation of canola oil deodorizer distillate using supercritical carbon dioxide”. *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 84 (2007) 953-961.
- Jogarao, Ch. V. “An optical investigation of some Indian oils. II. Raman effect” *Proceedings of the Indian Academy of Sciences A* 4 (1936) 327-331.
- Katon, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R. “Efficacy and safety of plants sterols in the management of blood cholesterol levels”. *Mayo Clinic Proceedinsg* 78 (2003) 965-978.

SUMMARY

- Miettinen, T. A., Puska, P., Gylling, H., Vanhanen, H., Vartiainen, E. "Reduction of serum cholesterol with sitostanol ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population". *New England Journal of Medicine* 333 (1995) 1308-1312.
- Muik, B, Lendl, Molina-Díaz, A., Ayora-Cañada, M.J. "Direct, reagent-free determination of free fatty acid content in olive oil and olives by Fourier transform Raman spectrometry". *Analytica Chimica Acta* 487 (2) (2003) 211-220.
- Piivonen, V., Lindsay, D. G. , Miettinen, T. A., Toiva, J., Lampi, A. M. "Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition" *Journal of the Science of food and Agriculture* 80 (2000) 939-966.
- Vázquez, L., Torres, C.F., Fornari, T., Grigelmo, N., Señorans, F.J., Reglero, G. "Supercritical fluid extraction of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates". *European Journal of Lipid Science and Technology* 108 (2006) 659-665.
- Watanabe, Y., Nagao, t., Hirota, Y., Kitano, M., Shimada, Y. "Purification of tocopherols and phytosterols by a two-step in situ enzymatic reaction". *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81 (2004) 339-345.
- Winters, R. L. "Deodorizer distillate". In: Erickson, D. R. (Ed), *World Conference Proceedings, Edible Fats and Oils Processing Basic Principles and Modern Practices*. AOCS Press, Chamaing, IL (1990) 402-405.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La presente Tesis está planteada desde una perspectiva amplia en referencia a posibles mejoras dentro de la industria oleícola. Por una parte, un estudio del aprovechamiento de subproductos generados en la etapa de refino, en concreto el aprovechamiento del destilado de desodorización (DOD), y por otra, ver la posibilidad de introducir nuevas técnicas espectroscópicas, más sostenibles, en el análisis de aceites, como es el empleo de la espectroscopia Raman.

Por ello, la introducción se estructura en dos bloques principales:

1.- Revalorización de subproductos de la industria oleícola: fitoesteroles.

1.1 Introducción

1.1.1. Estructura química de los esteroides

1.1.2. Biosíntesis y funciones biológicas

1.2. Fuentes de esteroides

1.3. Destilados de desodorización

1.4. Obtención de fitosteroides

2.- Aplicación de la espectroscopia Raman en la identificación de aceites.

2.1. Introducción

2.1.1. Aceites vegetales

2.1.2. Interés de las técnicas espectroscópicas en la industria alimentaria

2.2. Espectroscopia Raman

2.3. Aplicaciones Raman al estudio de aceites

1. REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA OLEÍCOLA: FITOESTEROLES.

1.1 INTRODUCCIÓN

Los fitoesteroles son una familia de compuestos químicos exclusivos de las plantas y que en los animales únicamente los encontramos como consecuencia de su ingesta en la dieta. Son metabolitos secundarios que participan activamente en las membranas celulares y en el transporte de los ácidos grasos. Su biosíntesis tiene lugar en la ruta del mevalonato. En los últimos años, los fitosteroles han despertado un enorme interés científico debido a su acción terapéutica sobre la salud. Los fitoesteroles se engloban dentro de los esteroides, una familia de compuestos químicos de naturaleza triterpénica cuyo miembro más representativo es el colesterol. Este compuesto es empleado por las células de los animales para estabilizar las membranas celulares y para transportar y almacenar ácidos grasos (Itzhaki et al, 1990). Por el contrario, las plantas poseen los fitoesteroles, siendo nula o muy pequeña la presencia de colesterol. La función de los fitoesteroles en las plantas es similar a la del colesterol, es decir, que estabilizan la membrana celular.

A continuación, se describen los métodos más habituales para la recuperación o extracción de fitosteroles a partir de los destilados de desodorización de aceites vegetales comestibles, que constituyen una de las principales fuentes de estos compuestos.

1.1.1. Estructura química de los esteroides

Estructuralmente los esteroides están formados por un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno, cuya nomenclatura ha estado confusa hasta que en 1989 la IUPAC recomendó el sistema de numeración mostrado en la figura 1 (IUPAC, 1989). Los fitoesteroles poseen como característica común a la mayoría de ellos la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 y una cadena lateral de entre 8 y 10 átomos de carbono,

junto con un doble enlace en el carbono 5. No obstante, los fitosteroles se siguen nombrando por sus nombres triviales.

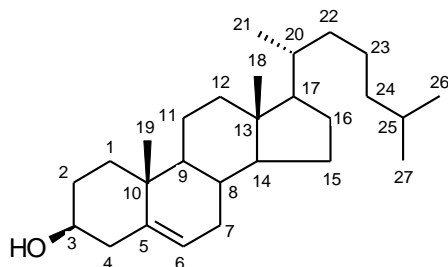


Figura 1. Estructura general y sistema de numeración de los carbonos de un fitosterol.

Los cuatro anillos, que se denominan A, B, C y D, se encuentran en conformación trans, formando un sistema plano α . La cadena lateral y los dos grupos metilo en posiciones 18 y 19 se encuentran en ángulo con respecto a la estructura plana de los anillos, justo por encima de este plano, por lo que su estereoquímica es β (Itzhaki et al, 1990). El grupo hidroxilo del C-3 también posee estereoquímica β .

En total se han descrito unos 250 fitosteroles (Moreau et al, 2002; Akihisa et al, 1991; Berger et al, 2004), los cuales se agrupan habitualmente según su estructura química y su origen biosintético. Estos grupos son los 4-desmetil fitosteroles, los 4-monometil fitosteroles y los 4,4-dimetil fitosteroles (Moreau et al, 2002). Esta clasificación tiene que ver con la presencia de grupos metilo sobre el carbono 4, dos para los 4,4-dimetil, uno para los 4-monometil y ninguno para los desmetil. En la figura 2 se muestran algunos ejemplos de cada uno de estos fitosteroles.

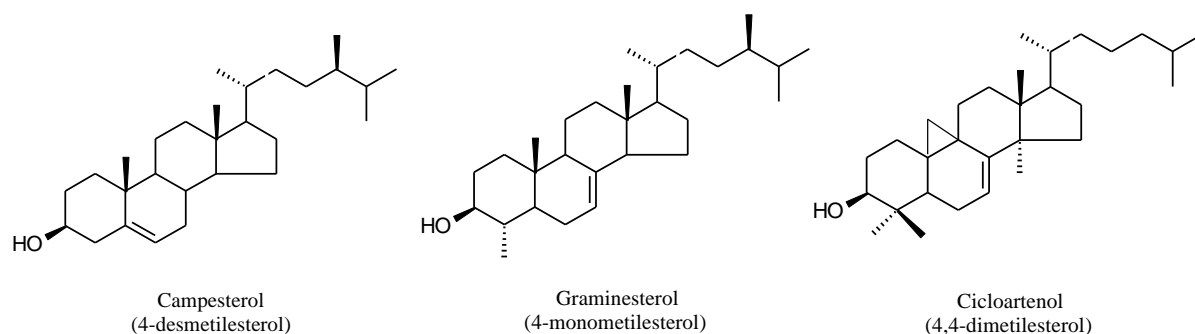
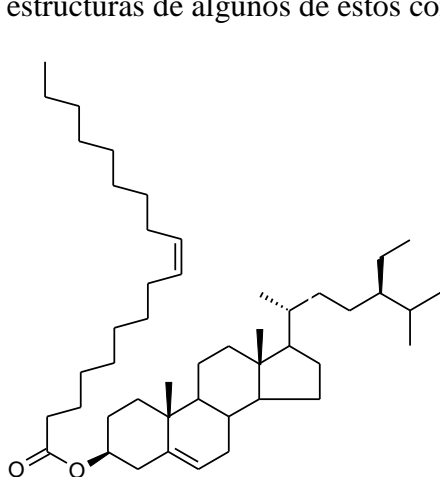
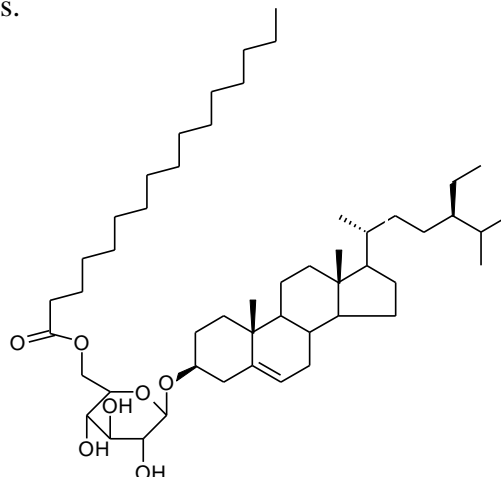


Figura 2. Estructura de algunos 4-desmetil, 4-monometil y 4,4-dimetil fitosteroles

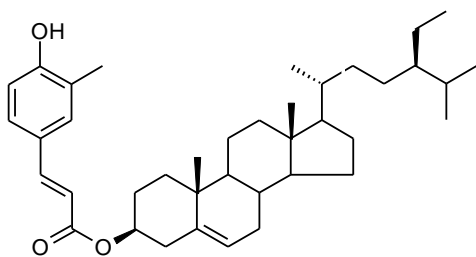
En las plantas, los fitoesteroles pueden encontrarse en forma libre, es decir con el grupo hidroxilo libre o, lo que es más habitual, formando ésteres con ácidos grasos, esteril glicósidos o esteril glicósidos acetilados (Berger et al., 2004). En la figura 3 se muestran las estructuras de algunos de estos compuestos.



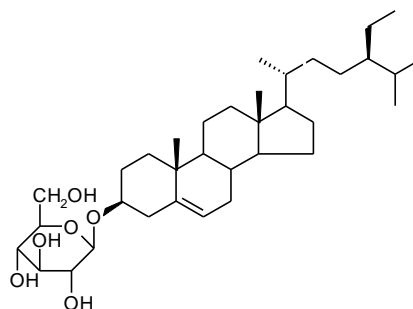
Oleato de sitosterilo



(6'-O-palmitilo)- α -D-glucósido de sitosterilo



Ferrulato de sitoestanoilo



α -D-glucósido de sitosterilo

Figura 3. Estructura de algunos fitoesteroles con el grupo hidroxilo esterificado.

1.1.2. Biosíntesis y función biológica de los fitosteroles

Los fitoesteroles, al igual que todos los compuestos terpénicos, se biosintetizan a través de la ruta del mevalonato, en la que tres moléculas de acetyl-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar pirofosfato de isopentenilo (IPP). El IPP es el precursor activado en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil difosfatos como geranyl difosfato, el cual tras condensarse con otra molécula de IPP se transforma en farnesil difosfato, a partir del cual se forman todos los esteroides (Piivonen et al, 2004). En la figura 4 se recoge abreviadamente esta ruta biosintética.

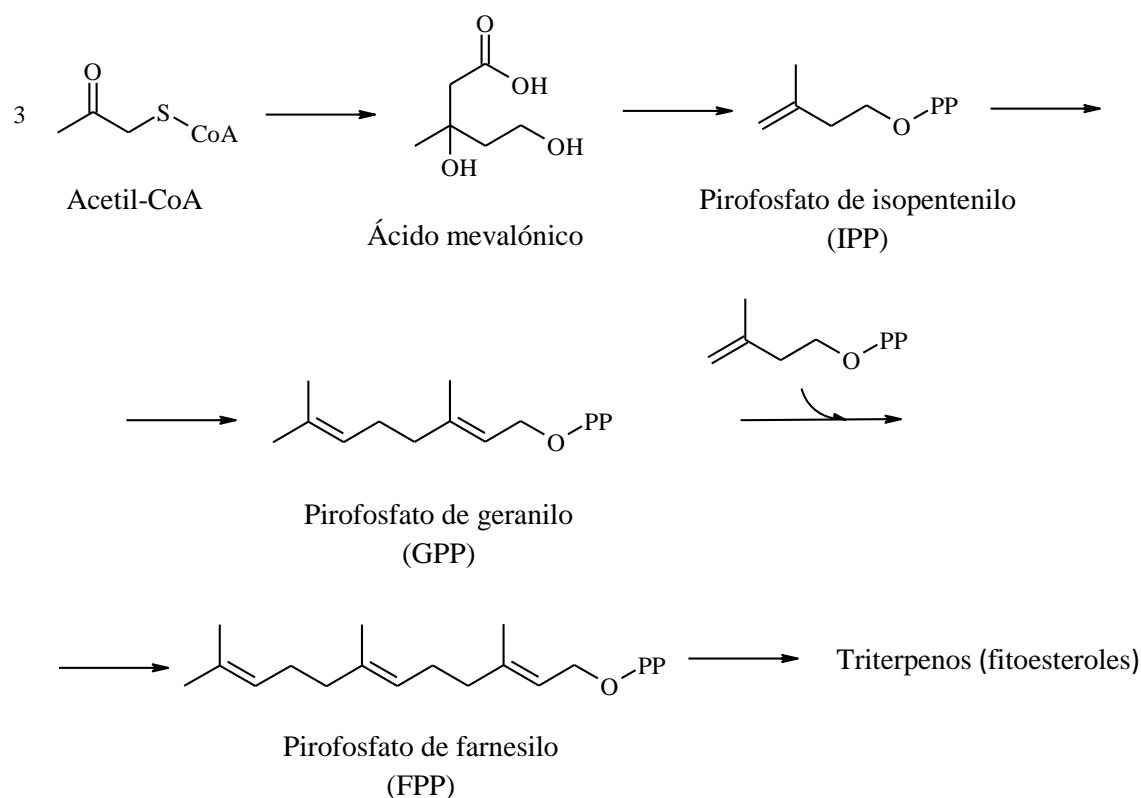


Figure 4. Ruta biosintética de los fitoesteroles.

Existen numerosos estudios epidemiológicos que demuestran una estrecha relación entre las dietas ricas en vegetales y frutas con la reducción de la incidencia de diversas enfermedades, como el cáncer, la diabetes o las enfermedades cardiovasculares. La mayor parte de estos estudios se han llevado a cabo centrándose en sustancias cuyos efectos beneficiosos sobre la salud son sobradamente conocidos, como el β -caroteno, los tocoferoles o la vitamina C.

Aunque a la mayoría de los fitoesteroles no se le conocen actividades biológicas específicas más allá de su presencia en las membranas celulares, sí que se han asociado con diversas acciones al ser ingeridos en determinadas dosis, como por ejemplo en la reducción de colesterol sérico (Weststrate et al, 1999; Pollak, 1985; Moghadasian, 2000; Howard & 1980;Awad et al, 2001), antiinflamatorias (Yamamoto et al, 1991; Gupta et al, 1980), antipiréticas (Gupta et al, 1980), de liberación de insulina (Ivorra et al, 1988;Marles &Farnsworth, 1995) e inmunomoduladoras (Breytenbach et al, 2001; Bouic, 1997; Bouic et al, 1999; Donald et al, 1997).

El efecto de los fitoesteroles en los descensos de los niveles de colesterol sérico fue puesto de manifiesto alrededor de los años 50. Concretamente se emplearon esteroides de la soja y el β -sitosterol en preparaciones que se absorbían en una extensión limitada del tracto intestinal y competían por la absorción con el colesterol tanto endógeno como exógeno (Pollak, 1953). Por tanto, y sin perder de vista que una de las principales causas de muerte en los países desarrollados son las enfermedades cardiovasculares, en la actualidad se están desarrollando numerosos estudios de los efectos beneficiosos que los fitoesteroles tienen sobre la disminución de la incidencia de estas enfermedades, llegándose a estimar que para reducir entre un 8 y un 15% el colesterol se requieren dosis relativamente elevadas de fitoesteroles (de 1,5 a 3 g diarios) (Hendriks et al, 1999). Pero para que llegue a ser apreciable este efecto de reducción de colesterol es suficiente con una ingesta de unos 150 mg diarios, que es un valor que se puede alcanzar con una dieta normal.

Directrices internacionales indican que un consumo de 2g/día de fitoesteroles hace que la concentración de colesterol LDL disminuya significativamente independientemente del género, edad, etnia, peso, dieta de fondo, o la causa de la hipercolesterolemia. (Gylling & Simonen, 2015).

Los fitoesteroles interfieren con la absorción del colesterol intestinal. Se han propuesto varios mecanismos sobre cómo los fitoesteroles inhiben dicha absorción. De todas las teorías propuestas, la teoría miscelar es la única que, hasta el momento, ha sido soportada experimentalmente (Gylling & Simonen, 2015). Esta teoría se basa en el hecho de que el colesterol debe entrar en las miscelas mixtas, formadas por sales biliares y fosfolípidos, con el fin de pasar a través de las células intestinales y ser absorbido en el torrente sanguíneo. El colesterol es parcialmente soluble en estas micelas y es desplazado por los fitoesteroles, que impiden así su absorción. A diferencia del colesterol, los fitoesteroles se absorben muy mal y esa pequeña cantidad que se absorbe se vuelve a excretar en la bilis, dando lugar a bajos niveles séricos de esteroides (Moreau et al, 2002).

No obstante, debido a que las dietas habituales de muchos países occidentales no incluyen cantidades suficientes de verduras y frutas, es necesario recurrir a la administración de fitoesteroles en forma de nutracéuticos o en alimentos funcionales, por lo que se necesita una fuente de donde puedan ser extraídos estos fitoesteroles.

1.2. FUENTES DE ESTEROLES

Existen dos fuentes principales de las que se extraen habitualmente fitoesteroles. Por un lado, el aceite de resina o aceite de sebo (*tall oil*), que es el licor negro que queda como desecho en el proceso para la obtención de pasta celulósica a partir de madera de coníferas. La composición en fitoesteroles del *tall* varía entre un 3 y un 4% (Quilez et al, 2003; Kutney et al 1998). Por otro lado, tenemos los destilados de desodorización, que son

subproductos obtenidos en la refinación de los aceites vegetales. El proceso de refinación de cualquier aceite vegetal comprende varias etapas. La desodorización es la última de ellas y supone la eliminación de algunas sustancias a elevadas temperaturas (230-270 °C) y a presiones reducidas (0-1000 Pa). Como media, un destilado de desodorización constituye del 0.1 al 0.3% del aceite, y contiene entre un 3 y un 15% de fitoesteroles (Guderjan et al, 2005; Hafidi et al, 2005).

1.3. ORIGEN DE LOS DESTILADOS DE DESODORIZACIÓN

Como se ha indicado en la hipótesis 1, la refinación de un aceite tiene como objetivo producir un aceite comestible con las características organolépticas deseadas por los consumidores. Este proceso consta de varios pasos, siendo el último el denominado de desodorización, cuya finalidad es eliminar aquellos componentes que imparten sabores y olores indeseables al aceite. La desodorización se realiza habitualmente por destilación con arrastre de vapor, eliminándose así los componentes más volátiles. No obstante, durante esta destilación también son eliminados, en parte, otros componentes del aceite como ácidos grasos libres, glicéridos e hidrocarburos, junto con otros componentes muy importantes desde el punto de vista nutritivo como son los tocoferoles, los fitoesteroles y el escualeno. El conjunto de todos estos compuestos que se eliminan se recoge como un subproducto que se denomina destilado de desodorización (DOD).

La composición final de un DOD depende del aceite que se procesa, del tipo de refinación (física o química), de las condiciones de presión, temperatura y gas de arrastre empleadas en la desodorización y finalmente de las características del equipo (Winters, 1990). Esta composición marca su utilización y su precio. Así, los DODs procedentes de aceites vegetales de calidad sometidos a refinación química, poseen un porcentaje de materia insaponificable que puede llegar incluso al 30% en peso, por lo que son muy atractivas para su empleo como fuentes de fitoesteroles y/o tocoferoles (Nogala et al, 1993;

Ramamurthi & McCurdy, 1993). Por su parte, lo que se obtienen de un refinado físico, cuya acidez puede llegar hasta el 70%, se utilizan principalmente para la obtención de ácidos grasos (Balaz, 1987).

1.4. RECUPERACIÓN DE FITOESTEROLES

En la bibliografía consultada aparecen descritos numerosos métodos para la extracción y recuperación de los fitoesteroles contenidos en un DOD. Dentro de este DOD los fitoesteroles se pueden encontrar libres o esterificados, por lo que muchos de estos métodos coinciden en una etapa inicial de saponificación para hidrolizar estos esteres de esterilo, si bien las condiciones en las que se produce la hidrólisis del éster pueden ser muy diferentes. Para su descripción en este trabajo las diferentes metodologías existentes en la actualidad para la recuperación de fitoesteroles desde un DOD han sido clasificadas en los siguientes grupos: procesos de destilación molecular; reacciones enzimáticas; extracción con dióxido de carbono supercrítico; extracción con disolventes y cristalización.

Procesos de destilación molecular

La destilación molecular es una técnica que se caracteriza por una exposición corta de la mezcla a destilar a elevadas temperaturas y un alto vacío en el espacio de destilación. Además, los destiladores moleculares poseen una distancia pequeña entre el condensador y el evaporador. Permite separar componentes de una mezcla que poseen elevados puntos de ebullición o que son relativamente termolábiles. El empleo de presiones muy bajas, hasta por debajo de 1 Pa, durante la destilación hace posible estas separaciones al disminuir enormemente los puntos de ebullición respecto a las condiciones estándar de presión atmosférica. Esta técnica se ha empleado con éxito en la separación de compuestos de interés nutricional como vitamina E o carotenoides contenidos en aceite de palma (Othman

et al, 2010; Liu et al, 2008). La destilación molecular se realiza tras una saponificación que libera el esteroles, extracción con disolvente y transesterificación del aceite. También esta técnica se ha empleado en la separación de tocoferoles contenidos en los destilados de desodorización de aceites de soja (Ito et al, 2007; Moraes et al, 2004).

La destilación molecular también se está aplicando a la separación de fitoesteroles. Los destilados de desodorización además de los fitoesteroles, también contienen tocoferoles y otros componentes minoritarios, por lo que al aplicar como técnica de recuperación la destilación molecular recuperamos tanto los fitoesteroles como los tocoferoles. Posada et al. (Posada et al, 2007) extraen de destilados de ácidos grasos de palma tocoferoles y fitoesteroles, que se encuentran en porcentajes realmente bajos, del 0.50 y del 0.24 % en peso, respectivamente. Las condiciones experimentales de la destilación molecular variaban entre los 110-160 °C y presiones inferiores a 10 Pa, con diferentes niveles de flujo de alimentación. En este proceso y en estas condiciones los autores establecieron el siguiente orden de volatilidad para los fitoesteroles: campesterol > estigmasterol > β -sitosterol, no encontrándose ninguna relación entre la volatilidad y el peso molecular. En las mejores condiciones experimentales, la recuperación de fitoesteroles alcanzaba valores superiores al 60% después de tres destilaciones moleculares sucesivas.

Pramparo et al. (Pramparo et al, 2005) aplicaron la destilación molecular a la separación de los componentes minoritarios, incluyendo los fitoesteroles, de destilados de desodorización de aceites de girasol y de soja. El contenido en fitoesteroles de los distintos DODs variaba entre un 4.58% para un DOD de girasol hasta un 9.44% que presentaba el DOD de soja. El otro DOD de girasol contenía un 7.45% de estos fitoesteroles. Antes de proceder a la destilación molecular se realizaba una etapa de esterificación metílica de los ácidos grasos libres contenidos en el DOD. Realizaron dos destilaciones a 110 y 170 °C, con recuperaciones del 40% del total de los fitoesteroles contenidos en los DODs.

Shimada et al. (Hirota et al, 2001; Shimada et al, 2000) han empleado la destilación molecular en varios trabajos para recuperar los tocoferoles y fitoesteroles contenidos en un DOD de aceite de soja. En uno de estos trabajos (Hirota et al, 2001) realizaban la destilación molecular directa sobre el DOD de un aceite de soja, recogiendo una fracción que contenía los fitoesteroles libres y los tocoferoles, además de otros compuestos. A diferencia de otros autores, al no realizar una etapa previa de saponificación no se recuperaban los fitoesteroles que se encontraban esterificados. Por esta razón, realizaron una hidrólisis de los glicéridos posteriormente a la destilación molecular, empleando una lipasa. El residuo que quedaba, que contenía los esteres de esterilo, era posteriormente purificado por destilación molecular, llegándose a obtener recuperaciones mayores del 87% con una pureza del producto del 97%. En un trabajo posterior (Nagao et al, 2005), previa a la destilación, los autores realizan una esterificación de los fitoesteroles con ácidos grasos y de los ácidos grasos libres con metanol en presencia de una lipasa *C. rugosa*, consiguiendo aumentar notablemente tanto el rendimiento de la recuperación de los fitoesteroles como su pureza.

Reacciones enzimáticas

El empleo de enzimas como biocatalizadores en el tratamiento de DODs permite la esterificación de los fitoesteroles libres, lo que favorece su posterior concentración y recuperación por destilación molecular, como hemos comentado en el apartado anterior. Unos de los componentes mayoritarios de los DODs, como también hemos comentado previamente, son los ácidos grasos libres (FFA). En la mayoría de los procesos, estos ácidos grasos, junto con los tocoferoles, deben ser esterificados, ya que debido a la similitud de sus puntos de ebullición no pueden ser separados por destilación (Shimada et al, 2000). No obstante, el metanol empleado en la esterificación de los FFA inhibe la formación de los esteres de esterilo. Para solventar este problema una de las soluciones que

se ha encontrado es emplear una lipasa. Esta lipasa es capaz de llevar a cabo la esterificación de los fitoesteroles en las condiciones empleadas para la esterificación de los FFA. De esta forma, los diferentes componentes del DOD pueden ser ya separados posteriormente por una destilación.

Desde hace años estos procesos enzimáticos vienen siendo utilizados con bastante éxito. Los más antiguos requerían de disolventes orgánicos, agua y un agente desecante (Hedstrom et al, 1992; Jonzo et al, 1997; Shimada et al, 1999). No obstante, estos procesos necesitaban del uso de complejos métodos para la purificación de los productos. Estas limitaciones fueron salvadas empleando lipasas inmovilizadas, capaces de trabajar en condiciones más suaves y en ausencia de cualquier disolvente (Weber et al, 2002). En concreto, partiendo de un DOD de colza o de soja, se consiguieron conversiones superiores al 90% en la esterificación de los fitoesteroles con ácidos grasos empleando una lipasa.

Watanabe et al. (Watanabe et al, 2004) consiguieron la recuperación tanto de los fitoesteroles como de los tocoferoles contenidos en un DOD de soja, realizando una concentración por destilación del DOD y una posterior esterificación. La destilación eliminaba las sustancias de elevado punto de ebullición en el DOD, como los fitoesteroles esterificados y los di- y triglicéridos. El destilado resultante era tratado con una lipasa de *C. rugosa* a 30 °C durante 40 h, que permitía convertir el 80% de los fitoesteroles en esteres de esterilo. La hidrólisis completa de los acilgliceroles y un 70% de metilación de los FFA libres también se conseguía durante este mismo tiempo. Por una destilación posterior se recuperó más del 97% de los fitoesteroles esterificados.

Torres et al. (Torres et al, 2007; Torres et al, 2009) utilizaron una metodología diferente para recuperar los fitoesteroles de un DOD de aceite de soja. En este caso, el DOD inicial se mezcló con ácido oleico para disminuir su punto de fusión hasta unos 30-35 °C y aumentar la relación FFA: fitoesterol hasta 2. De esta forma se mejoraba el progreso de la reacción de esterificación de los fitoesteroles. A continuación se realizaban dos pasos de esterificación. En el primero, se empleó una lipasa de *Candida rugosa* que

transformaba más del 90% de los fitoesteres libres en los correspondientes ésteres, en un tiempo de unas 5 h. En el segundo paso, empleando Novozym 435 se obtenían los ésteres etílicos de los FFA, alcanzándose conversiones superiores al 95% en menos de 3 h de reacción.

Panpipat et al. (Panpipat et al, 2012) consiguieron la recuperación de los fitoesteres contenidos en DODs de aceites de colza y de soja por una reacción de etanolisis del DOD, utilizando lipozyme 435 o lipozyme NS-40044 TLL en 4 h y a 30 °C de temperatura. A diferencia de los procesos anteriores, en este caso no se realizaba una esterificación de los fitoesteres, sino que se recuperaban, en un porcentaje superior al 95%, en forma libre por una extracción con disolventes.

Cristalización

Los métodos de recuperación de fitoesteres a partir de DODs de aceites vegetales denominados de cristalización reciben este nombre porque el proceso culmina con una etapa en la que estos componentes se separan con una elevada pureza empleando una técnica de cristalización. Previa a esta etapa final normalmente se realizan otros procesos que pueden ser reacciones de saponificación, extracciones con disolventes o destilaciones, entre otros.

La cristalización fue de los primeros métodos empleados para recuperar los fitoesteres contenidos en los DODs de aceites vegetales, debido a que su complejidad es baja y su eficiencia puede llegar a ser muy alta. Ya en el año 1943 Yoder (Yoder, 1943) o Lange y Folzenlogen (Lange & Folzenlogen, 1951) en 1951 patentaron sendos métodos de recuperación de fitoesteres por cristalización a partir de la fracción insaponificable de un DOD disuelta en acetona y por adición de bromuro de hidrógeno (Yoder, 1943) o disuelta en cloroformo por adición de ácido perclórico (Lange & Folzenlogen, 1951). Estos procesos, junto con otros similares descritos también a mediados del siglo pasado (Berry &

Miller, 1956; Berry et al, 1958) no conseguían unos buenos resultados ni de porcentaje de recuperación ni de pureza, debido sobre todo a la necesidad de emplear grandes excesos de base para saponificar los ésteres, junto con grandes cantidades también de ácidos minerales. Esto hacía que los procesos fueran complicados y caros. Brown y Smith (Brown & Smith, 1964) unos años más tarde consiguieron obtener el 73% de los esteroides contenidos en un DOD de soja. Emplearon una extracción líquido-líquido con metanol y hexano, seguida de una cristalización en acetona a -20 °C. Antes de llevar a cabo la extracción se realizaba la esterificación con metanol de los FFA. Años más tarde, esta metodología fue mejorada (Fizet, 1996) realizando la misma esterificación, pero ahora seguida por una destilación a 200 °C y 10 Pa. De esta forma se obtenía un residuo rico en fitoesteroides que tras un tratamiento con metanol y ácido sulfúrico a 85 °C llevaba a una mezcla rica en fitoesteroides libres, que por cristalización a 0 °C permitía obtener el 98% de los fitoesteroides totales contenidos en el DOD de partida con una pureza del 90%. Este proceso fue posteriormente mejorado introduciendo distintas variaciones (Jeromin et al, 1997; Ho, 2005).

En la última década se han continuado las investigaciones sobre esta cristalización. En la mayoría de estos métodos descritos, el proceso comienza con una reacción de esterificación y transesterificación de los FFA y los glicéridos, empleando alcoholes de cadena corta y catálisis ácida o básica, seguido por diferentes técnicas experimentales según el trabajo consultado. De este modo, Moreira y Baltanas (Moreira & Baltanas, 2004) han estudiado la influencia de las distintas variables que intervienen en la recuperación por cristalización de los fitoesteroides contenidos en un DOD de girasol. El primer paso, como apuntábamos anteriormente, fue la esterificación de todos los FFA libres en los correspondientes ésteres etílicos, empleando HCl acuoso al 37% como catalizador. Por destilación posterior se eliminaban los restos de HCl, de etanol y el agua, en una primera fracción. Se continuaba la destilación y se recogía una segunda fracción que contenía otros compuestos de mayor punto de ebullición. El residuo final del DOD (DODR) estaba

enriquecido en esteroides y sobre él se estudió la influencia de la relación disolvente: DODR, el efecto de codisolventes y la temperatura y tiempo de cristalización. Después de un completo estudio, en las mejores condiciones se conseguía recuperar el 84% de los fitoesteroides totales, si bien la pureza era solo del 36%. En otras condiciones se podía aumentar la pureza hasta un 85%, si bien entonces el rendimiento era mucho menor.

En DODs de aceites de colza, Li et al. (Yang et al, 2010) realizan la esterificación de los FFA con etanol, pero en este caso empleando un medio básico, consistente en una disolución acuosa alcalina al 40%. Este método, a diferencia de los anteriores, requiere de una etapa de neutralización con ácido, hasta conseguir un pH neutro. De esta forma también se conseguían romper los ésteres de esterilo, obteniendo así los fitoesteroides libres. Para recuperarlos por cristalización, los autores ensayaron diferentes disolventes incluyendo alcoholes, hidrocarburos, cetonas y mezclas de ellos. Los mejores resultados los obtuvieron con una mezcla de acetona: etanol (4:1 v/v) a una temperatura de 2 °C. En estas condiciones conseguían recuperar casi un 23% de los fitoesteroides totales con una pureza superior al 97%, después de tres cristalizaciones.

Partiendo de la misma materia prima, el DOD de aceite de colza, cuyo contenido en fitoesteroides era de un 4.36%, Li et al. (Yan et al, 2012) cambiaron la metodología seguida en el trabajo anterior para cristalizar los fitoesteroides. En este caso, el DOD era primeramente saponificado con etanol en presencia de una disolución acuosa de NaOH. Seguidamente, se procedía a la neutralización del exceso de sosa y se lavaba varias veces hasta conseguir un pH igual a 7. El residuo acuoso se eliminaba por evaporación a vacío y la fase orgánica se sometió a una esterificación con metanol en presencia de ácido sulfúrico. De nuevo, una vez finalizada la esterificación se lavaba con agua, y la fase orgánica era evaporada a vacío. Para recuperar por cristalización los fitoesteroides el residuo que quedaba, que tenía ya un contenido del 9.17% en estos compuestos, fue disuelto en distintos disolventes para cristalizar los fitoesteroides y determinar cuál de ellos conducía a los mejores resultados. El éter de petróleo empleando agua como codisolvente daba los

mejores resultados, que en todo caso no eran muy elevados, pues se conseguía un rendimiento en fitoesteroles del 6.64% con un pureza del 94.7%.

También con un DOD de aceite de colza Jiang et al. (Czuppon et al, 2003) consiguieron cristalizar los fitoesteroles contenidos en él empleando acetona como disolvente y a una temperatura de 5 °C durante 3 h. Previamente, el DOD había sido tratado con metanol y ácido sulfúrico para formar los ésteres de los FFA.

Un método diferente a todos los comentados hasta ahora fue propuesto por Czuppon et al. (Czuppon et al, 2003), consiste en eliminar en un etapa previa los FFA contenidos en el DOD por una destilación a vacío. De esta forma se conseguía reducir hasta en un 50% la cantidad de material de partida. El residuo, enriquecido en fitoesteroles, era tratado con anhídrido benzoico, transformándose los fitoesteroles libres en los correspondientes benzoatos. Después de otra destilación a vacío se obtenía un nuevo concentrado enriquecido en los esterres de esterilo. Este concentrado era posteriormente saponificado empleando una disolución de metóxido sódico en metanol para, finalmente, aislar los fitoesteroles libres por cristalización. Otros autores (Hattori et al, 2001; Charlemagne et al, 2004) también han seguido esta metodología, aunque empleando etanol y KOH concentrado en la etapa de saponificación. Los resultados finales arrojaban valores de rendimientos superiores al 85% en todos los casos, llegando incluso hasta el 97%, con una pureza también superior al 95%.

Lin y Koseoglu (Lin & Koseoglu, 2003) han conseguido la separación de los fitoesteroles contenidos en un DOD de aceite de soja sin utilizar ningún pretratamiento, es decir a partir directamente del DOD. Para ello empleaban una mezcla de acetona y metanol (4:1, v/v), que se añadía al DOD para obtener una relación final de 3:1 (v/w) disolvente:DOD. La temperatura de cristalización era de -20 °C, durante 24 h. Los porcentajes de recuperación de fitoesteroles estaban alrededor del 80%. Khatoon et al. (Khatoon et al, 2010) también han logrado la precipitación directa de los fitoesteroles de

un DOD de aceite de soja empleando ahora mezclas de hexano y agua. Los rendimientos alcanzados eran en los mejores casos del 17.8%.

Extracción con CO₂ supercrítico

Todos los métodos descritos anteriormente emplean diferentes disolventes en alguna de sus etapas, siendo necesarias etapas de eliminación de los mismos, normalmente con técnicas que emplean calor. Este hecho, aparte del encarecimiento del proceso, supone también una desventaja medioambiental. Para intentar paliar estos problemas se han de buscar métodos alternativos, pero capaces de competir con los descritos hasta ahora. Uno de estos nuevos métodos se basa en el uso de dióxido de carbono supercrítico. El CO₂ supercrítico es un fluido que posee unas propiedades físicas idóneas para ser empleado en procesos de extracción, como son sus bajos valores de viscosidad y tensión superficial y su elevada difusividad. Estas propiedades junto a su baja toxicidad y su facilidad de recuperación y purificación, para su posterior reutilización, han provocado que en la última década el CO₂ supercrítico se haya convertido en uno de los agentes extractores que ha estado creciendo, sobre todo en la separación de productos naturales que posteriormente se emplean en alimentación o farmacología (Wijngaard et al, 2012; Sahena et al, 2009; Kaiser et al, 2001).

En general, un proceso de extracción con CO₂ supercrítico supone el paso de este fluido a través de la matriz, de la cual se quiere extraer algún componente, a una determinada presión y temperatura. Una de las mayores ventajas que posee este agente de extracción frente a los disolventes convencionales es su facilidad para ser separado de los componentes por despresurización, por lo que el extracto se encuentra totalmente libre de residuos. Además, como la temperatura crítica del CO₂ es de 31.1 °C, es ideal para la extracción de productos termolábiles.

INTRODUCCIÓN

En una de las primeras aplicaciones de la extracción de fitoesteroles de un DOD empleando CO₂ supercrítico, Chang et al. (Chang et al, 2000), empleando unas condiciones experimentales de temperatura y presión que variaban entre los 50-90 °C y los 24.1-31 MPa, conseguían unos excelentes rendimientos no solo en fitoesteroles, sino también en tocoferoles y escualeno. Mendes et al. (Mendes et al, 2005) consiguieron aislar los tocoferoles y los fitoesteroles contenidos en DODs de diferentes aceites vegetales empleando una extracción con CO₂ supercrítico en un proceso en semi-baño, a una temperatura de 40 °C y una presión de 25 MPa. Empleando una extracción a contracorriente, Señarás et al. (Vázquez et al, 2006; Fornari et al, 2009) separaban los tocoferoles y los fitoesteroles contenidos en un DOD de aceite de girasol. Debido a la elevada cantidad de triacilgliceroles y ácidos grasos libres que contenía el material de partida, los autores realizaron una transesterificación y esterificación de estos componentes con etanol, con el objetivo de favorecer la concentración de los componentes a extraer. El estudio se realizó a escala de planta piloto, a una temperatura de 65 °C empleando un intervalo de presión entre 15 y 23 MPa. Dependiendo del valor de esta presión, el porcentaje de recuperación de los esteroides podía llegar a valores cercanos al 80%.

Finalmente, el CO₂ supercrítico también se está empleando para separar los fitoesteroles contenidos no en los subproductos de la industria de los aceites vegetales, sino en los propios aceites vegetales de diferente origen (Ibáñez et al, 2002; Sovova et al, 2010), llegando a alcanzar altos valores en los porcentajes de recuperación.

2. APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN EN LA IDENTIFICACIÓN DE ACEITES.

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Aceites vegetales

Los aceites vegetales corresponden a la fracción lipídica extraída, por diferentes métodos, de semillas o frutos. Así, encontramos diferentes aceites vegetales, como son: girasol, oliva, colza, sésamo, pepitas de uva, argán, nueces (de nogal, de macadamia, de Brasil, de Pecán), cacahuete y almendra. Todos los aceites vegetales tienen en común que sus componentes mayoritarios son ácidos grasos y glicéridos de éstos.

Sin embargo, muchos aceites vegetales se comercializan como especiales debido a su aroma, gusto o distintas características. Generalmente, los factores considerados para evaluar la calidad de un aceite son: acidez libre, porcentaje de sustancias de alto valor añadido que, además de ser beneficiosas para la salud, le confieren estabilidad frente a la oxidación.

En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se han utilizado como “aceites especiales” por su elevado contenido en sustancias de alto valor añadido, y por consiguiente, su elevado precio en el mercado, los siguientes: aceite de oliva virgen extra, aceite de nuez de macadamia, aceite de nuez de Brasil y aceite de nuez de Pecán (también llamada pecanera). Como aceites de menor calidad, hemos empleado: aceite de oliva refinado, aceite de orujo de oliva, aceite de girasol y aceite de maíz.

En primer lugar comentaremos brevemente la procedencia y características principales de estos aceites.

INTRODUCCIÓN



El aceite de oliva es un producto natural que se obtiene del fruto del olivo (*Olea europea* L.).

El aceite de oliva virgen es aquel que se obtiene directamente del fruto, únicamente por procedimientos mecánicos o físicos, que no ocasionen alteraciones en el aceite, y que sean sólo tratamientos de lavado, decantación, centrifugación y filtración. Los aceites de oliva aptos para el

consumo son:

- Aceite de oliva virgen extra. Debe tener una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 0.8 gramos por 100 gramos y el resto de características recogidas en el Reglamento Europeo CE N° 2472/97.
- Aceite de oliva virgen. Debe tener una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 2 gramos por 100 gramos. El resto de características dentro de los valores recogidos en la norma europea.
- Aceite de oliva virgen ordinario. Debe tener una acidez libre de no más de 3.3 gramos por 100 gramos.

El aceite de oliva virgen no apto para el consumo es denominado aceite de oliva lampante y es aquel cuya acidez libre es de más de 3.3 gramos y/o las características organolépticas u otras características no son las fijadas para la categoría virgen, virgen extra o virgen ordinario.

- El aceite de oliva refinado es el aceite obtenido a partir de aceites de oliva vírgenes mediante técnicas de refinado que no conducen a alteraciones en la estructura glicéridica inicial. Tienen una acidez libre de no más de 0.3 g y el resto de características son las fijadas por la norma europea.

INTRODUCCIÓN

- El aceite de oliva es el aceite constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes apto para el consumo. Tiene una acidez libre de no más de 1g y las demás características son las fijadas por la norma CE N° 2472/97, anteriormente citada.

El aceite de orujo de oliva es el aceite obtenido por tratamiento de orujo de oliva con disolventes u otros procedimientos físicos, excluyéndose los aceites obtenidos por procesos de re-esterificación o por mezcla con aceites de otra naturaleza. Se comercializa en conformidad con las siguientes denominaciones:

- Aceite de orujo de oliva crudo. Está destinado a la refinación para consumo humano o para usos técnicos. Sus características quedan fijadas por la norma anteriormente citada para el resto de aceites de oliva.
- Aceite de orujo de oliva refinado, es el obtenido a partir de aceite de orujo de oliva crudo mediante métodos de refinado que no conducen a alteraciones en la estructura glicerídica inicial. Tiene una acidez libre no superior a 0.3 g y el resto de características son las fijadas por la norma.
- Aceite de orujo de oliva es el que contiene mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo. Tiene una acidez libre de no más de un 1 gramo y las demás características son las fijadas por la norma europea. En ningún caso a esta mezcla se le puede denominar aceite de oliva.

INTRODUCCIÓN



El aceite de girasol se obtiene de las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.). Originalmente cultivado en Norte América por los indios americanos, hoy en día es cultivado en toda América, Europa, Rusia, India y China. Es una planta muy común y su aceite es fundamentalmente usado para alimentación y más recientemente en la obtención de biocombustibles. En cuanto a su composición, es de destacar el alto contenido en esteroides (2.5-4.5%), siendo el principal el β -sitosterol, y en su perfil de ácidos grasos el mayoritario es el linoleico (40-60%), seguido del oleico (15-25%). (Firestone, 2013; Rab et al, 2008).

El aceite de maíz se obtiene de la semilla de maíz (*Z. Mays*, Gramineae). Se cultiva en las zonas templadas del mundo y su uso principal es alimentario. En cuanto a su composición, destaca el alto contenido en esteroides, siendo los mayoritarios el β -sitosterol y el campesterol, y en su perfil de ácidos grasos el mayoritario es el linoleico (45-55%), seguido del oleico (25-35%). (Firestone, 2013)



Los aceites de nueces, al igual que los mencionados anteriormente, están compuestos principalmente de triglicéridos, y también contienen diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ácidos grasos libres y otros componentes, incluyendo antioxidantes naturales y vitaminas solubles en grasas. (Miraliakbari & Shahidi, 2008)

Generalmente los aceites de nueces son ricos en ácidos grasos monoinsaturados, predominantemente ácido oleico, conteniendo niveles bajos de ácidos grasos poliinsaturados, siendo el linoleico el predominante entre estos últimos. (Miraliakbari & Shahidi, 2008). Una importante excepción, son los aceites de las nueces de Brasil y de nogal, que tienen un alto contenido en ácido linoleico, pudiendo representar más de un 50% de los ácidos grasos, seguidos del ácido oleico.(Firestone, 2013)

El aceite de nuez de macadamia se obtiene del árbol del mismo nombre, originario de Australia y Nueva Zelanda. Comprende nueve especies, de las cuales las más importantes



son *Macadamia Intergrifolia* y *Macadamia Tetraphylla*. Las nueve especies son comestibles y fuentes de grasas, proteínas y vitaminas. La particularidad de este aceite en cuanto a su composición es el alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados como son el palmitoleico (C16:1 Δ 9) y ácido asclépico (C 18:1 Δ 9), que lo convierten en un aceite muy saludable. En industria se utiliza fundamentalmente como lubricante. Es un aceite muy

apreciado y empleado en aromaterapia por su acción suavizante, sus propiedades calmantes, y su contenido en nutrientes necesarios para el mantenimiento de la piel.



INTRODUCCIÓN

El aceite de nuez pecanera se obtiene del fruto del árbol *Carya illinoensis*, originario de América del Norte y posteriormente extendido por Estados Unidos y México. Contiene abundantes ácidos grasos insaturados, siendo el oleico y el linoleico, en ese orden, los principales. (Firestone, 2013)



El aceite de nuez de Brasil se obtiene del fruto del árbol del mismo nombre (*Bertholletia excelsa*) que pertenece a la familia Lecythiadaeae. Se puede encontrar en varias regiones de América Latina, especialmente en la región amazónica, de ahí que también se conozca como aceite de nuez de la amazonia. Su perfil de ácidos grasos contiene fundamentalmente linoleico, seguido de oleico y linolénico. (Firestone, 2013)



El aceite de nuez se obtiene del fruto del nogal (*Juglans regia*). Es originario de Persia y actualmente cultivado en Europa, principalmente en el sur de Francia. El ácido graso presente en mayor concentración es el linoleico, seguido del oleico y con concentraciones considerables (5-16%) de ácido linolénico. (Firestone, 2013)



2.1.2. Interés de las técnicas espectroscópicas en la industria alimentaria

La industria alimentaria ha mostrado un creciente interés por el desarrollo y la adaptación de técnicas espectroscópicas no destructivas para la monitorización automática del procesado de alimentos en tiempo real o en línea. Las ventajas de usar técnicas espectroscópicas suponen mejoras significativas en los productos alimentarios y el desarrollo de procesos para mantener y mejorar la calidad de los alimentos, la seguridad y autenticación. En general, las técnicas espectroscópicas consiguen un tiempo de muestreo bajo con una sensibilidad alta para tamaños de muestras muy pequeños. Así, se da un aumento en la eficiencia del proceso y se reducen los residuos. Los equipos espectroscópicos deben ser robustos de forma que puedan estar integrados en la infraestructura existente y sean capaces de funcionar en variados entornos de procesado. Muchas técnicas espectroscópicas están siendo desarrolladas en todo el mundo basándose en diferentes principios. La interacción de la radiación electromagnética con los electrones y los núcleos de las moléculas da lugar a una serie de técnicas espectroscópicas que se basan en procesos de absorción, transmisión, emisión y dispersión (Ghosh & Jayas, 2009).

Uno de los aceites más estudiados por estas técnicas es el aceite de oliva. Éste es un producto natural que se obtiene del fruto del olivo (*Olea europea*) usando solamente procesos mecánicos u otros procedimientos físicos. En la actualidad, la extracción del aceite se lleva a cabo mediante centrifugación continua directa que tiene un mayor rendimiento que el método tradicional basado en la extracción por presión. Estos nuevos métodos demandan sofisticadas técnicas on-line para monitorizar los procesos. De hecho, a día de hoy existen diferentes sistemas automatizados para el control del desarrollo del aceite en el olivo. Esto permite regular y controlar las variables de operación tales como la humedad y la temperatura del aceite, la velocidad de alimentación y la cantidad de aceite obtenido. Para minimizar las pérdidas de aceite, se ha aplicado la espectroscopia de

infrarrojo cercano en el control on-line del contenido en aceite de los subproductos (orujo). Sin embargo, hay todavía pocos métodos analíticos rápidos para determinar la calidad de la materia prima (las aceitunas) y el aceite producido (Muik et al, 2003).

Los aceites de oliva, como hemos visto anteriormente, se clasifican en función de su calidad, variando desde aceite de oliva virgen extra a aceite de oliva lampante, el cual no es apto para el consumo. La adulteración de aceites de olivas con aceites más baratos no es solo un problema comercial, sino que también tiene implicaciones en la salud. Se han aplicado muchos métodos para la detección de adulteraciones, y hay trabajos previos que muestran que técnicas espectroscópicas, como Raman o Infrarrojo, tienen potencial para este tipo de análisis (Marigheto et al, 1998).

En la producción de un aceite de oliva de buena calidad se ven involucradas varias etapas, desde el campo hasta el envasado. La calidad del aceite puede ser afectada por muchos factores, que incluyen las técnicas agrícolas usadas, las condiciones ambientales, los sistemas de cultivo, maduración, método y duración del almacenamiento, y los procesos tecnológicos. La etapa de la recogida de la aceituna es especialmente importante, ya que se debe revisar el grado de maduración para poder garantizar que, durante la etapa de procesado del aceite, el rendimiento de la extracción y la calidad del aceite sean óptimos. La recogida puede tener una influencia muy importante en la calidad del aceite producido, además de en los costes de producción y por lo tanto en la economía de los olivares (Guzmán et al, 2012).

La variedad no tiene una influencia clara en la calidad regulada. Una variedad y un rango de condiciones agrícolas pueden conseguir aceites que se clasifican como virgen extra, si se recogen las aceitunas sanas y en el momento óptimo, en un tiempo apropiado y se llevan a cabo los procesos de molienda adecuados. Una demora en la recogida, mucho tiempo las aceitunas en el suelo, enfermedades...todo esto puede afectar a la calidad del aceite de oliva obtenido finalmente. Por ello, es muy importante poder coger, transportar y procesar las aceitunas sanas separadas de las que tengan algún defecto, ya que pequeñas

cantidades de aceitunas defectuosas pueden alterar significativamente las características organolépticas del aceite obtenido (Guzmán et al., 2012).

Cuando se evalúa la calidad del aceite de oliva virgen, se tienen en cuenta parámetros como el contenido en ácidos grasos libres (FFA), el índice de peróxidos, la absorción a longitudes de onda determinadas (K_{232} y K_{270}) y características organolépticas. El contenido en ácidos grasos libres que se expresa en porcentaje de ácido oleico (w/w) es uno de los principales criterios usados para establecer las diferentes categorías de aceite de oliva. De acuerdo con la Comunidad Europea, el aceite de oliva virgen extra, es la categoría de mayor valor y se considera aceite de alta cocina, y no puede tener un porcentaje de ácidos grasos libres superior al 1%. Como hemos visto también, el límite de acidez en el aceite de oliva para consumo es de 3.3%. El aceite con un contenido superior al límite es el llamado lampante y debe ser refinado antes de su consumo. Bajo condiciones ideales, los frutos maduros deberían dar aceite de oliva virgen extra. Sin embargo, hay diferentes motivos por los que la calidad del aceite de oliva puede disminuir, desde la fase de crecimiento, la recogida y los procesos de producción del aceite. Algunas anomalías durante los procesos de biosíntesis, actividad microbiana o condiciones ambientales pueden también estar relacionadas con la generación de aceite con un alto contenido de ácidos grasos libres. Además de las causas que hacen que la aceituna en el olivo pueda contener un aceite con alta acidez libre, largos períodos de almacenamiento también conducen a la lipólisis aumentando la acidez del aceite producido. Finalmente, malos procesos de extracción también llevan a una disminución de la calidad del aceite. (Muik et al, 2003).

La clasificación de las aceitunas en base a su contenido en ácidos grasos como paso previo a su procesado sería una mejora importante para el proceso de producción de aceite de oliva virgen extra. En este sentido, se evitaría la mezcla de aceite de alta calidad durante la extracción con otros de menor calidad. El control on-line de la acidez del aceite producido también detectaría anomalías durante el proceso de extracción. Además, esto

también permitiría el almacenamiento de los aceites según su contenido de FFA en la planta de producción. (Muik et al., 2003).

El método oficial de la Unión Europea para la determinación de los ácidos grasos libres en aceite de oliva está basado en la valoración del aceite disuelto en una mezcla de éter dietílico y etanol con una base, usando fenolftaleína como indicador. Este método no es apropiado para los procesos de control porque requiere un tiempo, un trabajo intensivo y gran cantidad de disolventes. En la última década, se han propuesto muchos métodos espectroscópicos para la determinación de ácidos grasos en aceites con el fin de superar los inconvenientes del método oficial. Estos incluyen los métodos espectrofotométricos con flujo de inyección automatizado y la determinación por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Estos métodos constituyen alternativas plausibles al método oficial. (Muik et al, 2003).

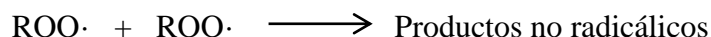
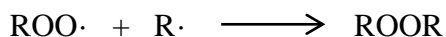
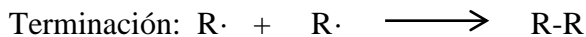
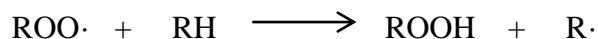
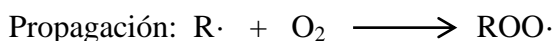
Con respecto al análisis de las aceitunas, el método empleado actualmente está aún lejos de ser adecuado para el control de procesos en línea. Está basado en una valoración química, pero requiere de mucho tiempo ya que tiene el paso previo de la extracción del aceite de la aceituna. Consecuentemente, son pocos los productores que miden el contenido en ácidos grasos libres de las aceitunas antes de su procesado. Muchas veces, el control de la calidad de la materia prima se reduce a inspecciones visuales. Hasta donde conocemos, no hay publicado ningún método que determine el contenido en ácidos grasos directamente en las aceitunas, lo que sería muy adecuado para poder controlar la materia prima en la planta de producción de aceite. (Muik et al., 2003).

Tanto para detectar adulteraciones como para clasificar los diferentes tipos de aceites de oliva (calidad, origen...) se emplean métodos cromatográficos tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (CG) para determinar los triglicéridos y el perfil de ácidos grasos, respectivamente. Además, los triglicéridos del aceite de oliva y de algunos aceites de semilla se han usado para detectar la adulteración de aceite de oliva por cromatografía de gases capilar. En la industria oleícola, estos métodos

clásicos no sólo tienen un consumo de tiempo elevado, sino que también tienen el inconveniente del control on line. Así, se necesitan técnicas rápidas y simples, que ofrezcan la detección on-line para poder aumentar la producción reduciendo costes y satisfaciendo las necesidades de calidad de los consumidores. (El-Abassy et al, 2009).

Es importante considerar que uno de los grandes beneficios del consumo de estos aceites es la prevención de los problemas cardiovasculares y sus bondades están asociadas a la presencia de ácidos grasos insaturados en su composición. Los dobles enlaces presentes en estos ácidos grasos son susceptibles de oxidación (enranciamiento), dando lugar, por vía radicalica, a aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos o epóxidos. Estos compuestos que se producen por la oxidación de los ácidos grasos insaturados, no comparten las características beneficiosas de sus precursores, además de aportar características organolépticas negativas, siendo por tanto imprescindible la detección de estos compuestos en el aceite.

Las reacciones de oxidación consisten en auto-oxidación, fotooxidación, oxidación enzimática y oxidación cetónica, siendo la auto-oxidación la más común en los aceites comestibles (Taghvaei & Jafari, 2015) La autooxidación es la reacción entre el oxígeno y los ácidos grasos insaturados por un proceso autocatalítico con un mecanismo de reacción radicalica en cadena. Esta cadena de reacciones incluye las etapas de iniciación, propagación y terminación: El esquema sería:

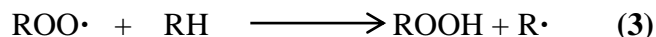
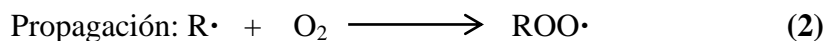


INTRODUCCIÓN

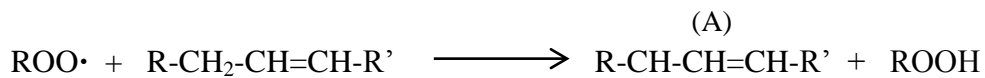
El oxígeno reacciona con muchos compuestos orgánicos (RH) produciendo hidroperóxidos y otros compuestos oxigenados. Esta oxidación es, en la mayoría de los casos, una reacción radicalica, que podemos describir en etapas de iniciación, propagación y terminación. (Frankel, 1980)



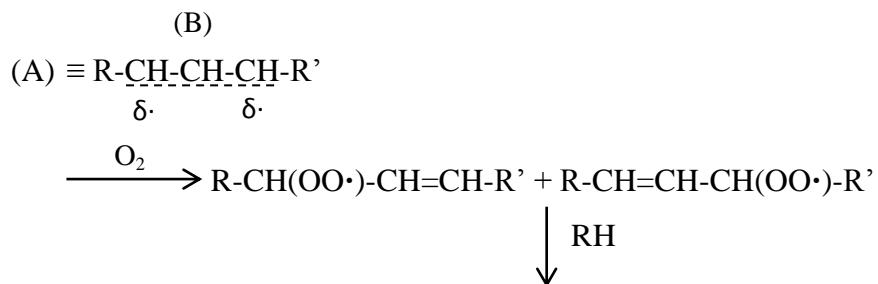
Esta producción de radicales libres puede tener lugar mediante la disociación térmica directa (termólisis), por descomposición de hidroperóxidos, por catálisis metálica y exposición a la luz (fotólisis) con o sin la intervención de fotosensibilizadores.



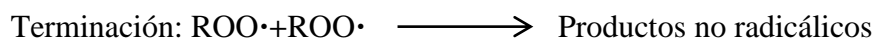
La susceptibilidad de los sustratos orgánicos para la oxidación dependen de la facilidad para donar un hidrógeno en la reacción 3. Con las grasas insaturadas, la susceptibilidad a la oxidación depende de la disponibilidad de hidrógenos alílicos para las reacciones con los radicales peroxi.



La estructura resonante (A) puede representarse como un híbrido (B) con un radical libre parcial en cada extremo el sistema alílico. La reacción con el oxígeno se produce en los carbonos finales del sistema alílico para producir una mezcla isomérica de hidroperóxidos.

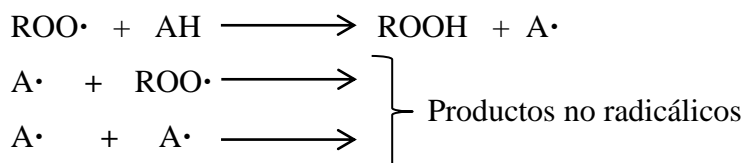


Hidroperóxidos alílicos 1,3



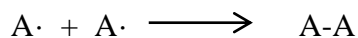
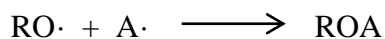
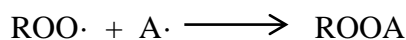
Hay muchos factores que afectan a la auto-oxidación como son las insaturaciones (el factor más importante), la temperatura, la presencia de oxígeno, luz, humedad, metales pesados y antioxidantes.

La oxidación se puede inhibir o frenar por la adición de bajas concentraciones de antioxidantes (AH) que interrumpen la reacción en cadena interfiriendo en la propagación o en la iniciación.



Los antioxidantes que interrumpen la reacción en cadena incluyen compuestos fenólicos, presentes en algunos aceites comestibles, e intervienen en la reacción dando lugar a compuestos que son menos reactivos durante la iniciación y la propagación, como se muestra en las siguientes reacciones:





La susceptibilidad a la autoxidación de los ácidos grasos insaturados depende de la labilidad de sus hidrógenos alílicos la hidroperoxidación de los ácidos grasos insaturados ha sido bien estudiada y el mecanismo de la misma para los ácidos grasos mayoritarios en los aceites comestibles se muestra en la Figura 5 (Frankel, 1980).

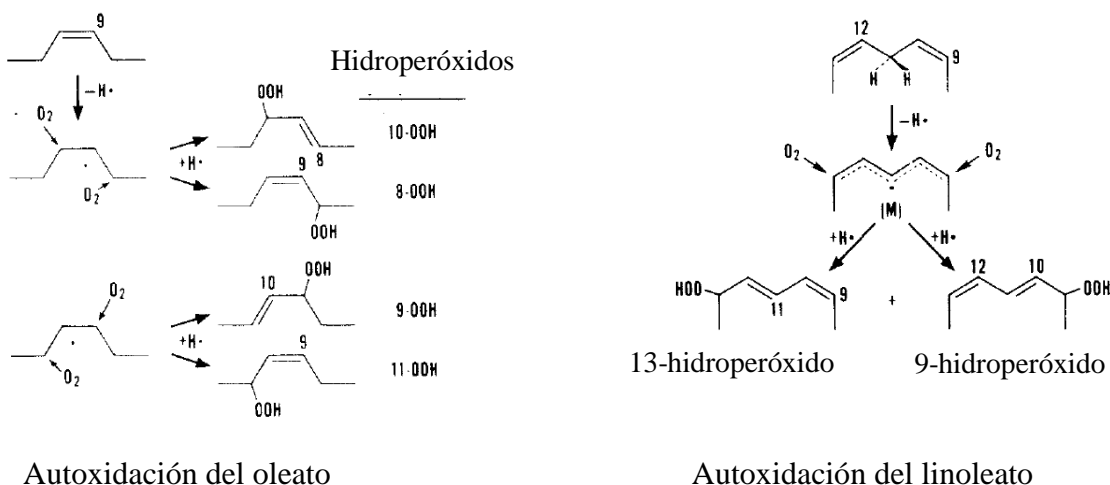


Figura 5. Mecanismo de autoxidación de los ácidos grasos oleico y linoleico.

Así, en aceites sometidos a los mismos tratamientos, la presencia de antioxidantes naturales (fundamentalmente compuestos fenólicos) y el distinto perfil de ácidos grasos, será determinante para los comparar los diferentes comportamientos de los mismos frente a la oxidación.

INTRODUCCIÓN

Un doble enlace en un ácido graso es un punto de la molécula susceptible a la oxidación. La oxidación no se da directamente en los carbonos que constituyen el doble enlace, sino en los carbonos adyacentes. Así, el ácido oleico tiene dos sitios susceptibles a la oxidación, uno en cada carbono adyacente al doble enlace, teniendo una susceptibilidad a la oxidación moderada. La incorporación de un segundo doble enlace para formar ácido linoleico proporciona tres sitios susceptibles a la oxidación, pero uno de ellos está entre los dos dobles enlaces, lo que aumenta significativamente la susceptibilidad de oxidación. La incorporación de un tercer doble enlace para formar ácido linolénico introduce un nuevo sitio entre dobles enlaces, aumentando así la susceptibilidad para la oxidación. Las velocidades relativas de autooxidación para el ácido oleico, linoleico y linolénico son del orden de 1:12:25. (Della Porta, 2006).

La Unión Europea emitió el reglamento CE 1989/3 para imponer límites legales en el grado de oxidación del aceite de oliva virgen extra, a través de la medida por espectroscopía UV-Vis de la cantidad de dienos y trienos que contiene (concretamente, por la absorbancia a 232 y 270 nm, que constituyen los parámetros K_{232} y K_{270} , y no debe exceder de 2.50 y 0.22, respectivamente). Los valores de absorbancia por encima de estos umbrales impiden que un aceite de oliva sea clasificado como virgen extra. Sin embargo, el método oficial para la determinación del índice de peróxido implica medir la concentración de grupos peróxido ($-OO\cdot$) en un aceite en dos pasos. Primero, los grupos peróxido se hacen reaccionar con un exceso de ión yoduro (I^-) para formar yodo (I_2), que se valora luego con una solución estándar de tiosulfato de sodio en el segundo paso. El "grado de instauración" de un aceite se mide como el "índice de yodo", que es la cantidad, en gramos, consumidos por 100 g de aceite. La cantidad es una medida de la insaturación en el aceite.

Dichas reacciones de oxidación se ven favorecidas con el aumento de la temperatura, por lo que ya se han realizado estudios sobre la estabilidad frente a la oxidación de aceites

de oliva virgen extra frente a la temperatura de fritura, proceso para el que son empleados ampliamente los aceites de oliva en general.

Por otra parte, los aceites con perfiles de ácidos grasos diferentes, generalmente arrojan valores distintos en la medida de su grado de insaturación. De la misma forma, el grado de insaturación de un aceite determinado va modificándose a lo largo de la oxidación del mismo.

2.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Cuando una radiación pasa a través de un medio transparente, una fracción del haz se dispersa en todas direcciones. En 1928, el físico hindú C. V. Raman descubrió que la longitud de onda de una pequeña fracción de la radiación dispersada por ciertas moléculas, difiere de la del haz incidente y, además, que los desplazamientos de la longitud de onda dependen de la estructura química de las moléculas responsables de la dispersión. Este científico fue galardonado con el Premio Nobel de Física en 1931 por el descubrimiento y el estudio sistemático de este fenómeno.

Los espectros Raman, en la actualidad, se obtienen al irradiar una muestra con una potente fuente láser de radiación monocromática visible o infrarroja. Durante la irradiación se registra el espectro de la radiación dispersada un cierto ángulo con un espectrómetro adecuado. Como mucho, las intensidades de las líneas Raman son el 0,001 % de la intensidad de la fuente y, en consecuencia, su detección y medida resulta más difícil que el espectro infrarrojo.

En la espectroscopia Raman, la excitación espectral se realiza, de ordinario, con radiación cuya longitud de onda está muy alejada de la de los picos de absorción del analito.

2.3 APLICACIÓN RAMAN AL ESTUDIO DE ACEITES

La primera aplicación de la espectroscopia Raman al estudio de aceites encontrada en la bibliografía es la investigación de Ch.V. Jogarao en la que realiza los espectros Raman de tres aceites vegetales, publicado en 1936 (Jogarao, 1936). En este estudio se lleva a cabo la asignación de varias bandas de los espectros Raman obtenidos para estos aceites y se utilizó para dilucidar la fórmula del principal constituyente de la mantequilla Guee, un tipo de mantequilla india. La aparición de la banda en la región de 1650 cm^{-1} fue determinante para la elección del ácido linoleico como el tercer ácido graso esterificado en el triglicérido mayoritario. Los primeros estudios Raman requerían de un tiempo de exposición de la muestra de 48 horas y de dos espectros para cada muestra (uno con filtro de una disolución de sulfato de quinina para disminuir la fluorescencia y otro sin filtro) y la instrumentación era, además de cara, casi casera. Pese a los buenos resultados obtenidos, la aplicación de la espectroscopia Raman al estudio de aceites no es referenciada nuevamente hasta la década de los 70 (Bailey & Horvat, 1972) en un trabajo en el que se aplica esta técnica al estudio de la composición de isómeros *cis/trans* en aceites, siguiendo la banda cercana a 1656 cm^{-1} y 1670 cm^{-1} . Encontrándose ya los métodos cromatográficos establecidos como oficiales (pese a tediosos y caros, también), no todas las técnicas espectroscópicas han tenido la misma aplicación a lo largo del tiempo debido a la falta de avances en la instrumentación que hicieran esta aplicación más rápida, precisa y robusta.

La espectroscopia Raman es una herramienta muy prometedora en estos procesos analíticos ya que se pueden examinar muchas muestras en un corto periodo de tiempo siendo además una técnica no destructiva y que no necesita preparación de muestra. Además, el espectro Raman muestra bandas bien resueltas de las transiciones vibracionales lo que nos da mucha información sobre el contenido de las estructuras moleculares. En combinación con tratamientos quimiométricos, la espectroscopia Raman es una

herramienta poderosa capaz de extraer información química cuantitativa incluso de matrices complejas. Los recientes avances en la instrumentación han contribuido de forma decisiva al rápido aumento de la aplicación de la espectroscopia Raman en la industria. En el caso concreto del análisis de aceites comestibles, la técnica está siendo ya aplicada con éxito para la determinación del grado de insaturación total en aceites, la clasificación de aceites y grasas y en la detección de adulteraciones en aceite de oliva virgen. (Muik et al, 2003).

Las técnicas espectroscópicas tienen un potencial para reemplazar o complementar a los métodos clásicos. La resonancia magnética nuclear (RMN) ya ha sido empleada para la detección de la adulteración de aceites de oliva. Con respecto a la espectroscopia vibracional, la absorción en el infrarrojo cercano (NIR) se ha aplicado a la caracterización de algunos aceites comestibles y para el análisis de aceites de oliva. Igualmente, la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) ha demostrado su potencial como herramienta analítica para la autenticación y clasificación de aceites, y en la detección del deterioro de aceites por fritura, la oxidación de aceites y la adulteración (El-Abassy et al, 2009). La espectroscopia Raman ha sido utilizada para estudiar la estabilidad del aceite de oliva frente a la oxidación, sin embargo el único aceite estudiado ha sido el aceite de oliva virgen extra que es el menos usado para fritura dado su alto precio (Muik et al, 2005; Muik et al, 2007).

En la siguiente tabla se muestra la asignación de las bandas principales en espectroscopia Raman de aceites comestibles:

Número de onda (cm^{-1})	Grupo	Modo de vibración
3005	<i>cis</i> RHC=CHR	=C-H tensión sim.
2924	-CH ₂	C-H tensión asim.
2897	-CH ₃	C-H tensión sim.
2850	-CH ₂	C-H tensión sim.
1750	RC=OOR	C=O tensión
1650	<i>cis</i> RHC=CHR	C=C tensión
1525	RHC=CHR	C=C tensión
1440	-CH ₂	C-H flexión
1300	-CH ₂	C-H flexión
1265	<i>cis</i> RHC=CHR	=C-H flexión
1150	-(CH ₂) _n -	C-C tensión
1008	HC-CH ₃	CH ₃ flexión
968	<i>trans</i> RHC=CHR	C=C flexión
868	-(CH ₂) _n -	C-C tensión

BIBLIOGRAFIA

- Akihisa, T., Kokke, W., Tamura, T. “Naturally occurring sterols and related compounds from plants” in: Patterson GW, Nes WD, Ed. *Physiology and Biochemistry of Sterols*. American Oil Chemists’ Society, Champaign (1991) 172-228.
- Awad, A. B., Finks, C.S., Williams, H., Kim, U. “In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3cells” *European Journal of Cancer Prevention* 10 (2001) 507-513.
- Balaz, I.L. “Refining and use of by products from various fats and oils” *Journal of American Oil Chemists’ Society* 64 (1987) 1126-1128.
- Berger, A. Jones, P.J.H., Abumweis, S.S. “Plant sterols: factor affecting their efficacy and safety as functional food ingredients” *Lipids in Health and Disease* 3 (2004) 5-23.
- Berry, C.M., Miller, S.E. “Isolation of sterols” US Patent 2729656 (1956).
- Berry, C.M., Chang, R.W.H., Le Bard, N.M., Miller, S.E. “Improved process of isolating sterols” US Patent 2866797 (1958).
- Bouic, P.J.D. “Immunomodulation of HIV/AIDS: The Tygerberg/Stellenbosch University experience” *AIDS Bull* (6) (1997) 18-20.
- Bouic, P.J., Clarck, A., Lamprecht, J., Freestone, M., Pool, E.J., Liebenberg, R.W., Kotze, D., Van Jaarsveld, P.P. “ The effects of β -sitosterol(BSS) and β -sitosterols glucoside (BSSG9 mixture on selected immune suppression and inflammation” *International Journal of Sports Medicine* 20 (1999) 258-629.
- Breytenbach, U., Clarck, A., Lamprecht, J., Bouic, P. “Flow cytometric analysis of the Th1-Th2 balance in healthy individuals and patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV) receiving a plant sterol/sterolin mixture” *Cell Biology International* 25 (2001) 43-49.

- Brown, W., Smith, F.E. “Process for separating tocopherols and sterols from deodorizer sludge and the like” US Patent 3153055 (1964)
- Chang, C.J., Chang, Y.F., Lee, H.Z., Lin, J.Q., Yang, P.W. “Supercritical carbon dioxide extraction of high value substances from soybean oil deodorizer distillates” *Industrial & Engineering Chemistry Research* 39 (2000) 4512-4525.
- Charlemagne, D., Bostyn, S., Daguet, D. “Sterol recovering method” (2004) WO 2004111073.
- Czuppon, T., Kemeny, Z., Korari, E., Recseg, K., “Process for recovery of plant sterols from by product of vegetable oil refining” (2003) WO 2004000979.
- Della Porta, R.A. “Edible oils manual” Champaign, IL: AOCS Press (2006) 2nd Edition.
- Donald, P.R., Lamprecht, J.H., Freestone, M., Albrecht, C.F., Bouic, P.J.D., Kotze, D., Van Jaarsveld, P.P. “A randomized placebo-controlled trial of efficacy of betasitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis” *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 1 (1997) 518-522.
- El-Abassy, R.M., Donfack, P., Materny, A. “Visible Raman spectroscopy for the discrimination of olive oils from different vegetable oils and the detection of adulteration” 40 (2009) 1284-1289.
- Firestone, D. “Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes” AOCS Press (2013).
- Fizet, C. “Process for tocopherols and sterols from natural sources” US Patent 5487817 (1996).
- Fornari, T., Torres, C.F., Señorans, F.J., Reglero, G. “Simulation and optimization of supercritical fluid purification of phytosterol esters” *Journal of American Institute of Chemical Engineers* 55 (2009) 1023-1029.

- Frankel, E.N. “Lipid oxidation” *Progress in Lipid Research* 19 (1980) 1-22.
- Ghosh, P.K., Jayas, D.S., 2009. “Use of spectroscopic data for automation in food processing industry”. *Sensing and instrumentation for Food Quality and Safety* 3, Issue1, 2009, 3-11.
- Guderjan, M., Töpfl, S., Angersgach, A., Knorr, D. “Impact of pulse electric field treatment on the recovery and quality of plant oils” *Journal of Food Engineering* 67 (2005) 281-287.
- Gupta, M.B., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K., Bhargava; K.P. “Anti-inflammatory and anti-pyretic activities of β -sitosterol” *Planta Medica* 39 (1980) 157-163.
- Guzmán, E., Baeten, V., Pierna, J.A.F., García-Mesa, J.A. “A portable Raman sensor for the rapid discriminatin of olives according to fruit quality” *Talanta* 93 (2012) 94-98.
- Gylling, H., Simonen, P. “Phytosterols, phytostanols and lipoprotein metabolism” *Nutrients* 7(9) (2015) 7965-7977.
- Hafidi, A., Piach, D., Ajana, H “Membrane-based simultaneous degumming and deacidification of vegetables oils” *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6 (2005) 203-212.
- Hattori, Y., Horio, M., Komo, J. “Process for producing phytosterols by saponification in an alcohol/water solvent” WO 200132681 (2001)
- Hedström, G., Slote, J.P., Backlund, M., molander, M., Rosenholm, J.B. “Lipase-catalyzed synthesis and hydrolysis of cholesterol oleate in aot/isooctane microemulsions” *Biocatalysis and Biotransformation* 6 (1992) 281-290.
- Hendriks, H.F.J., Weststrate, J.A., Van Vliet, T., Meijer, G.M. “Spread enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hipercholesterolaemic subjects” *European Journal of Clinical Nutrition* 53 (1999) 319-327.

- Hirota, Y., Nagao, T., Watanabe, Y., Suenaga, M., Nakai, S., Kitano, A., Sugihara, A., Shimada, Y. “Purification of sterol esters from soybean oil deodorizer distillate” *Journal of American Oil Chemists’ Society* 80 (2001) 341-346.
- Ho, D.S.S. “Recovery of phytonutrients from oils” WO 2005051294 (2005).
- Howard, B.V., Kritchetsky, D. “Phytochemicals and cardiovascular disease” *Circulation* 95 (1997) 2591-2599.
- Ibañez, E., Hurtado Benavides, A.M., Señoráns, F.J., Reglero, G. “Concentration of sterols and tocopherols from olive oil with supercritical carbon dioxide” *Journal of American Oil Chemists’ Society* 79 (2002) 1255-1260.
- IUPAC. *The Nomenclature of Steroids (recommendations 1989)*, International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology 1989.
- Ito, V.M., Batistella, C.B., Maciel, M.R.W., Filho, R.M. “Optimization of tocopherol concentration process from soybean oil deodorizer distillate using response surface methodology” *Applied Biochemistry and biotechnology* (2007) 137-140;885-896.
- Itzhaki, H., Borochoy, A., Mayak, S. “Age-related changes in petal membranes from attached and detached rose flowers” *Plant Physiology* 94 (1990) 1233-1236.
- Ivorra, M.D. D’Ocon, M.P., Paya, M., Villar, A. “Antihyperglycemic and insulin releasing effects of β -sitosterol 3- β -D-glycoside and its aglycone β -sitosterol” *Archives Internationales de pharmacodynamie et de thérapie* 296 (1988) 224-231.
- Jeromin, L., Johannisbauer, W., Gutsche, B., Jordan, V., Wogatzki. “Recovery of tocopherols and sterols from tocopherols and sterols containing mixtures of fats and fat derivatives” US Patent 5627289 (1997).

- Jian, S.T., Shao, P., Pan, L.J., Zhao, Y.Y. “Molecular distillation for recovering tocopherol and fatty acids methyl esters from rapeseed oil deodorizer distillate” *Biosynthesis Engineering* 93 (2006) 383-391.
- Jogarao, Ch. V. “An optical investigation of some Indian oils. II. Raman effect” *Proceedings of the Indian Academy of Sciences A* 4 (1936) 327-331.
- Jonzo, M.D., Niol, A., Druet, D., Comeau, L.C. “Application of immobilized lipase from *Candida rugosa* to synthesis of cholesterol oleate” *Journal of Chemical Technology and biotechnology* 69 (1997) 463-469.
- Kaiser, C.S., Römpp, H., Schmidt, P.C. “Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide” *Pharmazie* 56 (2001) 907-926.
- Khatoon, S., Rajan, R.R., Drishna, A.G. “Physicochemical characterization and composition of Indian soybean oil deodorizer distillate and the recovery of phytosterols” *Journal of American Oil Chemists’ Society* 87 (2010) 321-326.
- Kutney, J.P., Novak, E., Jones, P.J. “Process of isolating a phytosterol composition from pulping soap” US Patent 5770749 (1998).
- Lange, W., Folzenlogen, R.G. “Isolation of sterols” US Patent 2573265 (1951).
- Lin, K.M., Koseoglu, S.S. “Separation of sterols from deodorizer distillate by crystallization” *Journal of Food Lipids* 10 (2003) 107-127.
- Liu, D., Shi, J., Posada, L.R., Kakuda, Y., Xue, S.J. “Separating tocotrienols from palm oil by molecular distillation” *Food Reviews International* 24 (2008) 376-391.
- Marigheto, N.A., Kemsley, E.K., Defernez, M., Wilson, R.H. “A comparison of mid-infrared and Raman spectroscopies for the authentication of edible oils” *Journal of American Oil Chemists’ Society* (1998) 987-992.

- Marles, J.R., Farnsworth, N.R., “Antidiabetic plants and their active constituents” *Phytomedicine* 2 (1995) 137-189.
- Mendes, M.F., Pessoa, F.L.P., Coelho, G.V., Uller, A.M.C. “Recovery of the high aggregated compounds present in the deodorizer distillate of the vegetable oils using supercritical fluids” *Journal of Supercritical Fluids* 24 (2005) 157-162.
- Miraliakbari, H., Shahidi, F. “Lipid class compositions, tocopherols and sterols of tree nuts oils extracted with different solvents” 15(1) (2008) 81-96.
- Moghadasian, M.H. “Pharmacological properties of plant sterols in vivo and in vitro observations” *Life Sciences* 67 (2000) 605-615.
- Moraes, E.B., Batistella, C.B., Torres Álvarez, M.E. Filho, R.M., Wolf Maciel, M.R. “Evaluation of tocopherol recovery through simulation of molecular distillation process” *Applied Biochemistry and Biotechnology Part A* 114 (2004) 619-621.
- Moreau, R.A., Whitaker, B.D., Hick, K.B. “Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural, diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses”. *Progress in Lipid Research* 41 (2002) 457-500.
- Moreira, E.A., Baltanas, M.A. “Recovery of phytosterols from sunflower oil deodorizer distillate” *Journal of American Oil Chemists’ Society* 81 (2004) 161-167.
- Muik B, Lendl B, Molina-Díaz A, Ayora-Cañada M.J.”Direct, reagent-free determination of free fatty acid content in olive oil and olives by Fourier transform Raman spectrometry” *Anal. Chim. Acta* 487 (2003) 211-220.
- Muik B, Lendl B, Molina-Díaz A, Ayora-Cañada MJ. “Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy” *Chem. Phys. Lipids* 134 (2005) 173-182.
- Muik B, Lendl B, Molina-Díaz A, Valcárcel M, Ayora-Cañada M.J. “Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation

in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy” *Anal. Chim. Acta* 593 (2007) 54-67.

· Nagao, T., Kobayashi, T., Hirota, Y., Kitano, M., Kishimoto, N., Fujita, T., Watanabe, Y., Shimada, Y. “Improvement of a process for purification of tocopherols and sterols from soybean oil deodorizer distillate” *Journal of Molecular Catalysis B* 37 (2005) 56-62.

· Nogala-Kalicka, m., Gogolewski, M., Swiatkiewics, E. “Changes in the composition of tocopherols and fatty acids in postdeodorization condensates during refining of various oils” *Fett/Lipid* 95 (1993)144-147.

· Othman, N., Manan, Z.A., Wan Awi, S.R., Sarmidi, M.R. “A review of extraction technology for carotenoids and vitamin E recovery from palm oil” *Journal of Applied Sciences* 10 (2010) 1117-1191.

· Panpipat, W., Xu, X., Guo, Z. “Towards a commercially potential process: enzymatic recovery of phytosterols from plant oil deodorizer distillate mixture” *Process Biochemistry* 47 (2012) 1256-1262.

· Piivonen, V., Lindsay, B.G., Miettinen, T.A., Tolve, J., Lampi, A.M. “Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (2004) 936-942.

· Pollak, O.J. “Reduction of cholesterol in man” *Circulation* 7 (1953) 702-708.

· Pollak, O.J. “Effect of plant sterols on serum lipids and atherosclerosis” *Pharmacology and Therapeutics* 31 (1985) 177-185.

· Posada, L.R., Shi, J., Kakuda, Y., Xue, S.J. “Extraction of tocotrienols from palm fatty acid distillates using molecular distillation” *Separation and Purification Technology* 57 (2007) 200-229.

- Pramparo, M., Prizzon, S., Martinello, M.A. “Estudio de la purificación de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides a partir del destilado de desodorización” *Grasas y aceites* 56 (2005) 228-234.
- Quilez, J., García-Lorda, P., Salas-Salvado, J. “Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situations and future directions “ *Clinical Nutrition* 22 (2003) 343-351.
- Rab, M., Schein, C. Matt, B. “Virgin sunflower oil” *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(7) (2008) 618-624.
- Raicht, R.F., Cohen, B.I., Fazzini, E.P. “Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats” *Cancer Research* 40 (1980) 403-405.
- Ramamurthi, S., McCurdy, A.R.”Enzymatic pretreatment of deodorizer distillate for concentration of sterols and tocopherols” *Journal of American Oil Chemists’ Society* 70 (1993) 287-294.
- Sahena, F., Zaidul I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. “Application of supercritical CO₂ in lipid extraction-A review” *Journal of Food Engineering* 95 (2009) 240-253.
- Shimada, Y., Hirota, Y., Baba, T., Sugihara, A., Moriyama, S., Tominaga, Y., Terai, T. “Enzymatic synthesis of steryl esters of polyunsaturated fatty acids” *Journal of American Oil Chemists’ Society* 76 (1999) 713-716.
- Shimada, Y., Nakai, S., Masaharu, S., Sugihara, A., Kitano, M., Tominaga, Y. “Facile purification of tocopherols from soybean oil deodorizer distillate in high yield using lipase” *Journal of American Oil Chemists’ Society* 77 (2000). 1009-1013.
- Sovora, H., Galushko, A.A., Stateva, R.P., Rochova, K., Sajfirtova, M., Bartlova, M. “Supercritical fluid extraction of minor components of vegetable oils: Sitosterol” *Journal of Food Engineering* 101 (2010) 201-209.

- Taghvaei, M., Jafari, S.M. “Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives” *Journal of Food Science* (2015) 1272-1282.
- Torres, C.F., Torrelo, G., Señorans, F.J., Reglero, G. “A two steps enzymatic procedure to obtain sterol esters, tocopherols and fatty acid ethyl esters from soybean oil deodorizer distillate” *Process Biochemistry* 42 (2007) 1335-1341.
- Torres, C.F., Fornari, T., Torrelo, G., Señorans, F.J., Reglero, G. “Production of phytosterols esters from soybean oil deodorizer distillates” *European Journal of Lipid Science and Technology* 111 (2009) 459-463.
- Vázquez, L., Torres, C., Fornari, T., Griguelmo, N., Señorans, F.J., Reglero, G. “Supercritical fluid extraction of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates” *European Journal of Lipid Science and Technology* 108 (2006) 659-665.
- Watanabe, Y., Nagao, T., Hirota, T., Kitano, M., Shimada, T. “Purification of tocopherols and phytosterols by a two-step in situ enzymatic reaction” *Journal of American Oil Chemists’ Society* 81 (2004) 339-345.
- Weber, N., Weitkamp, P., Mukherjee, K.D. “Cholesterol-lowering food additives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters” *Food Research International* 35 (2002) 177-181.
- Weststrate, J.A., Ayesh, R., Bauer-Plank, C., Drewitt, P.N. “Safety evaluation of phytosterol esters. Part 4: Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol enriched margarine” *Food and Chemical Toxicology* 37 (1999) 1063-1071.
- Wijngaard, H., Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N. “Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin” *Food Research International* 46 (2012) 503-513.

INTRODUCCIÓN

- Winters, R.L. “ Edible fats and oils processing:basic principles and modern practices” Erickson D.R., Ed. American Oil Chemists Society, Champaign, pp 402-405 (1990)
- Yamamoto, M., Masui, T., Sugiyama, K., Yokota, M., Nakagomi, K.K., Nakazawa, H. “Anti-inflammatory active constituents of Aloe arborescens Miller” Agricultural and Biological Chemistry 55 (1991) 1627-1629.
- Yan, F., Yang, H, Li, J., Wang, H. “Optimization of phytosterols recovery from soybean oil deodorizer distillate” Journal of American Oil Chemists’ Society 89 (7) (2012) 1363-1370.
- Yang, H., Yan, F., Wu, D., Huo, M., Li, J. “ recovery of phytosterols from waste residue of soybean oil deodorizer distillate” Bioresource Technology 101 (2010) 1471-1476.
- Yoder, L. “Isolation of sterols fom fats and oils” US Patent 2322906 (1943).

CAPÍTULO II

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(ARTÍCULO 1)

PAPER 1

Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate

María A. Carmona,^a Carlos Jiménez,^b César Jiménez-Sanchidrián,^a Fernando Peña,^b J. Rafael Ruiz^{a,*}

^aDepartamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Carretera Nal. IV-A km. 396, 14071 Córdoba

^bSOS Corporación Alimentaria S.A. Laboratorio Central de Análisis, Carretera Nal. IV-A, Km. 388, Alcolea 14610

Abstract

A new method for isolating sterols from sunflower oil deodorizer distillate (DOD) was developed. The most salient feature of which is that, unlike most alternatives, it requires no distillation. Briefly, the method uses methanol in the presence of p-toluenesulphonic acid as catalyst to convert free fatty acids and acyl glycerides in DOD into fatty acid methyl esters (FAMEs). The resulting glycerine and excess reagents are removed by washing with water and, finally, the product is cooled in the absence of solvents to obtain sterols in 92 ± 2 % purity.

Keywords: Deodorizer distillate; DOD; sterol; sunflower oil.

CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)

1. Introduction

The phytosterol chemical family encompasses a wide variety of compounds structurally similar to cholesterol specially prominent among which are β -sitosterol, campesterol and stigmasterol. Naturally occurring phytosterols can be found in free form and also as esters of fatty acids or glycosides. These compounds are present in various plants and plant products (particularly oils, but also legumes and dried fruits) (Fernandes & Cabral, 2007). Moreau et al., 2002 Piivonen et al., 2000). The significance of phytosterols to the food industry has grown dramatically in recent years. Their presence in adequate amounts (2–3 g/day) in human diet is known to substantially reduce cholesterol absorption by the digestive tract and its concentration in serum as a result. In fact, phytosterols are known to reduce total and LDL cholesterol levels by 10% and 15%, respectively, on average (Katon et al., 2003). Miettinen et al., 1995) without altering HDL or triglyceride concentrations. A wide variety of foods enriched with phytosterols (fat spread, yoghurt, milk) that are added during their processing is commercially available at present. The addition of phytosterols esters to foods is regulated by the European Union Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients.

Deodorizer distillates from edible oils constitute a major industrial source of phytosterols. Deodorization is the last step in the refining of edible oils and involves the removal of some undesirable components of natural fats and oils. The treatment is conducted at 200 °C *in vacuo* for several hours. The by-product thus obtained is called “deodorizer distillate” (DOD) and consists of a complex mixture of various compound families including sterols, steryl esters, hydrocarbons, mono, di- and triglycerides, and carbonyl compounds (Winters, 1990). Sunflower oil DOD is especially interesting on account of the large amount of useful products in contains (Fizet, 1996). (Pramparo et al., 2005).

CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)

The composition of deodorizer distillates varies widely as it depends on several factors including the quality of the seeds used as raw material, the mechanical processes used to extract the oil, and the physical characteristics and operating conditions of the refining plant. Typically, the average composition by weight of a deodorizer distillate is as follows: 30–35% fatty acids, 20–40% glycerols, 2–10% tocopherols, 3–15% sterols, 2–5% hydrocarbons, 3–10% non-glyceride esters and 1–10% miscellaneous substances (Muro Benayas, 2001). The composition of deodorizer distillates for sunflower oils varies widely among references, which echoes the variability in its components (Muro Benayas, 2001). Pramparo et al., 2005).

Sterols in DOD can be extracted and isolated by using various methods. Some use enzymes to hydrolyse steryl esters and fatty acids prior to distillation (Ghosh & Bhattacharyya, 1996). Watanabe et al., 2004); others are based on extraction with supercritical CO₂ (Fang et al., 2006). Glücü-Üstündag & Temelli, 2007). Vázquez et al., 2006) and still others employ classical hydrolysis, distillation and crystallization procedures (Rohr & Trujillo-Quijano, 2005). Many of these and other, less popular methods for this purpose are discussed in an excellent review (Fernandes & Cabral, 2007).

The aim of this work was to isolate sterols from sunflower oil DOD by using a new method based on transesterification of acyl glycerides (i.e. their transformation into fatty acid methyl esters, FAMES), transesterification of steryl esters and crystallization of free sterols at –5 °C.

2. Materials and methods

2.1. Samples and reagents

The sunflower oil deodorizer distillate used was supplied by SOS, S.A. (Andújar, Spain). Table 1 shows its average composition. The reagents (methanol, hydrochloric acid, sulphuric acid and p-toluenesulphonic acid) and solvents (hexane, acetone and ethanol)

CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)

were all analytical reagent-grade, supplied by Panreac (Barcelona, Spain) and used as received.

Table 1. Composition and properties of sunflower oil DOD.

Composition and properties	Sunflower DOD
Moisture (% w/w)	0.16
Free fatty acids (%w/w) (as oelic)	28.5
Saponification value	139.3
Saponifiable matter (% w/w)	60.0
FAMEs (% w/w)	11.5
Total sterols (% w/w)	3.4

2.2. Degassing of DOD

The first treatment applied to DOD was degassing at 65 °C at $2 \cdot 10^{-6}$ bar for 1 h, using a conventional laboratory vacuum distillation apparatus. This treatment produces a lost of DOD mass between 1-1.5%. The nature of the products removed does not been characterized.

2.3. Esterification of free fatty acids and transesterification of acyl glycerides

A previously degassed DOD sample was treated with methanol in an acid medium to convert all fatty acids and transesterify acyl glycerides into FAMEs. In this way, the fatty acids present in the starting DOD were transformed into methyl esters. Simultaneously, steryl esters were broken to form methyl esters and free sterols. The reaction was conducted in refluxing methanol for variable lengths of time.

CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)

2.4. Washing and decanting

The transesterification reaction produced a substantial amount of glycerine that should be removed prior to the crystallization step. This was accomplished by washing with water and subsequent decanting, which also removed excess methanol and the acid catalyst.

2.5. Isolation of free sterols

Cooling the extract from the previous step down to $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ allowed highly pure sterols to be precipitated in $39\pm 3\%$ yield. Subsequent washing with hexane provide sterols over 99% pure.

2.6. Analysis of products

Sterols were determined with the official method of analysis for the determination of the composition and content of tocopherols and sterols, issued by the International Olive Oil Council via document COI/T.20/Doc n. 10/Rev. 1, 2001. Basically, this process consists in a saponification followed by an extraction of the unsaponifiable components. These components, that include the sterols, are separated by thin layer chromatography. Then, the sterols are derivatized by a silanization reaction and analyzed by GC.

3. Results and discussion

3.1. Esterification of free fatty acids and transesterification of acyl glycerides

Following degassing, the DOD was subjected to esterification and transesterification with methanol in the presence of an acid catalyst in order to convert free fatty acids and transesterify acyl glycerides into FAMES. Preliminary tests with two mineral acids (HCl and H₂SO₄) and an organic acid (*p*-toluenesulphonic) as catalysts were conducted at variable concentrations in methanol and methanol/DOD ratios in order to

CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)

select the best choice based on the conversion to methyl esters after 4 h of reaction at 65 °C. Table 2 shows the results obtained with the three acids. As can be seen, the highest conversion to methyl esters was provided by *p*-toluenesulphonic acid, which was thus adopted for subsequent tests.

Table 2. Results obtained in the esterification and transesterification reactions in sunflower oil DOD with different acids catalyst^a.

Ácid	MeOH/DOD ratio ^b	Concentration ^c	%FAMES ^d
HCl	6.5	0.48	27.2
H ₂ SO ₄	6.5	0.35	36.8
PTSA ^d	5.2	0.05	54.4

^aReaction conditions: T=65 °C; t=4 h. ^bMethanol/sunflower DOD ratio (v/v). ^cConcentration of acid in methanol used, in mol/l. ^d*p*-toluensulfonic acid. ^d%FAMES obtained.

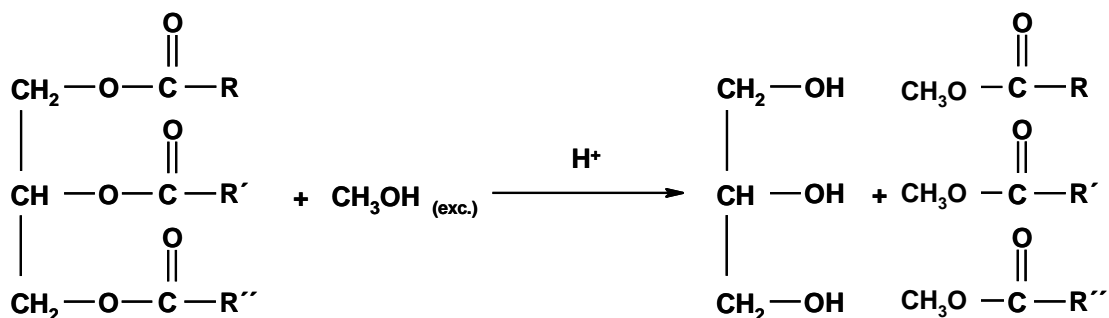
As noted earlier, *p*-toluenesulphonic acid (PTSA) was found to provide the best esterification and transesterification results among the three catalysts tested. The next logical step was therefore to reduce the methanol/DOD ratio and reaction time as far as possible, and find the optimum PTSA concentration. A number of tests in this direction (results not shown) revealed that the best operating conditions for the esterification and transesterification of sunflower oil DOD with methanol and PTSA were a methanol/DOD w/w ratio of 1, a PTSA concentration of 0.05 M in methanol, a temperature of 65 °C and a reaction time of 2 h.

As can be seen from Scheme 1, transesterification of acyl glycerides in the DOD produced glycerine, which required removal prior to extraction of sterols -and so did excess methanol and acid present in the reaction mass. This led us to examine the effect of

CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)

washing with various solvents to remove both glycerine and residual methanol and acid. The solvents used included ethanol/water mixtures in variable proportions at different temperatures; all, however, provided highly stable emulsions that were virtually impossible to break and hence useless for the intended purpose. On the other hand, pure water decanted without emulsification, thereby dramatically facilitating separation of the aqueous phase containing the glycerin and excess methanol and acid from the organic phase containing the desired products. The optimum washing conditions were found to be three washings with water at 40 °C in a water/DOD ratio of 1.5 in the first, and 1 in the second and third.

Scheme 1. Mechanism of the transesterification reaction..



3.2. Distillation of FAMES

In order to preconcentrate sterols present in the reaction mass, FAMES formed during the esterification/transesterification step were removed by vacuum distillation. This procedure is commonly used in several methods for the obtainment of sterols from various sources (Moreira & Baltanás, 2004. Muro Benayas, 2001. Pramparo et al., 2005). FAMES were vacuum-distilled at $2 \cdot 10^{-3}$ mbar and the fraction distilling at 140–195 °C collected.

CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)

These conditions allow sterols to be preconcentrated to *ca.* 10% by weight and the proportion of FAMES to be reduced to about 3%.

3.3. Isolation of sterols

Most reported methods for the crystallization of sterols present in DODs from oils and other fatty matrices require using some solvent to isolate FAMES formed in a prior step (Brown & Smith, 1964. Fizet, 1996. Hamunen, 2007. Jeromin et al., 1997. Wollmann et al., 2005). With our method, distillation of FAMES in the reaction mass allowed sterols to be preconcentrated by 10–12% for subsequent isolation by crystallization with an appropriate solvent. However, none of the solvents tested (acetone, hexane, ethanol, methanol, water and mixtures thereof) allowed sterols to be obtained in proportions above 8%. As can be seen from Table 3, only with solvents such as acetone and methanol, and cooling at low temperatures (–20 °C) for a long time, was a sterol yield of barely 13% at best—and accounting for only 8% of the amount of sterols present in the starting DOD—obtained.

At that point, we thought that the FAMES formed in the previous step might provide a suitable medium for cold crystallization of the sterols. We therefore conducted tests involving cooling of the washed, decanted reaction mass in the presence of different amounts of FAMES at variable temperatures for also variable lengths of time. In some cases, the medium was enriched with FAMES in order to examine their effect on sterol crystallization. Table 4 shows the amount of sterols obtained and their purity. In all cases, the amount of FAMES obtained coincided with the combination of those formed by esterification and transesterification; in fact, the external addition of FAMES or their partial distillation invariably led to poorer results. In the examples of Table 4, sterols were always isolated in the presence of FAMES formed during the esterification/transesterification step (i.e. vacuum distillation to remove FAMES, whether completely or partially, was avoided

CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)

since it considerably reduced the amount of sterols obtained). As can be seen from Table 4, the best sterol yields were obtained by cooling at $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Using lower temperatures caused the reaction mass to completely freeze and precluded isolating any of its components.

Table 3. Effect of temperature and cooling time on the isolation of sterols with various solvents.

	Solvent/DOD ratio	T _{cryst} ($^{\circ}\text{C}$)	t(h)	Sterols ^a (%)	Sterols ^b (%)
Hexane + water (1.5% w/w)	3/1	0	24	-	-
Acetone/Methanol (4:1 ratio)	3/1	-20	4	-	-
Acetone	1/1	-20	5	4	3
Methanol	1/1	-20	5	3	5
Acetone	3/1	-20	5	13	6
Acetone/Methanol (4:1 ratio)	3/1	-20	5	13	8
Acetone/Methanol (3:2 ratio)	3/1	-20		11	7

^aPercentage of sterols in precipitated solid; ^bPercentage of isolated sterols (purity > 99%).

Once sterols were isolated from the reaction mass, they were washed in hexane. The end-product thus obtained was a mixture of sterols with $92\pm 2\%$ purity (in some cases this value is higher than 99%).

The results obtained with the proposed sterol isolation method are better than most reported to date. Thus, Fizet (1996) obtained sterols about 90% pure. Obtaining results

CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)

similar to ours entails using more sophisticated techniques such as molecular distillation of transesterified DOD and subsequent crystallization. Some authors (Lin, 2003) have recovered sterols even more efficiently, but failed to state their purity.

Table 4. Effect of temperature and cooling time on the isolation of sterols with FAMEs as solvent.

T _{cryst} (°C)	t (h)	Sterols in precipitated solid (%)	Isolated sterols (%) ^a	Precipitated solid (%) ^b
-40	12	-	-	3.9
-15	24	-	-	3.9
-15	5	-	-	3.8
-10	24	-	-	4.1
-5	24	65	40	4.2
-5	24	62	42	3.9
-5	44	71	38	4.1
-5	24	88	37	4.1
-5	24	100	35	4.0
0	24	77	23	4.2
7	24	77	18	3.8

^aProportion with respect to total sterols, standard deviation (SD) = 3% (purity = 93±2%).

^bYield of precipitated solid respecto to start material.

Acknowledgements

The authors are grateful to the firm SOS, S.A. for funding this work, and also to Marta Serrano of the Central Analytical Laboratory of Grupo SOS, S.A. (Alcolea, Spain) for her help with the analyses.

References

- Brown, W. & Smith, F.E. (1964). Process for separating tocopherols and sterols for deodorizer sludge and the like. *US Patent no.* 3153055.
- Fang, T. Goto, M., Wang, X., Ding, X., Geng, J., Sasaki, M. & Hirose, T. (2006). Separation of natural tocopherols from soybean oil byproduct with supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 40, 50-58.
- Fernandes, P. & Cabral, J. M. S. (2007). Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, 98, 2335-2350.
- Fizet, C. (1996). Process for tocopherols and sterols from natural sources. *US Patent no.* 5487817.
- Ghosh, S. & Bhattacharyya, D. K. (1996). Isolation of tocopherol and sterol concentrate from sunflower oil deodorizer distillate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1271-1274.
- Glücü-Üstündag, Ö. & Temelli, F. (2007). Column fractionation of canola oil deodorizer distillate using supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 953-961.
- Hamunen, A. (2007). Process for the isolation of sterols and/or wax alcohols from tall oil products. *US Patent no.* 487937.
- Jeromin, L., Johannsbauer, W., Gutsche, B., Jordan, V. & Wogatzki, H. (1997). Recovery of tocopherol and sterol from tocopherol and sterol containing mixtures of fats and fat derivatives. *US Patent no.* 5627289.
- Katon, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T. & Paoletti, R. (2003). Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clinics Proceedings*, 78, 965-978.
- Lin, K. M. & Koseoglu, S. S. (2003). Separation of sterols from deodorizer distillate by crystallization. *Journal of Food Lipids*, 10, 107-127.
- Miettinen, T. A., Puska, P., Gylling, H. Vanhanen, H. & Vartiainen, E. (1995). Reduction of serum cholesterol with sitostanol ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *The New England Journal of Medicine*, 333, 1308-1312.
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D. & Hicks, K. B. (2002) Phytosterols, phytosterols and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses. *Lipid research*, 41, 457-500.

CAPÍTULO II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 1)

- Moreira, E. A. & Baltanás, M. A. (2004) Recovery of Phytosterols from Sunflower Oil Deodorizer Distillates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 161-167.
- Muro Benayas, A. E. (2001) Procedimiento para el aislamiento y extracción de tocoferoles y otros compuestos a partir de subproductos obtenidos en la refinación de aceites vegetales. *Spanish Patent no. 21528576*.
- Piivonen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toiva, J. & Lampi, A. M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 939-966.
- Pramparo, M., Prizzon, S., & Martinello, M. A. (2005) Study of purification of fatty acids, tocopherols and sterols from deodorization distillate. *Grasas y Aceites*, 56, 228-234.
- Rohr, R. & Trujillo-Quijano, J.A., 2005. Process for separating unsaponifiable valuable products from raw materials. *US Patent no. 846941*.
- Vázquez, L., Torres, C. F., Fornari, T., Griglemo, N., Señorans, F. J. & Reglero, G. Supercritical fluid extraction of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 659-665.
- Watanabe, Y., Nagao, T., Hirota, Y., Kitano, M. & Shimada, Y. (2004) Purification of tocopherols and phytosterols by a two-step in situ enzymatic reaction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 339-345.
- Winters, R. L. (1995). Deodorizer distillate. In D. R. Erickson (Ed.). *World Conference Proceedings, Edible fats and Oils Processing, Basic Principles and Modern Practices* (pp. 402-405). Champaign, IL: AOCS Press.
- Wollmann, G., Schwarzer, J. & Gutsche, B. (2005). Processes for producing sterols from fatty acid production residues. *US Patent no. 6956125*.

CAPÍTULO III:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN
(ARTÍCULO 2)

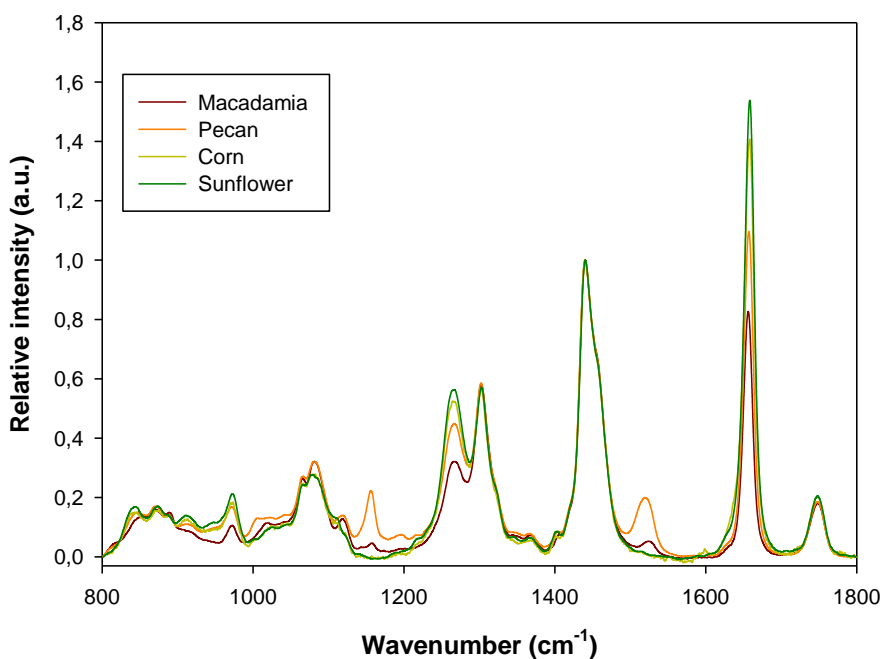
PAPER 2

***Characterization of macadamia and pecan oils and
detection of mixtures from other edible seed oils by Raman
spectroscopy***

By María Ángeles Carmona^a, Fernando Lafont^b, César Jiménez-Sanchidrián^a and José
Rafael Ruiz^{a,*}

^aDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Campus de
Rabanales, Carretera Nal. IV A, km. 396, 14010 Córdoba (Spain).

^bServicio Central de Apoyo a la Investigación, Unidad de Espectrometría de Masas, Universidad de
Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Ramón y Cajal, Carretera Nacional IV-A, km. 396,



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 2)

RESUMEN

La autenticación de grasas para detectar su adulteración con otras grasas más baratas es uno de los principales problemas a los que se enfrentan los productores de aceites de alto valor, ya sea para uso alimentario o para uso cosmético. En este trabajo se emplea la espectroscopia Raman, por un lado, para caracterizar los aceites de macadamia y de nuez pecanera, de alto valor y diferenciarlos de otros más baratos, como los de maíz y de girasol, y por otro, para detectar mezclas del aceite de macadamia con estos aceites vegetales más baratos.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de macadamia, aceite de nuez pecanera, adulteración de aceites, espectroscopia Raman.

SUMMARY

Authenticating fats and detecting their adulteration with substantially cheaper fats can pose major problems to producers of high-value oils for nutritional and cosmetic uses. In this work, we used Raman spectroscopy to discriminate macadamia and pecan oils from other, cheaper vegetable oils including corn and sunflower oils. This technique additionally allows one to detect and assess adulteration of macadamia oil with another vegetable oil.

KEY-WORDS: Adulteration of oils, Macadamia oil, Pecan oil, Raman spectroscopy.

1. INTRODUCTION

Fats and oils are essential ingredients of human diet and have been widely consumed, whether directly or in processed foods, for centuries. The significance of fats and oils lies in their high energy and essential fatty acid contents; the latter are indispensable for proper development of human tissues. Some vegetable oils contain additional substances with excellent properties towards protecting human skin which have fostered their use in medical and aesthetic treatments throughout the world since ancient times.

Macadamia oil is among the most widely used in aromatherapy. This oil is obtained from the fruit of the macadamia tree, which originated in Australia and New Zealand and comprises nine species the most important of which are *Macadamia integrifolia* and *Macadamia tetraphylla*. All nine species are edible and major sources of fats, proteins and vitamins. Macadamia oil is edible and special as regards its composition of monounsaturated fatty acids; thus, it contains palmitoleic acid (C16:1 Δ^9) and asclepic acid (C18:1 Δ^{11}), which, together with its high content in oleic acid (C18:1 Δ^9), make it very healthy (Maguire, *et al.*, 2004). Macadamia oil has other industrial uses, particularly as a lubricant (Knothe, 2010). Also, its softening, soothing properties, its content in nutrients required to preserve skin in excellent conditions and its usefulness as a natural vehicle for essential oils, are highly appreciated for aromatherapy treatments.

Pecan nut oil is obtained from the fruit of the *Carya illinoensis* tree, which originated in North America and subsequently expanded to large areas in the USA and Mexico. Like macadamia oil, pecan oil contains abundant unsaturated fatty acids (oleic and linoleic mainly); however, it is much less widely used for non-nutritional purposes than is macadamia oil.

A number of instrumental techniques have been used to discriminate between different types of vegetable oils or different samples of the same type. Specially suitable for this purpose are ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopies (Guillén, and

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 2)

Ruiz, 2003; Zamora, *et al.*, 2002; Shaw, *et al.*, 1997; Mannina, *et al.*, 2001). However, the use of Raman spectroscopy for this purpose has grown dramatically in recent years, especially for the quantitative detection of adulteration of extra virgin olive oil with other, cheaper edible oils (Zhang, *et al.*, 2011; El-Abassy, *et al.*, 2009; Baeten, *et al.*, 2005; Zou, *et al.*, 2009), its authentication (Korfi, *et al.*, 2011; Aparicio, and Baeten, 1998) or even the determination of some chemical species such as antioxidants (Paiva-Martins, *et al.*, 2011) and free fatty acids (El-Abassy, *et al.*, 2009; Muik, *et al.*, 2003) present not only in olive oil, but also in other vegetable oils. In addition, Raman spectroscopy has been used to assess stability against oxidation in olive oil (Muik, *et al.*, 2007; Muik, *et al.*, 2005).

In this work, we used Raman spectroscopy for the first time to characterize macadamia and pecan nut oils with a view to their differentiation from other seed oils including corn and sunflower oils. This technique also allows adulteration of macadamia or pecan oil with other, cheaper oils (e.g. corn, sunflower) to be detected.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents

All reagents used to establish the fatty acid profiles of the oils were commercially available products.

2.2. Oils samples

The macadamia, pecan, sunflower and corn oil were supplied by the Laboratorio Agroalimentario de la Junta de Andalucía (Córdoba, Spain). The four oils were from commercial origin and fully characterized in this laboratory. The macadamia and pecan oils were virgin oils. Sunflower and corn oil samples with volumes percentages of 5, 10, 20, 30, 40 and 50% were blended into a sample of macadamia oil.

2.3. Determination of the fatty acid profile

The fatty acid analysis were carried out by methylation of the same prior and subsequent determination by gas chromatography with FID detector on a Perkin Elmer Mod. Clarus-500, using a BPX70 capillary column (60 m x 0.25 mm i. d.) Samples were prepared as follows: threaded tube were weighed 0.15 g of oil, previously purified, with an accuracy of 0.01 g and dissolved in 2 mL of hexane. Then added to this solution, 0.2 mL of methanolic 2N potassium hydroxide solution and stirred intensively for 1 minute. It is left to decant the upper phase of hexane containing the fatty acid methyl esters for 30 min, taking an aliquot of the same of 1 ml for injection into GC. Identification of fatty acid methyl esters was carried out by retention times and quantification was performed as % area. The uncertainty analysis method of fatty acids has been validated from different vegetable oils (certified reference materials). From this results we have obtained a relative uncertainty of 5% for all fatty acids (uncertainty calculated for a confidence interval of 98% and a coverage factor $k = 2$).

2.4. Raman Analysis

The Raman spectra for the oil samples were acquired with a Renishaw Raman instrument (InVia Raman Microscope), equipped with a Leica DM2500 M microscope furnished with various lenses (5x, 20x, 50x and 100x), monochromators and filters, and a CCD. Spectra were obtained using a 20x magnification objective and by excitation with green laser light (532 nm) over the wavenumber range 800-1800 cm^{-1} and 2800-3050 cm^{-1} . A total of 32 scans per spectrum were performed in order to improve the signal-to-noise ratio. The liquid samples were placed in the Raman microscope on a Petri dish. Each spectrum was automatically smoothed and baseline corrected using the functions of the spectrometer software Wire 3.3. The normalization of the spectra was performed using the PeakFit v4.11 software.

3. RESULTS

3.1. Fatty acid profile

Table 1 shows the results of the GC determination of the fatty acid profiles for four oil samples. Oleic acid was found to be the most abundant fatty acid in both macadamia and pecan oil. On the other hand, linoleic acid was the major acid in corn and sunflower oils, which, however, contained substantial amounts of oleic acid. Macadamia oil had quite a high content in palmitoleic acid (over 18%); as noted earlier, this, together with the presence of asclepic acid, make it very healthy. All oils had similar contents in linolenic and saturated fatty acids, with differences never exceeding 5% between oils.

Table 1. Fatty acid composition of macadamia, pecan, corn and sunflower oils.

Fatty acid	Macadamia	Pecan	Corn	Sunflower
Lauric	0.06	0	0	0
Myristic	0.64	0.04	0.03	0.07
Palmitic	8.38	6.35	10.84	6.16
Palmitoleic	18.28	0.09	0.15	0.11
Margaric	0.03	0.05	0.01	0.04
Margaroleic	0.01	0.05	0.04	0.02
Stearic	3.68	2.58	2.06	4.44
Oleic	56.76	62.86	30.85	23.87
Asclepic	3.72	0.00	0.00	0.00
Linoleic	2.78	26.40	54.31	64.77
Linolenic	0.27	1.19	0.93	0.07
Araquidic	2.91	0.15	0.45	0.31
Gadolenic	2.51	0.24	0.26	0.15

3.2. Raman spectra

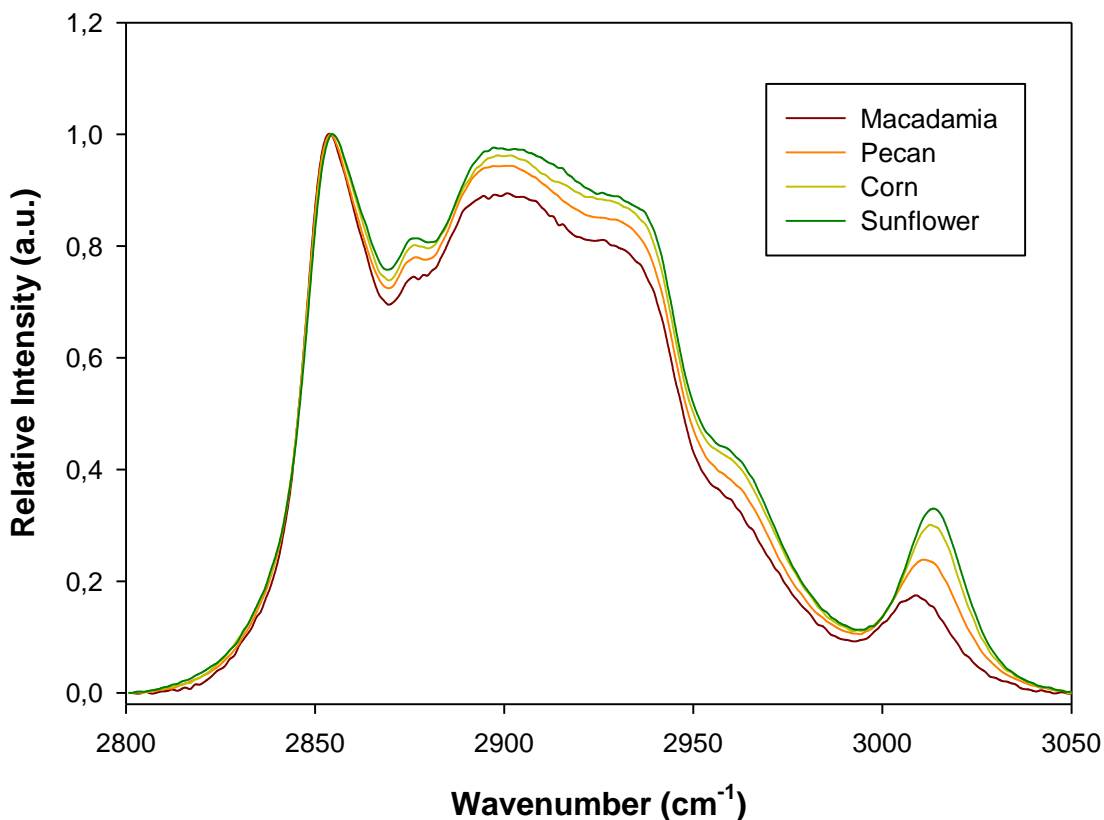
The Raman spectra for vegetable oils exhibit bands of use for authentication purposes in the regions 800–1800 and 2800–3050 cm^{-1} only (Baeten, *et al.*, 1998). All spectra obtained in this work were recorded in these two regions. The exact assignment of Raman bands of different vegetable oils has taken some time. The signals for extra virgin olive oil, which is among the most widely studied with this technique, have been unequivocally established (El-Abassy, *et al.*, 2009; Baeten, *et al.*, 2009; Yang, and Irudayaraj, 2001). Existing assignments can be used in conjunction with fatty acid profiles to elucidate the bands for other vegetable oils (*e.g.* corn and sunflower oils) (Zhang, *et al.*, 2011; Farhad, *et al.*, 2009; Sadighi-Jorabchi; *et al.*, 1990). In this work, we assigned the Raman bands for macadamia and pecan nut oils by comparison with those of corn and sunflower oils. Also, we assessed the potential of Raman spectroscopy for determining mixtures of these oils. To this end, we examined the previous two Raman regions separately.

First region: 2800–3050 cm^{-1} . Figure 1 shows the Raman spectra for the four studied oils in this region. All exhibited four well-defined bands below 3000 cm^{-1} and centered at about 2854, 2897, 2932 and 2968 cm^{-1} , respectively. These bands are typical of stretching vibrations of C–H bonds, $\nu_{\text{C-H}}$, in methyl (CH_3) and methylene (CH_2) groups. These groups are the most abundant in the hydrocarbon chains of fatty acids present in vegetable oils. An additional signal, which appears at a shoulder, at about 2876 cm^{-1} was observed that was assigned to stretching vibrations in CH_2 groups bonded to an unsaturated carbon atom ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) present in unsaturated fatty acids. Bonding of an unsaturated carbon atom to a CH_2 group shifts the absorption band for the C–H bond in the methylene group (Baranska; *et al.*, 1987). A sixth signal was observed above 3000 cm^{-1} due to stretching vibrations of the C–H bond of $=\text{C}-\text{H}$ groups in fatty acid chains. According to Sadeghi-Jorabchi *et al.* (Sadighi-Jorabchi; *et al.*, 1990), the signal shifts to higher wavenumbers with increasing number of double bonds; thus, it appears at *ca.* 3006

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 2)

cm^{-1} in oleate chains and *ca.* 3013 cm^{-1} in linoleate chains. According to Li-Chan (Li-Chan, 1994) this signal can be used as a measure of unsaturation in oil.

Figure 1. Raman spectra in the $2800\text{--}3050 \text{ cm}^{-1}$ region for the studied oils.



As stated above, the intensity of the band was related to the degree of unsaturation of the oil (DU). Thus, DU can be calculated from the combined proportions of mono-unsaturated acids plus two times the proportion of di-unsaturated acids plus three times the proportion of tri-unsaturated acids, both as determined by GC. A plot of DU as a function of the relative intensity of the Raman signal was a straight line with a high correlation coefficient ($r^2 > 0.99$). The wavenumber of the absorption band increased with increasing proportion of poly-unsaturated acids. These results are shown in table 2.

Table 2. Degree of unsaturation (DU) and wavenumbers and intensity of the Raman bands for ν_{C-H} stretching vibrations of C=C–H bonds in the studied oils.

Oil	Signal (cm⁻¹)	Intensity (a.u.)	DU^a
Macadamia	3009	0.109	87.65
Pecan	3011	0.167	119.61
Corn	3013	0.229	142.71
Sunflower	3013	0.258	153.90

Second region: 800–1800 cm⁻¹. The Raman spectral region from 800 to 1800 cm⁻¹ contained a number of absorption bands including those for stretching vibrations of C=O, C=C and C–C bonds, and others corresponding to various bending vibrations of C–H bonds. Figure 2 shows the spectra for the four studied oils in this region. As can be seen, all exhibited a small band at about 1748 cm⁻¹ that was assigned to stretching vibrations of C=O bonds in glyceride esters. This relatively weak band was unaffected by the presence of unsaturated groups in the vicinity of the C=O groups, so it provided no information other than the presence of ester bonds. A very strong band was observed at 1657 cm⁻¹ that was assigned to stretching vibrations of C=C bonds in the hydrocarbon chains of fatty acids. The exact position of the signal was found to depend on the *cis-to-trans* isomer ratio of each oil and its wavenumber is known to be about 5 cm⁻¹ lower for *cis* isomers than for *trans* isomers (Bailey, and Horvat, 1972). As confirmed by the GC analyses, the presence of *trans* isomers in our oils was negligible —and, obviously, undetectable in the Raman spectra. The strength of this signal was again strongly correlated with the degree of unsaturation ($r^2 > 0.98$).

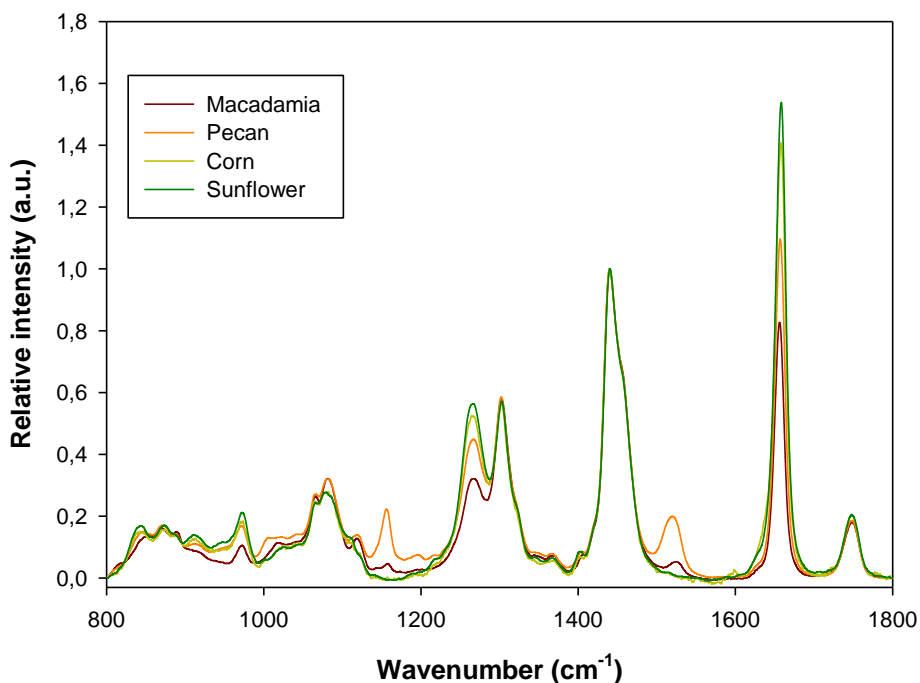


Figure 2. Raman spectra in the 800–1800 cm^{-1} region for the studied oils

A scissoring deformation band (ν_{CH_2}) for CH_2 groups in fatty acid chains was observed at about 1440 cm^{-1} . Despite its strength, this band provided no information of use towards discriminating between the oils. This was not the case with the zone from 1200 to 1400 cm^{-1} , which exhibited two strong bands assigned to in-phase methylene twisting motion and in-plane $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ deformation in an unconjugated *cis* double bond, centered at about 1303 and 1267 cm^{-1} , respectively. These bands can be used to determine the *cis/trans* ratio for oils and, in many cases, also for their authentication. As with the band at 1440 cm^{-1} , that at 1303 cm^{-1} provided no useful information towards discriminating between the four oils. The band at 1267 cm^{-1} was due to a deformation vibration of $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ bonds, so it differed between oils; thus, it exhibited the same sequence as the stretching vibrations of $=\text{C}-\text{H}$ and $\text{C}=\text{C}$ bonds.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 2)

Finally, the Raman zone from 800 to 1200 cm^{-1} was that providing the least discriminating information for our purpose. This zone contained the bands for backbone vibrations of C–C bonds and stretching vibrations of C–O bonds.

3.3. Adulteration of macadamia oil with sunflower and corn oils

Based on the above-described results, Raman spectroscopy is a powerful tool for distinguishing vegetable oils in terms of degree of unsaturation. This led us to assess its potential for detecting adulteration of a high-value oil such as that from our macadamia with considerably cheaper oils such as our sunflower or corn oil. This could in principle be accomplished by using the Raman spectral zones 2995–3050, 1600–1700 and 1200–1400 cm^{-1} to detect sunflower or corn oil added to macadamia oil. The three zones are in theory the most suitable for detecting adulteration since the correlation coefficients between band strength and degree of unsaturation are especially high (> 0.99) in them. We used samples of macadamia oil containing 5, 10, 20, 30, 40 or 50% of sunflower or corn oil in order to have an adequate number of experimental determination points for establishing accurate correlations.

Raman spectra in the 2995-3050 cm^{-1} region are shown in Figure 3 and Figure 4, for various mixtures of macadamia oil with sunflower and corn oil, in addition to those for the pure oil. This signal can be used as a measure of unsaturation in oil because it is assigned to the stretching vibrations of the C-H bonds of =C-H groups in fatty acid chains. In both cases, as can be seen from the figures, increasing the proportion of sunflower oil increased band strength through an increased degree of unsaturation in the oil mixture. The plots of band strength against degree of unsaturation or proportion of seed oil added (not shown) exhibited excellent correlation ($r^2 > 0.99$).

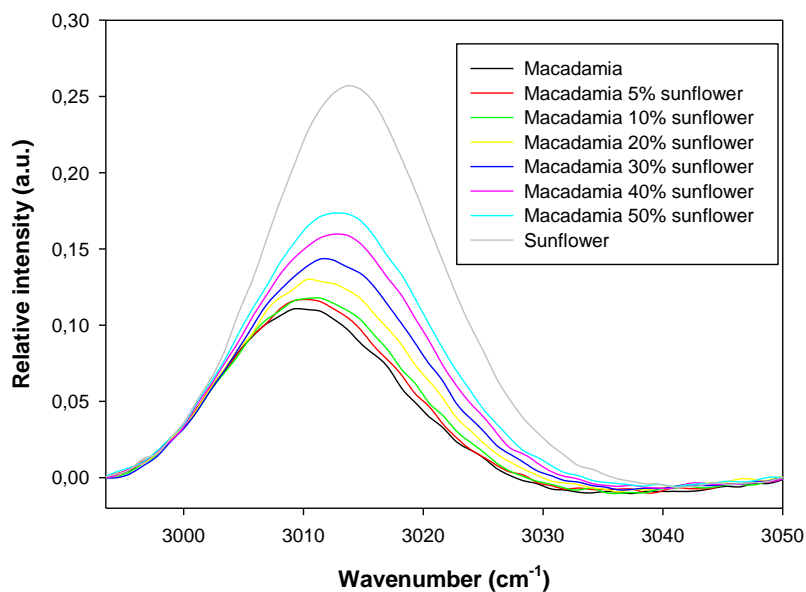


Figure 3. Raman spectra in 2990-3050 cm⁻¹ region for macadamia oil adulterated

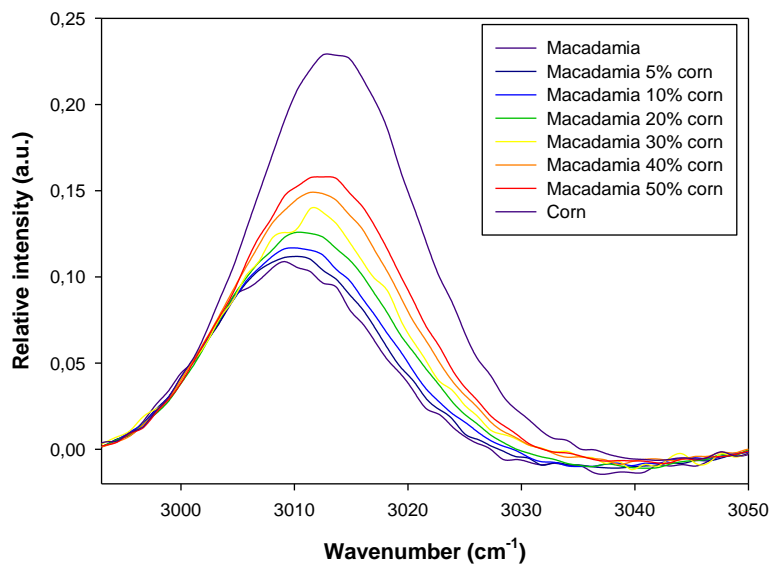


Figure 4. Raman spectra in 2990-3050 cm⁻¹ region for macadamia oil adulterated with corn oil.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 2)

Figures 5 and 6 show the Raman spectra in the 1600–1700 cm^{-1} region for various mixtures of macadamia oil with sunflower and corn oil, in addition to those for the pure oils. As noted earlier, this zone exhibited a band assigned to stretching vibrations of C=C bonds in unsaturated fatty acid chains. Again, in both cases, as can clearly be seen from the figures, increasing the proportion of corn oil (i.e. increasing the degree of unsaturation of the oil mixture) increased the strength of the absorption band. A plot (not shown) of band strength against degree of unsaturation or proportion of seed oil added exhibited excellent correlation ($r^2 > 0.99$).

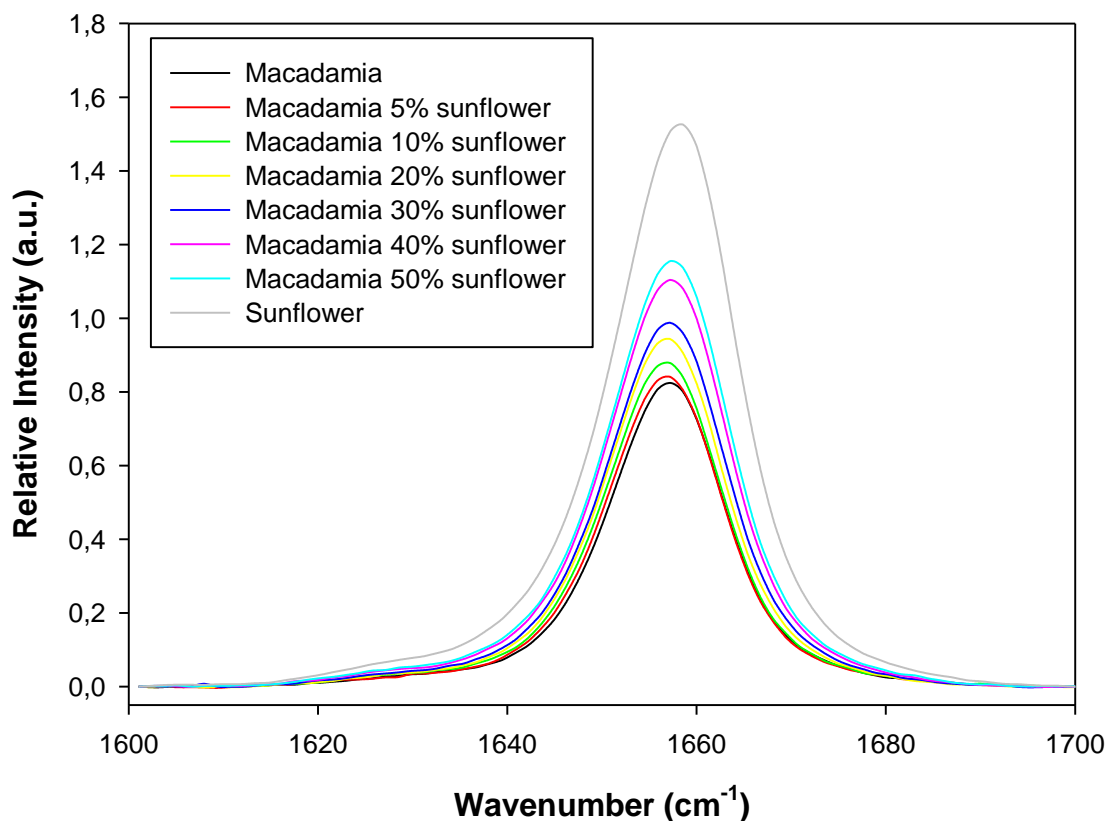


Figure 5. Raman spectra in the 1600-1700 cm^{-1} for macadamia oil adulterated with sunflower oil

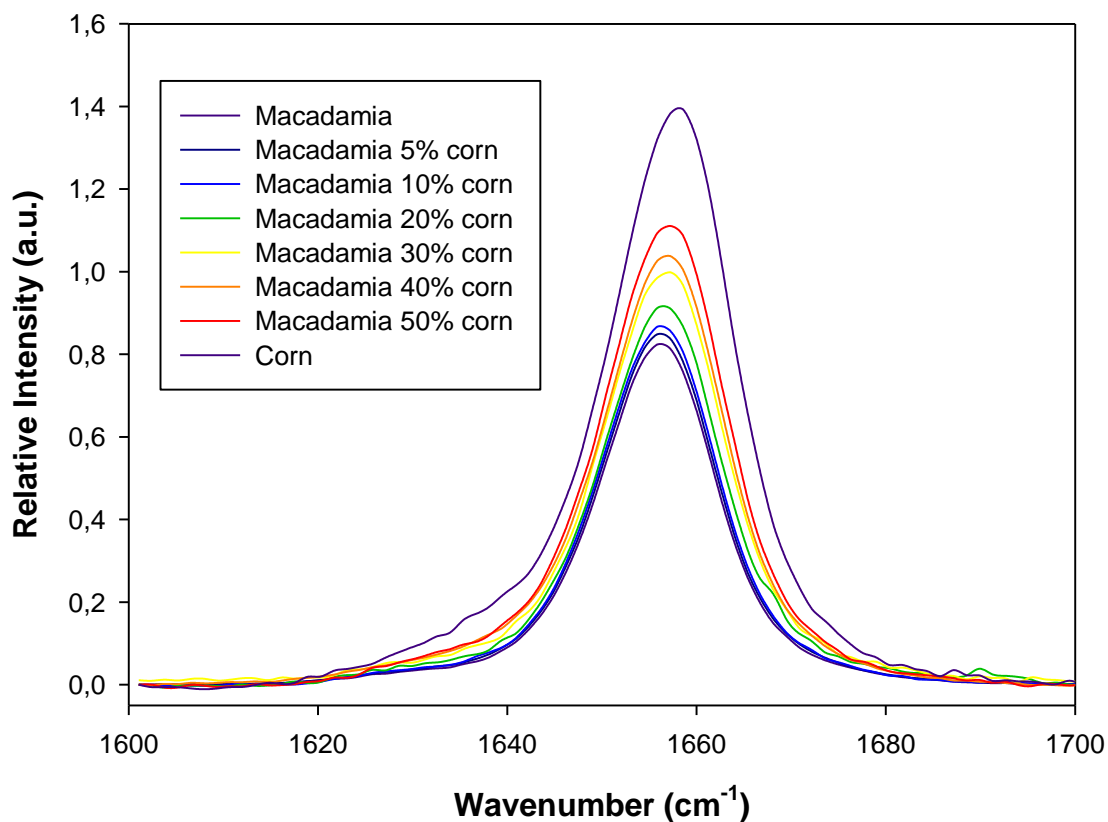


Figure 6. Raman spectra in the 1600-1700 cm^{-1} for macadamia oil adulterated with corn oil.

The 1200–1400 cm^{-1} region exhibited two strong bands one of which, at 1267 cm^{-1} , was assigned to in-plane bending of unconjugated *cis* C=C–CH bonds in unsaturated fatty acids. Figures 7 and 8 show the spectra for the mixtures of macadamia oil with sunflower and corn oil, respectively. Again, increasing the proportion of seed oil increased band strength through an increased degree of unsaturation in the oil mixture. A plot of band strength against the degree of unsaturation or proportion of seed oil exhibited excellent correlation ($r^2 > 0.99$) (not shown).

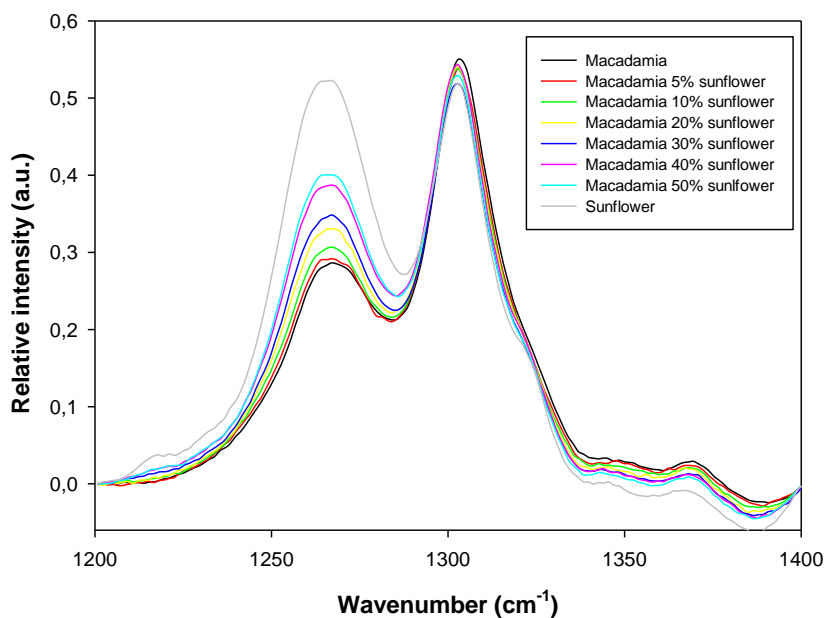


Figure 7. Raman spectra in the 1200-1400 cm⁻¹ for macadamia oil adulterated with sunflower oil.

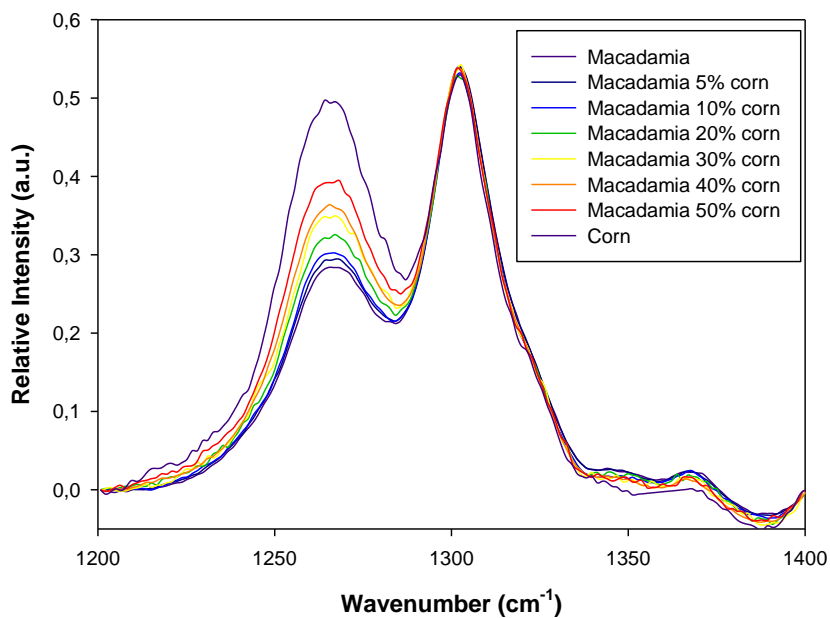


Figure 8. Raman spectra in the 1200-1400 cm⁻¹ for macadamia oil adulterated with corn oil.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 2)

The results obtained in pecan oil adulteration with sunflower and corn oils are perfectly correlated with those described for macadamia oil, which are not shown.

Therefore, in our case Raman spectroscopy affords the qualitative and quantitative detection of adulteration of macadamia oil with sunflower or corn oil.

4. CONCLUSIONS

We demonstrated that Raman spectroscopy is a valuable and useful technique for determining the degree of unsaturation of a vegetable oil. Furthermore, in the case we studied, the technique can also detect adulteration of valuable oil, such as macadamia, with cheaper ones such as corn or sunflower. A generalization of these results requires further study, including a larger amount of macadamia oils. However, for any macadamia oil that can be acquired, its degree of unsaturation will always be considerably less than that of corn or sunflower oil, so that this methodology can be applied to determine adulteration macadamia oil with others cheaper oil.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge funding of this work by Spain's Ministry of Science and Innovation, FEDER Funds, Consejería de Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía and Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación of the University of Córdoba.

REFERENCES

Aparicio R, Baeten V. 1998. Fats and oils authentication by FT-Raman. *Oleag. Corps Lipids* **5**, 293-295.

Baeten V, Fernández-Pierna, JA, Dardenne P, Meurens M, García-Gonzalez DL, Aparicio-Ruiz R. 2005. Detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by FT-Raman and FT-MIR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6201-6206.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 2)

Baeten V, Hourant P, Morales MT, Aparicio R. 1998.) Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2638-2646.

Baeten V, Meurens M, Morales MT, Aparicio R. 1996. Detection of Virgin Olive Oil Adulteration by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2225-2230.

Bailey GF, Horvat RJ. 1972. Raman spectroscopic analysis of the *cis/trans* isomer composition of edible vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **49**, 494-498.

Baranska H, Labudzinska A. 1987. *J. Laser Raman Spectroscopy: Analytical Application*. Ellis Horward, Chichester, U. K.

El-Abassy RM, Donfack P, Materny A. 2009. Visible Raman spectroscopy for the discrimination of olive oils from different vegetable oils and the detection of adulteration. *J. Raman Spec.* **40**, 1284-1289.

El-Abassy RM, Donfack P, Materay A. 2009. Rapid determination of free fatty acid in extra virgin olive oil by Raman spectroscopy and multivariate analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **86**, 507-511.

Farhad FU, Abedin KM, Islam R, Talukder AI, Haider AFMY. 2009. Determination of ratio of unsaturated to total fatty acids in edible oils by laser Raman spectroscopy. *J. Appl. Sci.* **9**, 1538-1543.

Guillén MD, Ruiz A. 2003. Edible oils: Discrimination by ^1H nuclear magnetic resonance. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 338-346.

Knothe G. 2010. Biodiesel derived from a model oil enriched in palmitoleic acid, macadamia nut oil. *Energy Fuels* **24**, 2098-2103.

Korifi R, Le Dreau Y, Molinet J, Artand J, Dupuy N. 2011. Composition and authentication of virgin olive oil from French PDO regions by chemometric treatment of Raman spectra. *J. Raman Spec.* **42**, 1540-1547.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 2)

Maguire LS, O'Sullivan SM, Galvin K, O'Connor TP, O'Brien NM. 2004. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int. J. Food Sci. Nut.* **55**, 171-178.

Li-Chan ECY. 1994. Developments in the detection of adulteration of olive oil. *Trends Food Sci. Technol.* **5**, 3-11.

Mannina L, Patumi M, Proietti N, Bassi D, Segre AL. 2001. Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high-field ^1H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2687-2696.

Muik B, Lendl B, Molina-Díaz A, Ayora-Cañada MJ. 2003. Direct, reagent-free determination of free fatty acid content in olive oil and olives by Fourier transform Raman spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **487**, 211-220.

Muik B, Lendl B, Molina-Díaz A, Ayora-Cañada MJ. 2005. Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* **134**, 173-182.

Muik B, Lendl B, Molina-Díaz A, Valcárcel M, Ayora-Cañada MJ. 2007. Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **593**, 54-67.

Paiva-Martins F, Rodrigues V, Caleheiros R, Marques MPM. 2011. Characterization of antioxidant olive oil biophenols by spectroscopic methods. *J. Agric. Food Chem.* **91**, 309-314.

Sadeghi-Jorabchi H, Hendra PJ, Wilson RH, Belton PS. 1990. Determination of the total unsaturation in oils and margarines by fourier transform raman spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, 483-486.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 2)

Shaw AD, Di Camillo A, Vlahov G, Jones A, Bianchi G, Rowland J, Kell DB. 1997. Discrimination of the variety and region of origin of extra virgin olive oil using ^{13}C NMR and multivariate calibration with variable reduction. *Anal. Chim. Acta* **348**, 357-374.

Yang H, Irudayaraj J. 2001. Comparison of near-infrared, Fourier transform-infrared, and Fourier transform-Raman methods for determining olive pomace oil adulteration in extra virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**, 889-895.

Zamora R, Gómez G, Hidalgo FJ. 2002. Classification of vegetable oils by high-resolution ^{13}C NMR spectroscopy using chromatographically obtained oil fractions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79**, 267-272.

Zhang XF, Zou MQ, Qi XH, Liu F, Zhang C, Yin F. 2011. Quantitative detection of adulterated olive oil by Raman spectroscopy and chemometrics. *J. Raman Spec.* **42**, 1784-1788.

Zou MQ, Zhang XF, Qi XH, Ma HL, Dong Y, Liu CW, Guo X, Wang H. 2009. Rapid authentication of olive oil adulteration by raman spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 6001-6006.

CAPÍTULO IV:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN
(ARTÍCULO 3)

PAPER 3

Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures

María Á. Carmona, Fernando Lafont, César Jiménez-Sanchidrián, José R. Ruiz

Departamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie, Carretera Nacional IV-A, km. 396, 14071 Córdoba (SPAIN)

Keywords: Raman spectroscopy, olive oil, nut oils, oxidation, edible oils

Abbreviations: EVO (extra virgin oil), POO (pomace olive oil), ROO (refined olive oil), CO (corn oil), SO (sunflower oil), MO (macadamian oil), PO (pecan oil), WO (walnut oil), BO (brazilian nut oil)

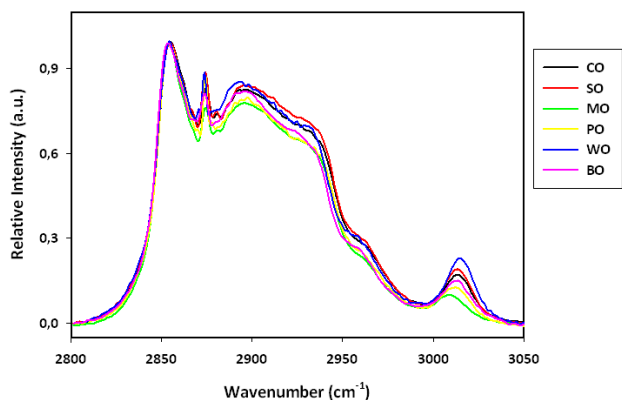
Abstract

Samples of edible oils of different degrees of unsaturation were studied by Raman spectroscopy. We demonstrate the potential of this technique for discriminating these oils. Also, the Raman spectra for the macadamia, pecan and Brazil nut oils are for the first time reported here. The fatty acid profile of each type of oil was established by gas chromatography. The analytical results obtained from the spectra were highly correlated with those provided by gas chromatography as regards the contents in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids of each oil type. Spectra were examined separately in the wavenumber zones $2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ and $800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, which were those exhibiting the greater differences between oils. Also, as shown in this work, Raman spectroscopy is an effective tool for assessing oxidation in various grades of olive oils. Based on the results, extra virgin olive oil efficiently resists oxidation in the short term by virtue of its increased antioxidant contents.

Practical applications

In this paper we show the usefulness of Raman spectroscopy to distinguish between edible oils. Similarly, the technique also allows us to discriminate between different heat treated olive oils. At the industrial level Raman spectroscopy can be a useful tool to detect adulteration related to the oxidation of fat. Its ease of use and the absence of sample handling make it very effective for use in production systems on-line.

Graphical abstract



Raman spectroscopy allows distinguishing between oils with different unsaturation level and also allows us to discriminate between different heat treated oils.

1 Introduction

The high content of vegetable oils in essential fatty acids indispensable for appropriate development of human tissues has turned them into highly recommended ingredients for daily consumption. One of their greatest benefits is the prevention of heart diseases. Some epidemiological studies have suggested an inverse relationship between nut consumption and the incidence of such diseases [1]. The beneficial effects of these oils have been ascribed to the presence of unsaturated fatty acids [2]. Relative to seed oils, nut oils contain low levels of saturated fatty acids and high levels of unsaturated acids. This has led to an increasing acceptance among consumers.

On the other hand, the oxidation of double bonds in unsaturated fatty acids occurs mainly via radical reactions. The process affects the carbon in α with respect to the double bond and leads to the formation of allyl hydroperoxides; as a result, hydrocarbon chains retain their double bonds, which, however, can undergo positional and configurational changes. In a subsequent step, the hydroperoxides formed are further oxidized to aldehydes, ketones, carboxylic acids or epoxides.

The European Union issued EC Commission Regulation 1989/3 to impose legal limits on the degree of oxidation of extra virgin olive oil with as measured by the spectroscopically determined amount of dienes and trienes it contains (specifically, by the absorbance at 232 and 270 nm, which constitute parameters K_{232} and K_{270} , and must not exceed 2.50 and 0.22, respectively). Absorbance values above these thresholds prevent olive oil from being classified as extra virgin. However, the official method for determining the peroxide number involves measuring the concentration of peroxide groups ($-\text{OO}\cdot$) in an oil in two steps. First, peroxide groups are reacted with excess iodide ion (I^-) to form iodine (I_2) which is then titrated with a standard solution of sodium thiosulphate in the second step. The “degree of unsaturation” of an oil is measured as the “iodine number”, which is the amount, in grams, taken up by 100 g of the oil. That amount is a measure of unsaturation in oil.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

These chemical methods have lately been supplemented with spectroscopic methods that measure not only the degree of oxidation, but also a number of additional parameters in oil. For example, a number of instrumental techniques have been used to discriminate between different types of vegetable oils or different samples of the same type. Specially suitable for this purpose are ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopies [3-5]. However, the use of Raman spectroscopy for this purpose has grown dramatically in recent years, especially for the quantitative detection of adulteration of extra virgin olive oil with other, cheaper edible oils [6-9], its authentication [10-13] or even the determination of some chemical species such as antioxidants [14] and free fatty acids [15,16] present not only in olive oil, but also in other vegetable oils. In addition, Raman spectroscopy has been used to assess stability against oxidation in olive oil [17,18]. The only olive oil examined in the previous studies was extra virgin oil, which, however, is the least widely used owing to its high price. This led us to use Raman spectroscopy in this work to assess the stability against thermal oxidation of different types of commercial olive oils sold in the European Union, which are the most suitable for frying on account of their increased stability and their impregnating foods less markedly than seed oils. Also, in this work, we used Raman spectroscopy for the first time to characterize macadamia, pecan and Brazilian nut oils.

2 Materials and methods

All reagents used to establish the fatty acid profiles of the oils were commercially available products. The oils studied (four extra virgin olive (EVO-1, EVO-2, EVO-3 and EVO-4), a pomace olive (POO), a refined olive ROO), a corn (CO), a sunflower (SO), a macadamian (MO), a pecan (PO), a walnut (WO) and a brazilian nut (BO) oils) were supplied by the Laboratorio Agroalimentario de la Junta de Andalucía (Córdoba, Spain).

The fatty acid analysis was carried out by methylation of the same prior and subsequent determination by gas chromatography with FID detector on a Perkin Elmer Mod. Clarus-500, using a BPX70 capillary column (60 m x 0.25 mm i. d.) Samples were prepared as follows: threaded tube were weighed 0.15 g of oil, previously purified, with an

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

accuracy of 0.01 g and dissolved in 2 mL of hexane. Then added to this solution, 0.2 mL of methanolic 2N potassium hydroxide solution and stirred intensively for 1 minute. It is left to decant the upper phase of hexane containing the fatty acid methyl esters for 30 min, taking an aliquot of the same of 1 ml for injection into GC. Identification of fatty acid methyl esters was carried out by retention times and quantification was performed as % area.

The Raman spectra for the oil samples were acquired with a Renishaw Raman instrument (InVia Raman Microscope), equipped with a Leica DM2500 M microscope furnished with various lenses (5x, 20x, 50x and 100x), monochromators and filters, and a CCD. Spectra were obtained using a 20x magnification objective and by excitation with green laser light (532 nm) over the wavenumber range 800-1800 cm^{-1} and 2800-3050 cm^{-1} . A total of 32 scans per spectrum were performed in order to improve the signal-to-noise ratio. The liquid samples were placed in the Raman microscope on a Petri dish. Each spectrum was automatically smoothed and baseline corrected using the functions of the spectrometer software Wire 3.3. The normalization of the spectra was performed using the PeakFit v4.11 software.

3 Results

Fatty acid (FA) composition is an important parameter for the evaluation of edible oils. It is also used to assure their authenticity and detect frauds [12,13,19]. Table 1 shows the major fatty acids present in the oils studied in this work. For olive oils, palmitic, stearic and oleic and linoleic acids were found to be the major fatty acids. In the other oils, linoleic and oleic acids are the more abundant.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

Table 1. Fatty acid composition of oil samples.

Oil	Major fatty acids				
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
EVO-1	11.2	2.4	78.4	5.5	0.6
EVO-2	11.3	3.2	78.0	5.0	0.7
EVO-3	10.6	3.1	75.2	8.6	0.6
EVO-4	9.4	3.0	82.6	3.7	0.5
POO	9.6	3.7	77.3	6.9	0.7
ROO	10.7	3.4	72.7	6.0	0.5
CO	10.8	2.1	30.8	54.3	0.9
SO	6.2	4.4	23.9	64.8	0.1
MO	8.5	3.7	60.4	2.8	0.3
PO	6.3	2.6	62.9	26.4	1.2
WO	6.9	2.1	21.1	58.1	11.4
BO	13.6	9.5	30.7	45.3	0.1

The Raman spectrum for a vegetable oil typically contains useful bands for its characterization in the regions 800-1800 and 2800-3050 cm^{-1} [19]. This led us to acquire the spectra for the studied oils in these two regions. The exact assignment of Raman bands

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

of different vegetable oils has taken some time. The signals for extra virgin olive oil, which is among the most widely studied with this technique, have been unequivocally established [15,19]. Existing assignments can be used in conjunction with fatty acid profiles to elucidate the bands for other vegetable oils [6,20,21].

Figures 1, 2, 3 and 4 show the Raman spectra for the thirteen oils studied in 2800-3050 and 800-1800 regions, respectively.

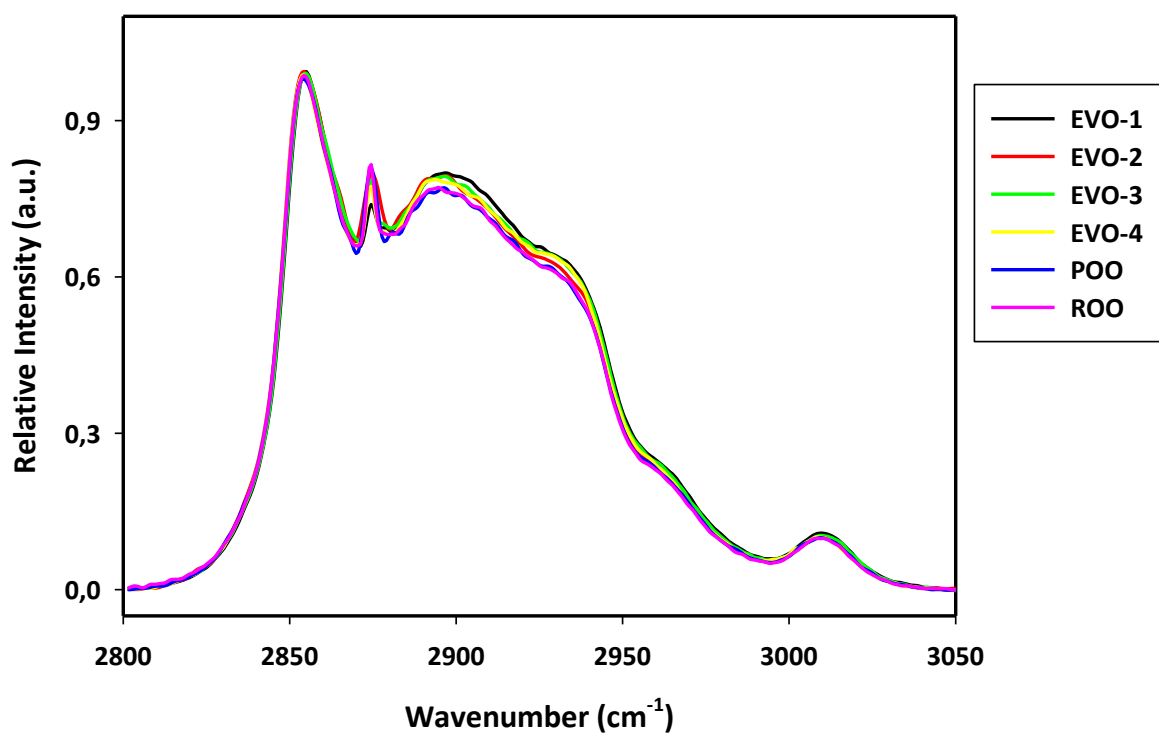


Figure 1. Raman spectra in the 2800-3050 cm⁻¹ region for the studied olive oils

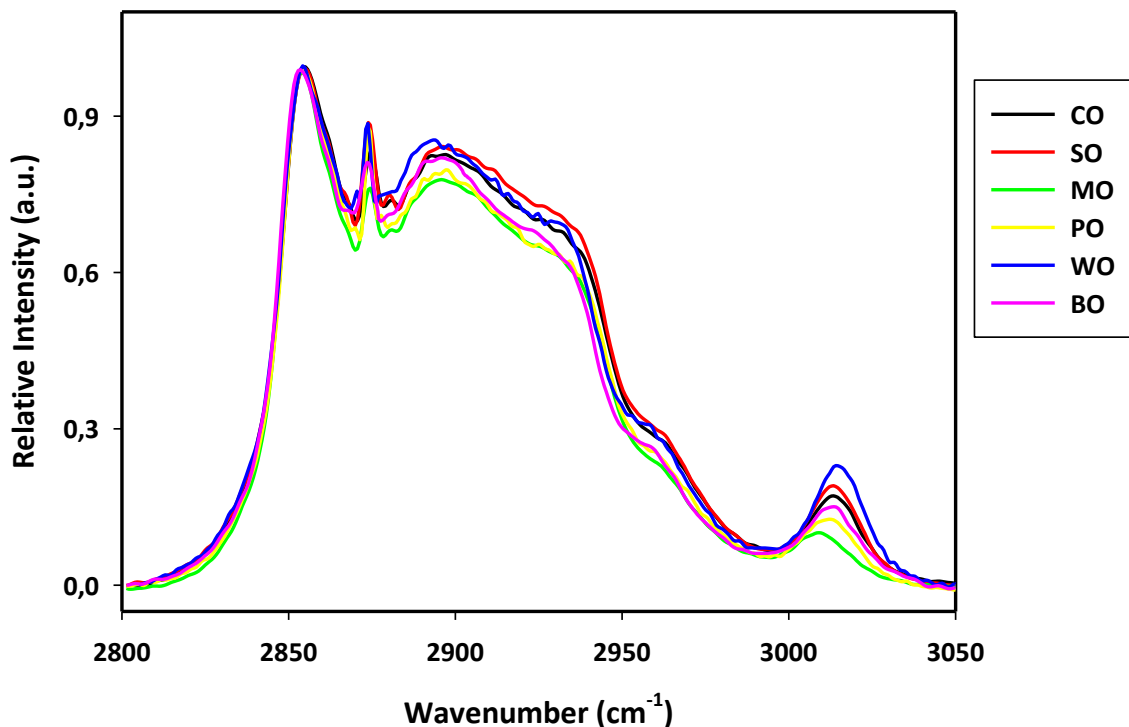


Figure 2. Raman spectra in the 2800-3050 cm⁻¹ region for the studied non-olive oils.

4 Discussion

Table 1 shows the results of the (FA) chromatographic analyses conducted on the thirteen types of oil. The FA composition is the first characteristic used for determining the purity of oil. The principal variation in FA composition of oils is the length and degree of unsaturation (also shown in table 1). In fact, olive oils contain a high amount of oleic acid, a low level of linoleic acid and a very level of linolenic acid. The other oils exhibit considerably high linolenic acid contents for beyond the values encountered in the olive oils.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

The Raman spectra for a vegetable oil typically contains useful bands for its characterization in the regions 800–1800 and 2800–3050 cm^{-1} [19]. This led us to acquire the spectra for the studied oils in these two regions. Since the fatty acids in vegetable oils vary little in composition, but markedly in proportion, the Raman bands for a vegetable oil can in principle be assigned like those for extra virgin olive oils, the Raman spectra for which have been unambiguously characterized in a wide variety of samples [19,22]. Using the Raman spectra and fatty acid profiles allowed us to assign for the first time the absorption bands for the oils not previously studied in this respect. The assignation was facilitated by examining the two above-mentioned spectral regions separately.

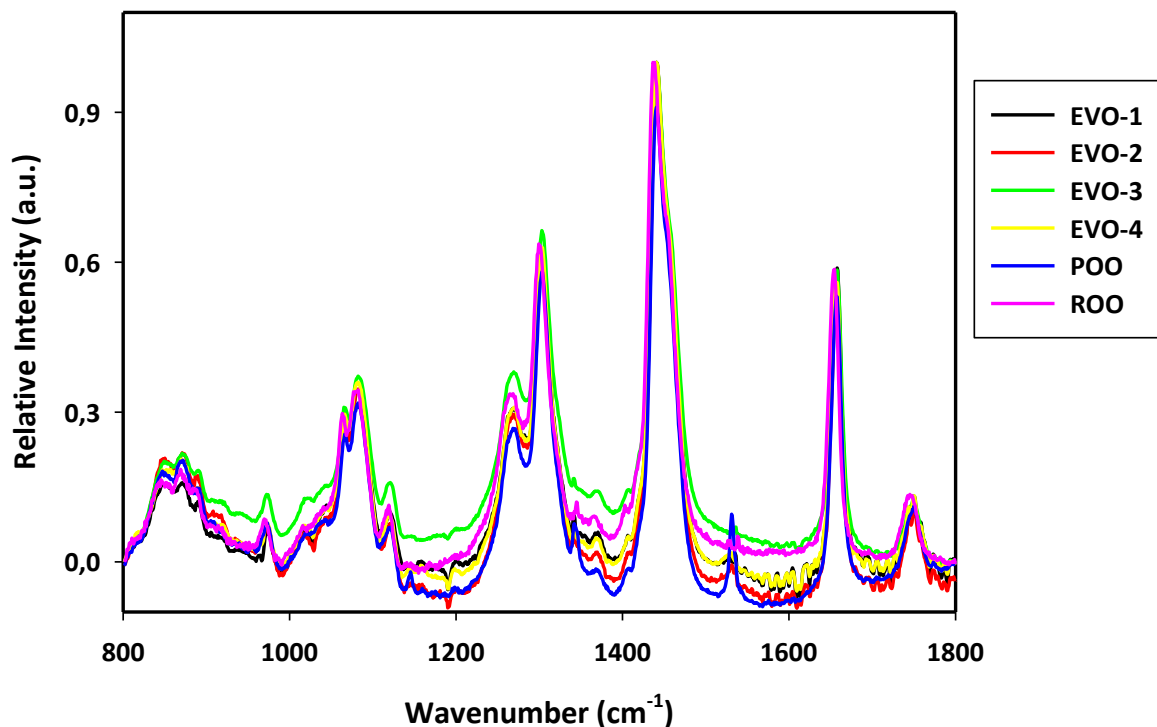


Figure 3. Raman spectra in the 800-1800 cm^{-1} region for the studied olive oils

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

2800-3050 cm^{-1} region. Figures 1 and 2 show the Raman spectra for the oils in the 2800–3050 cm^{-1} region. All twelve oils exhibited four well-defined bands below 3000 cm^{-1} centered at approximately 2855, 2894, 2932 and 2969 cm^{-1} . These bands are typical of C–H stretching vibrations ($\nu_{\text{C-H}}$) in methyl ($-\text{CH}_3$) and methylene ($-\text{CH}_2-$) groups. These two groups are the most abundant in the hydrocarbon chains of fatty acids in vegetable oils. A fifth signal was also observed at *ca.* 2874 cm^{-1} that was assigned to stretching vibrations in CH_2 groups bonded to an unsaturated carbon atom ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) present in unsaturated fatty acid chains. Bonding of an unsaturated carbon atom to a methylene group shifts the absorption band for the C–H stretching vibration in the group. There was an additional, sixth band above 3000 cm^{-1} corresponding to C–H stretching vibrations of C=C–H groups in unsaturated fatty acid chains. According to Sadeghi-Jorabchi *et al.* [20], this signal is shifted to increasing wavenumbers with increasing number of double bonds; thus, it occurs at *ca.* at 3006 cm^{-1} in oleic chains and 3013 cm^{-1} in linoleic chains. Also, Li-Chan [23] has proposed using this signal as a measure of unsaturation in oils.

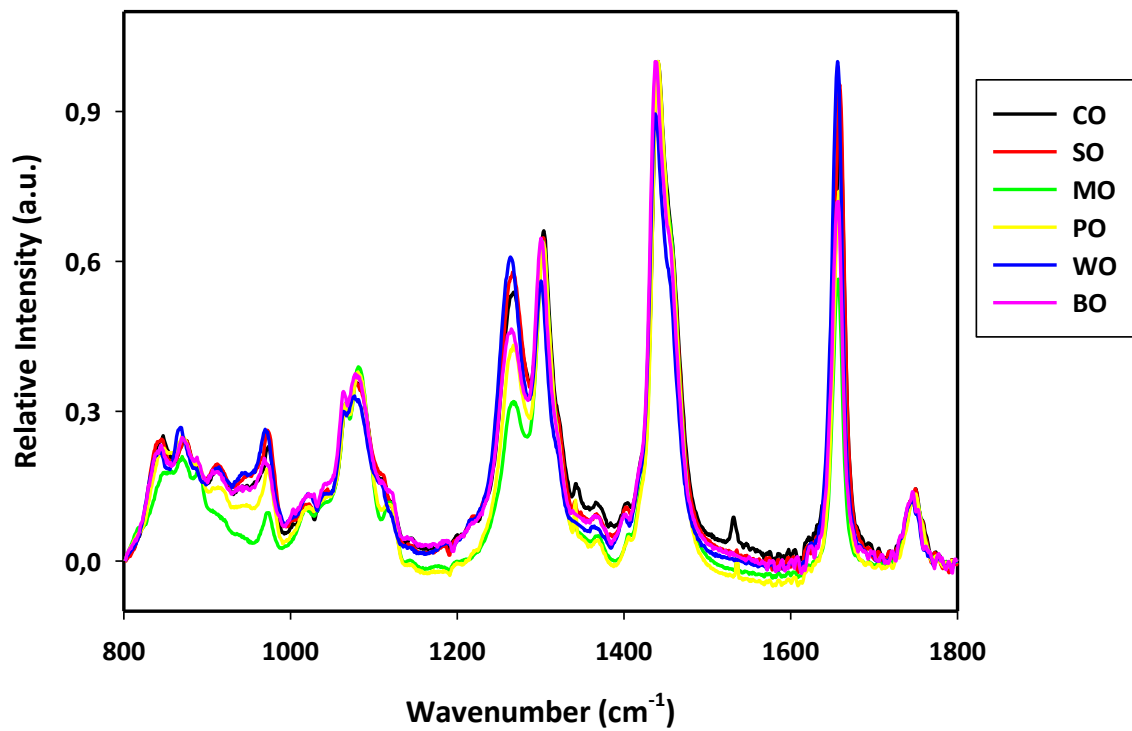


Figure 4. Raman spectra in the 800-1800 cm⁻¹ region for the studied non-olive oils.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

Table 2 shows the exact wavenumbers of the bands for the C=C–H stretching signal. As stated above, the results allowed us to correlate signal intensity with degree of unsaturation and iodine value. The degree of unsaturation (DU) of each oil was estimated from the combined proportion of monounsaturated acids plus twice the proportion of bi-unsaturated acids and three times that of tri-unsaturated acids, all as determined by GC and the iodine values were experimentally determined by the Hanus method. In this way, a plot of DU versus relative intensity of the Raman signal (Figure 3, line in black) was a straight line with a very high correlation coefficient ($r^2 > 0.98$). Likewise, an excellent correlation is obtained by representing the iodine value versus relative intensity of the Raman signal (Figure 5, line in red). Therefore, this technique provides a good method to determine the level of unsaturation of a vegetable oil. In the representation we can see how all olive oils are in the same area, along with macadamia. The latter, although in the table 1 shows that the oleic acid content is 60.4% also has a significant quantity of palmitoleic

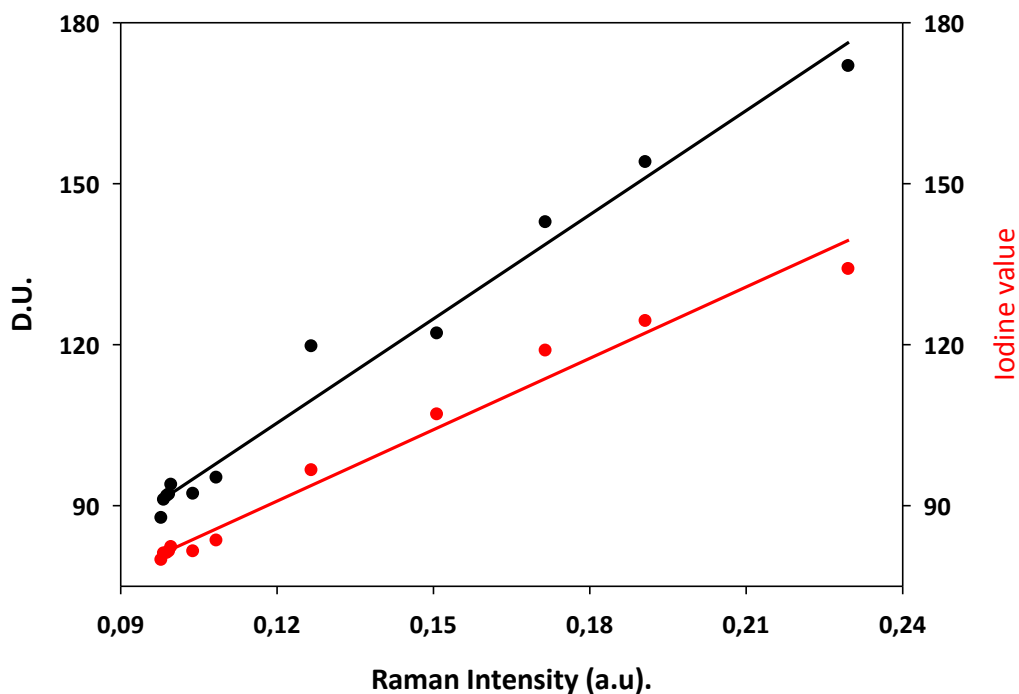


Figure 5. Plots of DU and iodine value versus relative intensity of the Raman signal corresponding to C=C–H stretching signal .

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

acid, 18.3%, which makes the degree of unsaturation is close to that of oil olive. On the other hand, the wavenumber of the absorption bands increased with increasing proportion of polyunsaturated fatty acids, but the increase was not proportional to the degree of unsaturation.

Table 2. Wavenumber and intensities of the Raman signals for ν_{C-H} stretching vibrations for C=C-H bonds and degree of unsaturation and iodine value of the studied oils.

Oil	Signal (cm^{-1})	Intensity (a.u.)	Degree of unsaturation	Iodine value
EVO-1	3009.2	0.1040	92.1	81.4
EVO-2	3008.4	0.0984	91.0	81.0
EVO-3	3009.6	0.1085	95.1	83.4
EVO-4	3009.4	0.0990	91.7	81.1
POO	3009.6	0.0998	93.8	82.2
ROO	3008.7	0.0994	92.0	81.4
CO	3013.4	0.1716	142.7	118.8
SO	3013.6	0.1908	153.9	124.3
MO	3008.8	0.0979	87.6	79.8
PO	3012.2	0.1267	119.6	96.5
WO	3014.1	0.2297	171.8	134.0
BO	3013.2	0.1508	122.0	106.9

800-1800 cm^{-1} region. The Raman spectral region from 800 to 1800 cm^{-1} contained a number of bands (particularly those for stretching vibrations of C=O, C=C and C-C bonds, in addition to others for bending vibrations in C-H bonds). Figures 3 and 4 show the spectra for the oils in this zone. As can be seen, all exhibited a small band centered at

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

about 1750 cm^{-1} that was assigned to stretching vibrations of C=O bonds in glyceryl esters. This relatively weak band was unaffected by the presence of unsaturated groups in the vicinity of the C=O bond, so it was essentially similar for all oils and provided no discriminating information. There was, however, a very strong band centered at about 1658 cm^{-1} that was assigned to stretching vibrations of C=C bonds in fatty acid hydrocarbon chains. The exact position of this signal depends on the *cis/trans* ratio of the isomers present in the oil, and is roughly 5 cm^{-1} smaller for the *cis* isomer [24]. The presence of *trans* isomers in our oils was negligible (determined by GC) and obviously undetectable in the Raman spectra. There were, however, differences in band intensity between the oils and again, the intensity was highly correlated ($r^2 > 0.98$) with the degree of unsaturation and the iodine value.

There was a band at *ca.* 1440 cm^{-1} due to scissoring deformation vibrations (δ_{CH_2}) of CH_2 groups in fatty acid chains. Despite its high intensity, this band was useless to discriminate the oils. By contrast, the zone from 1200 to 1400 cm^{-1} contained two strong bands: one at *ca.* 1265 cm^{-1} corresponding to in-phase methylene twisting and the other at *ca.* 1300 cm^{-1} due to in-plane C=C-H deformation, both in an unconjugated *cis* double bond. This spectral zone can be used to determine the *cis/trans* ratio in refined or otherwise processed oils and hence to authenticate them. As with the band at 1440 cm^{-1} , that at 1300 cm^{-1} was uninformative as regards discriminating between the four oils. On the other hand, the band at 1265 cm^{-1} , by virtue of its corresponding to deformation vibrations in C=C-H bonds, differed between the types of oil and in the same sequence as the =C-H and C=C stretching vibrations.

Finally, the zone from 800 to 1200 cm^{-1} , which contained the backbone vibration bands for C-C bonds and stretching vibration bands for C-O bonds, was that providing the least useful information towards distinguishing the four oils.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

Oxidation of olive oils in frying conditions. The second part of the study in this paper is devoted to the behavior in the oxidation of olive oil when heated to 190 °C for 2 and 5 h, trying to simulate the conditions employed in its use as a cooking oil. Of all the oils characterized previously have only selected olive oils, as has already been shown by other authors that these are the most stable to oxidation due to the high presence of antioxidants and low amount of polyunsaturated acids [17,25,26]. Moreover, in the oxidation studies described in the literature we have found none to evaluate the behavior of different commercial grades of olive oil in the typical conditions used for frying. As noted in the Introduction, heating a vegetable oil in the presence of oxygen triggers a series of radical reactions that oxidize the carbon in α with respect to the double bonds in fatty acids and then alter the positions and configurations of these bonds. As shown by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy [25], heating an oil at 190 °C for a short time (0–2.75h) reduces the intensity of the resonance signals for methylene protons in α with respect to double bonds and those for olefin protons in unsaturated groups by effect of the disappearance of some such protons through degradation of fatty acids in oils. Therefore, the Raman zones affected by heating of the oil should be those involving the bonds bearing such protons, which appear at approximately 2874 cm^{-1} (C–H stretching vibrations in methylene groups bonded to CH=CH groups), 3010 cm^{-1} (asymmetric stretching of C–H bonds in C=C–H groups) and 1267 cm^{-1} (in-phase C=C–H deformation in an unconjugated *cis* double bond). The difficulty of normalizing the signal at 2874 cm^{-1} led us to monitor the vibrations at 3010 and 1267 cm^{-1} . As can be seen from Figure 6, the oil type least affected by heating at 190 °C for 2 h was extra virgin olive oil; this was a result of its increased contents in carotenoids [27] and antioxidants such as tocopherols. These compounds were present in smaller amounts in the other oils, which were thus oxidized more rapidly. Also, based on its fatty acid composition (Table 1), pomace oil was that containing the largest amount of linoleic acid, followed by refined oil and extra virgin oil; consequently, the intensity of the spectral signals decreased in the sequence pomace oil > refined oil > extra virgin oil as illustrated by the signal at 3008 cm^{-1} .

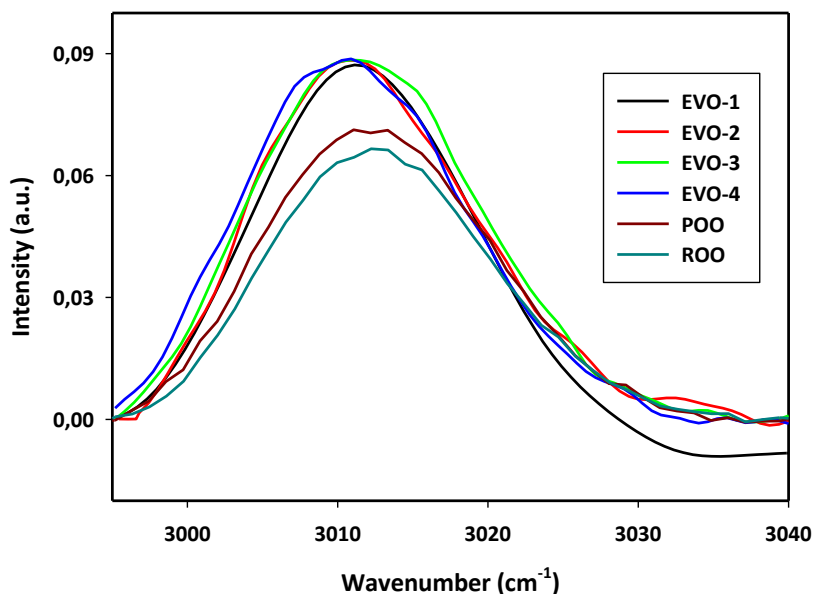


Figure 6. Raman spectra for the oils in the region 2995-3040 cm⁻¹ after heating at 190 °C for 2 h.

When the heating was continued for 5 h, the differences become more pronounced, with extra virgin oils least affected, followed by refined oil and the pomace oil, as shown in Figure 7.

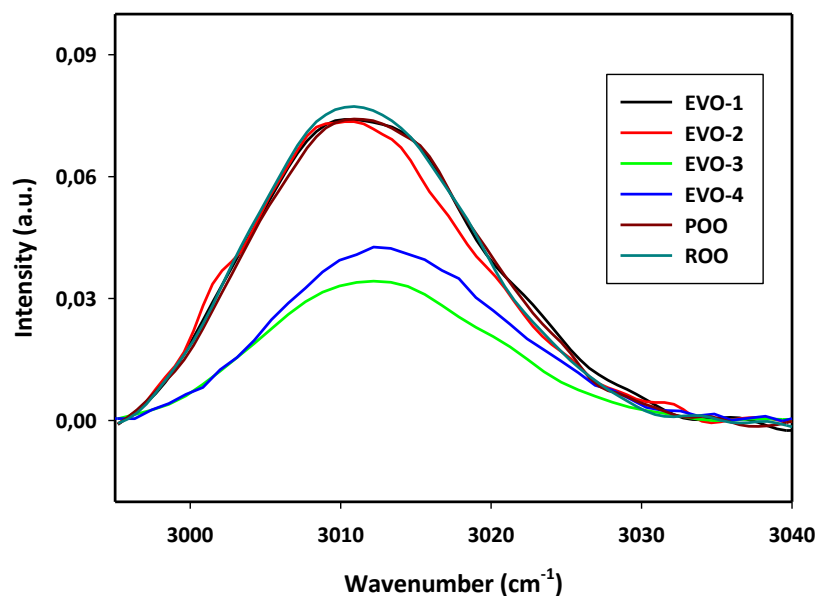


Figure 7. Raman spectra for the oils in the region 2995-3040 cm⁻¹ after heating at 190 °C for 5 h.

5 Conclusions

Raman spectroscopy is a highly suitable technique for distinguishing edible oils on the basis of the unsaturated fatty acids they contain. In fact, the position and intensity of the Raman bands for C–H stretching vibrations in unsaturated carbon atoms and stretching vibrations in C=C bonds depend on the degree of unsaturation of the hydrocarbon chains in the fatty acids. In fact, a linear correlation was found between the intensity of these signals and the degree of unsaturation and iodine values of the oils, and a similar one with the intensity of the C=C–H bending vibration band appearing at *ca.* 1258 cm⁻¹. These results can be used not only to discriminate between oil types but also to detect adulteration with fat of a different origin. Also, this technique is a useful tool for distinguishing olive oils in different grades and monitoring their oxidative decomposition by effect of heating and the presence of oxygen. In fact, the stretching and in-phase deformation vibrations of C–H bonds in C=C–H groups can be used to assess decomposition in olive oil. Also, the position and intensity of the bands are related to the presence of poly-unsaturated fatty acids. Extra virgin olive oil proved the most stable after heating at 190 °C for 5 h by virtue of its increased content in antioxidants (carotenes and tocopherols). Because the resistance to oxidation of an oil has a favorable impact on human health, extra virgin olive oil is the most healthful among those studied in this work.

The authors wish to acknowledge funding of this work by Spain's Ministry of Science and Innovation, FEDER Funds, Consejería de Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía and Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación of the University of Córdoba.

The authors have declared no conflict of interest.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

References

1. Kris-Etherton, P.M., Zhao, G., Binkoski, A.E., Coval, S.M., Etherton, R.D. (2001) The effects of nuts on coronary heart disease risk. *Nutr. Rev.* 2001, 59,103-111.
2. Maguire, L.S., O'Sullivan, S.M., Galvin, K., O'Connor, T.P., O'Brien, N.M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2004, 55, 171-178.
3. Guillén, M.D. Ruiz, A. Edible oils: Discrimination by ^1H nuclear magnetic resonance. *J. Sci. Food Agric.* 2003, 83, 338-346.
4. Shaw, A.D., Di Camillo, A., Vlahov, G., Jones, A., Bianchi, G., Rowland, J., Kell, D.B. Discrimination of the variety and region of origin of extra virgin olive oil using ^{13}C NMR and multivariate calibration with variable reduction. *Anal. Chim. Acta* 1997, 348,357-374).
5. Mannina, L., Patumi, M., Proietti, N., Bassi, D., Segre, A.L. Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high-field ^1H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2687-2696.
6. Zhang, X.F., Zou, M.Q., Qi, X.H., Liu, F., Zhang, C., Yin, F. Quantitative detection of adulterated olive oil by Raman spectroscopy and chemometrics. *J. Raman Spectrosc.* 2011, 42, 1784-1788.
7. El-Abassy, R.M., Donfack, P., Materny, A. Visible Raman spectroscopy for the discrimination of olive oils from different vegetable oils and the detection of adulteration. *J. Raman Spectrosc.* 2009, 40, 1284-1289.
8. Baeten, V., Fernández-Pierna, J.A., Dardenne, P., Meurens, M., García-Gonzalez, D.L., Aparicio-Ruiz, R. Detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by FT-Raman and FT-MIR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 6201-6206.
9. Zou, M.Q., Zhang, X.F., Qi, X.H., Ma, H.L., Dong, Y., Liu, C.W., Guo, X., Wang, H. Rapid authentication of olive oil adulteration by raman spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 67, 6001-6006.
10. Korifi, R., Le Dreau, Y., Molinet, J., Artand, J., Dupuy, N. Composition and authentication of virgin olive oil from French PDO regions by chemometric treatment of Raman spectra. *J. Raman Spectrosc.* 2011, 42, 1540-1547.
11. Aparicio, R., Baeten, V. Fats and oils authentication by FT-Raman. *Oleag. Corps. Lipids* 1998, 5, 293-295.
12. Dong, W., Zhang, Y., Zhang, B., Wang, X. Rapid prediction of fatty acid composition of vegetable oil by Raman spectroscopy coupled with least squares support vector machines. *J. Raman Spectrosc.* 2013, 44, 1739-1745.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

13. Samyn, P., Van Nieuwkerke, D., Schoukens, G., Vonck, L., Stanssens, D., Van Den Abbeele, H. Quality and Statistical Classification of Brazilian Vegetable Oils Using Mid-Infrared and Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 2012, *66*, 552-565.

14. Paiva-Martins, F., Rodrigues, V., Caleheiros, R., Marques, M.P.M. Characterization of antioxidant olive oil biophenols by spectroscopic methods. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *91*, 309-314.

15. El-Abassy, R.M., Donfack, P., Materay, A. Rapid determination of free fatty acid in extra virgin olive oil by Raman spectroscopy and multivariate analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2009, *86*, 507-511.

16. Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., Ayora-Cañada, M.J. Direct, reagent-free determination of free fatty acid content in olive oil and olives by Fourier transform Raman spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2003, *487*, 211-220.

17. Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., Valcárcel, M., Ayora-Cañada, M.J. Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 2007, *593*, 54-67.

18. Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., Ayora-Cañada, M.J. Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 2005, *134*, 173-182.

19. Baeten, V., Meurens, M., Morales, M. T., Aparicio, R. Detection of virgin olive oil adulteration by Fourier Transform Raman spectroscopy. *J. Agri. Food Sci.* 1996, *44*, 2225-2230.

20. Farhad, F.U., Abedin, K.M., Islam, R., Talukder, A.I., Haider, A.F.M.Y. Determination of ratio of unsaturated to total fatty acids in edible oils by laser Raman spectroscopy. *J. Appl. Sci.* 2009, *9*, 1538-1543.

21. Sadeghi-Jorabchi, H., Hendra, P.J., Wilson, R.H., Belton, P.S. Determination of the total unsaturation in oils and margarines by fourier transform raman spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1990, *67*, 483-486.

22. Baeten, V., Hourant, P., Morales, M.T., Aparicio, R. Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 1998, *46*, 2638-2646.

23. Li-Chan, C.Y. Developments in the detection of adulteration of olive oil. *Trends Food Sci. Technol.* 1994, *5*, 3-11.

24. Bailey, G.F., Horvat, R.J. Raman spectroscopic analysis of the cis/trans isomer composition of edible vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1972, *49*, 494-498.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN (ARTÍCULO 3)

25. Guillen, M. D., Ruiz, A. Monitoring of heat-induced degradation of edible oils by proton NMR. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008, *110*, 52-60.

26. Barrera-Arellano, D., Ruiz Mendez, V., Velasco, J., Marquez-Ruiz, G., Dobarganes, C. Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *J. Sci. Food Agri.* 2002, *82*, 1696-1702.

27. Yanishlieva, N. V., Aitzetmuller, K., Ravana, V. G. β -Carotene and lipid oxidations. *Fett/Lipids* 1998, *100*, 444-462).

CAPITULO V: CONCLUSIONES

CAPITULO V: CONCLUSIONES

Las conclusiones generales que se desprenden de los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral son, analizándolas por artículo, las siguientes:

· *“Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate”*

- La reacción de esterificación de los ácidos grasos libres y la transesterificación de los acilglicéridos presentes en el DOD se da con un mayor rendimiento empleando ácido *p*-toluensulfónico como catalizador disuelto en metanol, en una concentración de 0.05M de ácido y una relación metanol/DOD (v/v) de 5.2. El tiempo y temperatura de reacción óptimos han resultado ser 1h y 65°C.

- La glicerina formada y el exceso de reactivos se eliminan fácilmente con tres lavados con agua a 40°C, teniendo una relación agua/DOD (v/v) de 1.5, 1 y 1, respectivamente.

- Aunque en un principio se contempló la eliminación de los FAMES formados por destilación a vacío (140-195°C) como una etapa previa a la cristalización de esteroides, los diferentes ensayos de aislamiento de esteroides con varios disolventes, apuntaban a que los propios FAMES constituían el disolvente con el cual, por enfriamiento, se obtenían los mejores resultados en cuanto a porcentaje de recuperación. La cristalización a -5°C y durante 24h resultaron el tiempo y temperatura óptimos.

- La purificación de esteroides por lavados con hexano condujo a la obtención de esteroides de una pureza superior al 99%.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- Por tanto, se ha desarrollado un método para el aislamiento de esteroides a partir de del DOD de girasol, cuya principal característica frente a otras alternativas, es que no requiere destilación. De forma resumida, en el método se usa metanol en presencia del ácido *p*-toluensulfónico como catalizador para convertir los ácidos grasos y los acilglicéridos del DOD en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES). La glicerina resultante y el exceso de reactivos se eliminan por lavados con agua y, finalmente, el producto se enfría en ausencia de disolventes, obteniéndose esteroides con un 92-94% de pureza.

· “Characterization of macadamia and pecan oils and detection of mixtures from other edible seed oils by Raman spectroscopy”:

- Se describe por primera vez en la bibliografía el estudio de los aceites de macadamia y pecanera por espectroscopia Raman.

- La espectroscopia Raman es una técnica útil para la comparación de aceites con distinto grado de insaturación.

- Se ha demostrado la potencialidad de la espectroscopia Raman para la detección de adulteraciones de aceite de macadamia con aceites más baratos, como son el de maíz o el de girasol. Esta aplicación puede ser extensible a la adulteración de cualquier aceite con un grado de insaturación diferente al de los utilizados para la adulteración.

· *“Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures”:*

- La espectroscopia Raman es una técnica muy apropiada para la discriminación de aceites con un contenido diferente de ácidos grasos insaturados.

-

- La posición y la intensidad de las bandas Raman de las tensiones del enlace C-H de los átomos de carbono que participan en dobles enlaces y las tensiones de los enlaces C=C dependen del grado de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos.

-

- El aceite de oliva virgen extra es el que ha mostrado mayor estabilidad tras el calentamiento a 190°C durante 5h, debido a su mayor contenido en antioxidantes.

INDICIOS DE CALIDAD

INDICIOS DE CALIDAD

Clave	Artículo
Título	<i>Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate</i>
Autores	María A. Carmona, Carlos Jiménez, César Jiménez-Sanchidrián, Fernando Peña, J. Rafael Ruiz Arrebola
Nombre de la revista	Journal of Food Engineering
Año, volumen, página	2010,101,210-213
Editorial	Elsevier
Revista incluida en Journal Citation Reports (JCR)	Sí
Indice de impacto (2010)	2.168
Categoría	Engineering, Chemical
Lugar que ocupa la revista en la categoría	23 de 134
Cuartil	Q1

Clave	Artículo
Título	<i>Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures</i>
Autores	María A. Carmona, Fernando Lafont, César Jiménez-Sanchidrián, José R. Ruiz
Nombre de la revista	European Journal of Lipid Science and Technology
Año, volumen, página	2014,116,1451-1456
Editorial	Wiley-Blackwell
Revista incluida en Journal Citation Reports (JCR)	Sí
Indice de impacto (2014)	1.812
Categoría	Food Science & Technology
Lugar que ocupa la revista en la categoría	43 de 123
Cuartil	Q2

Clave	Artículo
Título	<i>Characterization of macadamia and pecan oils and detection of mixtures with other edible seed oils by Raman spectroscopy</i>
Autores	M.A. Carmona, F. Lafont, C. Jiménez-Sanchidrián, J.R. Ruiz
Nombre de la revista	Grasas y aceites
Año, volumen, página	2015,66(3)
Editorial	CSIC
Revista incluida en Journal Citation Reports (JCR)	Sí
Indice de impacto (2014)	0.882
Categoría	Chemistry, applied
Lugar que ocupa la revista en la categoría	49 de 70
Cuartil	Q3

**OTRAS APORTACIONES
CIENTÍFICAS**

OTRAS APORTACIONES CIENTÍFICAS

PUBLICACIONES QUE NO FORMAN PARTE DE LA MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

- *“Recent Developments in Phytosterol Recovery from Oil Deodorizer Distillates”*

María Ángeles Carmona, César Jiménez-Sanchidrián and José Rafael Ruiz
Current Nutrition and Food Science, 2015, 11 (1), pp 4-10.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- *“Extracción y reducción de quinonas de matrices orgánicas” (póster)*

M. Ángeles Carmona Castellano, C. Jiménez Ot, C. Jiménez-Sanchidrián, F. Peña Luque,
J. Rafael Ruiz Arrebola

XV Simposium Científico-Técnico de EXPOLIVA ,Jaén, 2011.

- *“Empleo de la Espectroscopia Raman para el seguimiento del calentamiento oxidativo de distintos aceites” (comunicación oral).*

M. Ángeles Carmona Castellano, C. Jiménez Sanchidrián, J. Rafael Ruiz Arrebola.

Congreso Científico de Investigadores en Formación eidA3-ceiA3, Córdoba, 2011.

- *“Discriminación y determinación de mezclas de aceite de macadamia con otros aceites de semillas comestibles por espectroscopia Raman” (comunicación oral)*

M. Ángeles Carmona Castellano, C. Jiménez-Sanchidrián, J. Rafael Ruiz Arrebola.

XXIII Reunión Nacional-VII Congreso Ibérico de Espectroscopia, Córdoba, 2012.

ANEXO: PUBLICACIONES



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfoodeng

Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate

María A. Carmona^a, Carlos Jiménez^b, César Jiménez-Sanchidrián^a, Fernando Peña^b, J. Rafael Ruiz^{a,*}^a Departamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Carretera Nal. IV-A km. 396, 14071 Córdoba, Spain^b SOS Corporación Alimentaria S.A. Laboratorio Central de Análisis, Carretera Nal. IV-A Km. 388, Alcolea 14610, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2009

Received in revised form 30 June 2010

Accepted 3 July 2010

Available online 8 July 2010

Keywords:

Deodorizer distillate

DOD

Sterol

Sunflower oil

ABSTRACT

A new method for isolating sterols from sunflower oil deodorizer distillate (DOD) was developed. The most salient feature of which is that, unlike most alternatives, it requires no distillation. Briefly, the method uses methanol in the presence of *p*-toluenesulphonic acid as catalyst to convert free fatty acids and acyl glycerides in DOD into fatty acid methyl esters (FAMEs). The resulting glycerin and excess reagents are removed by washing with water and, finally, the product is cooled in the absence of solvents to obtain sterols in 92 ± 2% purity.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The phytosterol chemical family encompasses a wide variety of compounds structurally similar to cholesterol, specially prominent among which are β -sitosterol, campesterol and stigmasterol. Naturally occurring phytosterols can be found in free form and also as esters of fatty acids or glycosides. These compounds are present in various plants and plant products (particularly oils, but also legumes and dried fruits) (Fernandes and Cabral, 2007; Moreau et al., 2002; Piivonen et al., 2000). The significance of phytosterols to the food industry has grown dramatically in recent years. Their presence in adequate amounts (2–3 g/day) in human diet is known to substantially reduce cholesterol absorption by the digestive tract and its concentration in serum as a result. In fact, phytosterols are known to reduce total and LDL cholesterol levels by 10% and 15%, respectively, on average (Katon et al., 2003; Miettinen et al., 1995) without altering HDL or triglyceride concentrations. A wide variety of foods enriched with phytosterols (fat spread, yoghurt and milk) that are added during their processing is commercially available at present. The addition of phytosterols esters to foods is regulated by the European Union Regulation (EC) No. 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients.

Deodorizer distillates from edible oils constitute a major industrial source of phytosterols. Deodorization is the last step in the refining of edible oils and involves the removal of some undesirable components of natural fats and oils. The treatment is con-

ducted at 200 °C *in vacuo* for several hours. The by-product thus obtained is called “deodorizer distillate” (DOD) and consists of a complex mixture of various compound families including sterols, steryl esters, hydrocarbons, mono, di- and triglycerides, and carbonyl compounds (Winters, 1990). Sunflower oil DOD is especially interesting on account of the large amount of useful products it contains (Fizet, 1996; Pramparo et al., 2005).

The composition of deodorizer distillates varies widely as it depends on several factors including the quality of the seeds used as raw material, the mechanical processes used to extract the oil, and the physical characteristics and operating conditions of the refining plant. Typically, the average composition by weight of a deodorizer distillate is as follows: 30–35% fatty acids, 20–40% glycerols, 2–10% tocopherols, 3–15% sterols, 2–5% hydrocarbons, 3–10% non-glyceride esters and 1–12% miscellaneous substances (Muro Benayas, 2001). The composition of deodorizer distillates for sunflower oils varies widely among references, which echoes the variability in its components (Muro Benayas, 2001; Pramparo et al., 2005).

Sterols in DOD can be extracted and isolated by using various methods. Some use enzymes to hydrolyse steryl esters and fatty acids prior to distillation (Ghosh and Bhattacharyya, 1996; Watanabe et al., 2004) others are based on extraction with supercritical CO₂ (Fang et al., 2006; Glücü-Üstündag and Temelli, 2007; Vázquez et al., 2006) and still others employ classical hydrolysis, distillation and crystallization procedures (Rohr and Trujillo-Quijano, 2005). Many of these and other, less popular methods for this purpose are discussed in an excellent review (Fernandes and Cabral, 2007).

The aim of this work was to isolate sterols from sunflower oil DOD by using a new method based on transesterification of acyl

* Corresponding author. Tel.: +34 957218638; fax: +34 957212065.
E-mail address: qo1ruarj@uco.es (J.R. Ruiz).

Research Article

Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures

María Á. Carmona, Fernando Lafont, César Jiménez-Sanchidrián and José R. Ruiz

Departamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Córdoba, Spain

Samples of edible oils of different degrees of unsaturation were studied by Raman spectroscopy. We demonstrate the potential of this technique for discriminating these oils. In addition, the Raman spectra for the macadamia, pecan, and Brazil nut oils are for the first time reported here. The fatty acid profile of each type of oil was established by GC. The analytical results obtained from the spectra were highly correlated with those provided by GC as regards the contents in monounsaturated and PUFA of each oil type. Spectra were examined separately in the wavenumber zones 2800–3100 and 800–1800 cm^{-1} , which were those exhibiting the greater differences between oils. Also, as shown in this work, Raman spectroscopy is an effective tool for assessing oxidation in various grades of olive oils. Based on the results, extra virgin olive oil efficiently resists oxidation in the short term by virtue of its increased antioxidant contents.

Practical applications: In this paper we show the usefulness of Raman spectroscopy to distinguish between edible oils. Similarly, the technique also allows us to discriminate between different heat-treated olive oils. At the industrial level Raman spectroscopy can be a useful tool to detect adulteration related to the oxidation of fat. Its ease of use and the absence of sample handling make it very effective for use in production systems on-line.

Keywords: Edible oils / Nut oils / Olive oil / Oxidation / Raman spectroscopy

Received: March 13, 2014 / Revised: June 13, 2014 / Accepted: July 9, 2014

DOI: 10.1002/ejlt.201400127

1 Introduction

The high content of vegetable oils in EFA indispensable for appropriate development of human tissues has turned them into highly recommended ingredients for daily consumption. One of their greatest benefits is the prevention of heart diseases. Some epidemiological studies have suggested an inverse relationship between nut consumption and the incidence of such diseases [1]. The beneficial effects of these oils have been ascribed to the presence of unsaturated fatty acids [2]. Relative to seed oils, nut oils contain low levels of saturated fatty acids and high levels of unsaturated acids. This has led to an increasing acceptance among consumers.

On the other hand, the oxidation of double bonds in unsaturated fatty acids occurs mainly via radical reactions. The process affects the carbon in α with respect to the double bond and leads to the formation of allyl hydroperoxides; as a result, hydrocarbon chains retain their double bonds, which, however, can undergo positional and configurational changes. In a subsequent step, the hydroperoxides formed are further oxidized to aldehydes, ketones, carboxylic acids, or epoxides.

The European Union issued EC Commission Regulation 1989/3 to impose legal limits on the degree of oxidation of extra virgin olive oil with as measured by the spectroscopically determined amount of dienes and trienes it contains (specifically, by the absorbance at 232 and 270 nm, which constitute parameters K_{232} and K_{270} , and must not exceed 2.50 and 0.22, respectively). Absorbance values above these thresholds prevent olive oil from being classified as extra virgin. However, the official method for determining the peroxide number involves measuring the concentration of peroxide groups ($-\text{OO}-$) in an oil in two steps. First, peroxide groups are reacted with excess iodide ion (I^-) to form iodine (I_2), which is then titrated with a standard solution of sodium thiosulphate in the second step. The “degree of unsaturation”

Correspondence: Dr. José R. Ruiz, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie, Carretera Nacional IV-A, km. 396, 14071 Córdoba, Spain

E-mail: qp1ruarj@uco.es

Fax: +34 957212066

Abbreviations: EVO, extra virgin oil; POO, pomace olive oil; ROO, refined olive oil; CO, corn oil; SO, sunflower oil; MO, macadamian oil; PO, pecan oil; WO, walnut oil; BO, Brazilian nut oil



GRASAS Y ACEITES 66 (3)
 July–September 2015, e094
 ISSN-L: 0017-3495
 doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.1191142>

Characterization of macadamia and pecan oils and detection of mixtures with other edible seed oils by Raman spectroscopy

M.A. Carmona^a, F. Lafont^b, C. Jiménez-Sanchidrián^a and J.R. Ruiz^{a,✉}

^aDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Carretera Nal. IV A, km. 396, 14010 Córdoba (Spain)

^bServicio Central de Apoyo a la Investigación, Unidad de Espectrometría de Masas, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Ramón y Cajal, Carretera Nacional IV-A, km. 396, 14071 Córdoba (Spain)

✉Corresponding author: qo1ruarj@uco.es

Submitted: 27 November 2014; Accepted: 16 March 2015

SUMMARY: Authenticating fats and detecting their adulteration with substantially cheaper fats can pose major problems for producers of high-value oils for nutritional and cosmetic use. In this work, we used Raman spectroscopy to discriminate macadamia and pecan oils from other, cheaper vegetable oils including corn and sunflower oils. This technique additionally allows one to detect and assess the adulteration of macadamia oil with another vegetable oil.

KEYWORDS: *Adulteration of oils; Macadamia oil; Pecan oil; Raman spectroscopy*

RESUMEN: *Caracterización de aceites de macadamia y de nuez pecanera y detección de mezclas con otros aceites de semillas comestibles por espectroscopía Raman.* La autenticación de grasas para detectar su adulteración con otras grasas más baratas es uno de los principales problemas a los que se enfrentan los productores de aceites de alto valor, ya sea para uso alimentario o para uso cosmético. En este trabajo se emplea la espectroscopía Raman, por un lado, para caracterizar los aceites de macadamia y de nuez pecanera, de alto valor y diferenciarlos de otros más baratos, como los de maíz y de girasol, y por otro, para detectar mezclas del aceite de macadamia con estos aceites vegetales más baratos.

PALABRAS CLAVE: *Aceite de macadamia; Aceite de nuez pecanera; Adulteración de aceites; Espectroscopía Raman*

Citation/Cómo citar este artículo: Carmona MA, Lafont F, Jiménez-Sanchidrián C, Ruiz JR. 2015. Characterization of macadamia and pecan oils and detection of mixtures with other edible seed oils by Raman spectroscopy. *Grasas y Aceites* 66 (3): e094. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.1191142>.

Copyright: © 2015 CSIC. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial (by-nc) Spain 3.0 Licence.

1. INTRODUCTION

Fats and oils are essential ingredients of the human diet and have been widely consumed, whether directly or in processed foods, for centuries. The significance of fats and oils lies in their high energy and essential fatty acid contents; the latter are indispensable for the proper development of human tissues. Some vegetable oils contain additional substances with excellent properties for protecting human skin

which have fostered their use in medical and aesthetic treatments throughout the world since ancient times.

Macadamia oil is among the most widely used in aromatherapy. This oil is obtained from the fruit of the macadamia tree, which originated in Australia and New Zealand and comprises nine species, the most important of which are *Macadamia integrifolia* and *Macadamia tetraphylla*. All nine species are edible and major sources of fats, proteins and vitamins.

