



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias
Experimentales

Determinación de esteroides en aceites de oliva y otros aceites vegetales

Autor: Belén del Río Ortiz

Grado: Química

Fecha: 29/10/2024



CREEA



Universidad de Jaén



Trabajo Fin de Grado

Determinación de esteroides en aceites de oliva y otros aceites vegetales



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Belén del Rio Ortiz'.

Alumno/a: Belén del Rio Ortiz

Jaén, octubre, 2024

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Autenticidad de los aceites vegetales	5
1.1.1. Problemas comunes de autenticidad y legislación vigente	5
1.2. Esteroles en aceites vegetales	7
1.2.1. <i>Definición y estructura química de los esteroles</i>	7
1.2.2. <i>Distribución de esteroles en diferentes aceites vegetales</i>	11
1.2.3. <i>Efecto del reinado en la composición de esteroles</i>	12
1.3. Proceso analítico para la determinación de esteroles en aceites vegetales	13
1.3.1. <i>Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Método oficial. COI/T.20/DOC nº26</i>	13
1.3.2. <i>Alternativas al método oficial</i>	17
2. OBJETIVOS	19
3. METODOLOGIA	19
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA	23
4.1. Estudios de autenticidad de aceites de oliva virgen por su origen geográfico y/o botánico empleando esteroles	23
4.2. Estudios de autenticidad de otros aceites vegetales empleando la composición de esteroles	27
4.2.1. <i>Aceite de maíz</i>	27
4.2.2. <i>Aceite de almendra</i>	28
4.2.3. <i>Aceite de semilla de uva</i>	28
4.2.4. <i>Aceite de coco</i>	28
4.2.5. <i>Aceite de girasol</i>	28
4.2.6. <i>Aceite de linaza</i>	28
4.2.7. <i>Aceite de aguacate</i>	28
4.3. Estudios de detección de fraude y adulteraciones	29
4.3.1. <i>Adulteración de AOV con otros aceites de oliva de inferior calidad (refinado/deodorizado y de orujo)</i>	29
4.4. Adulteración de AOVE con aceites de semilla y otros aceites vegetales	30
4.4.1. <i>Aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de semilla de uva, aceite de semilla de algodón</i>	30

4.4.2.	<i>Aceite de colza</i>	32
4.4.3.	<i>Aceite de avellana</i>	34
4.4.4.	<i>Aceites de vegetales refinados</i>	35
4.5.	Otras adulteraciones de aceites vegetales.	37
4.5.1.	<i>Aceite de maíz adulterado con aceite de colza</i>	37
4.5.2.	<i>Aceite de semilla de Níger y aceite de sésamo adulterados con aceite de palma</i> ...	38
4.5.3.	<i>Aceite de linaza adulterado con aceite de colza, aceite de maní, aceite de girasol y aceite de sésamo.</i>	38
5.	CONCLUSIONES	39
6.	BIBLIOGRAFIA	41

RESUMEN/ABSTRACT

[ES] Los esteroides, compuestos derivados del escualeno mediante procesos biosintéticos, están presentes en todos los aceites vegetales. Forman parte de la fracción insaponificable y conforman la “huella dactilar” de los aceites ya que se encuentran en concentraciones diferentes en cada uno de ellos. La Unión Europea establece la concentración de esteroides como un parámetro de autenticidad en los aceites vegetales, así como las concentraciones de esteroides totales y de esterenos. La cromatografía de gases con detector de ionización (GC-FID) de llama es el método oficial para analizar estos compuestos, permitiendo determinar la autenticidad de un aceite determinado o detectar mezclas fraudulentas entre aceites de diferente calidad y/o especie. El perfil de esteroides nos permite determinar el origen geográfico de diferentes muestras de aceite, como el aceite de oliva, y detectar si ha sido adulterado. Marcadores como relación entre esteroides libres y esterificados, la concentración de estigmastadienos, el β -sitosterol, campesterol, stigmasterol y brassicasterol, entre otros, son clave para detectar fraudes en aceites vegetales. Así, los esteroides son fundamentales para garantizar la autenticidad y calidad en los aceites vegetales.

[EN] Sterols, compounds derived from squalene through biosynthetic processes, are present in all vegetable oils. They are part of the unsaponifiable fraction and form the “fingerprint” of oils, as they are found in different concentrations in each type. The European Union establishes sterol concentration as a parameter of authenticity in vegetable oils, along with total sterol and sterene concentrations. Gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) is the official method for analyzing these compounds, allowing the determination of an oil’s authenticity or the detection of fraudulent mixtures between oils of different quality and/or type. The sterol profile also enables us to determine the geographic origin of various oil samples, such as olive oil, and to detect any adulteration. Markers such as the ratio of free to esterified sterols, the concentration of stigmastadienes, and levels of β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, and brassicasterol, among others, are essential for detecting fraud in vegetable oils. Thus, sterols are fundamental in ensuring authenticity and quality in vegetable oils.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Autenticidad de los aceites vegetales

La autenticidad de los aceites vegetales es un aspecto crítico en la industria alimentaria, ya que la adulteración de estos productos puede afectar su calidad, valor nutricional y seguridad para el consumidor. La autenticidad se refiere a la conformidad del producto con lo que se declara en su etiquetado, incluyendo su composición y origen (Aparicio y Aparicio-Ruíz, 2000).

Problema	Subproblema	Paradigma
Adulteración	Adición de aceites económicos a aceites de mayor valor	Determinación de mezclas entre diferentes aceites vegetales.
	Adición de aceites refinados a aceite de oliva virgen	Detección de ROO y RPOO en AOV.
Origen geográfico	Etiqueta inexacta	Determinar origen geográfico
	Trazabilidad	Caracterización/autenticación PDO
Tipo	Especies	Caracterización de aceites vegetales.
	Variedad	Caracterización de categorías comerciales del aceite de oliva.

Tabla 1.1. Problemas comunes de autenticidad en aceites vegetales. Fuente: Aparicio y Harwood, 2013.

1.1.1. Problemas comunes de autenticidad y legislación vigente

Los criterios para definir la autenticidad de un producto alimenticio varían según el tipo de producto. Sin embargo, se ha propuesto una definición que indica que un producto es auténtico si cumple con dos condiciones: primero, que su descripción en la etiqueta sea precisa y, segundo que cumpla con las leyes del país donde se comercializa. Por tanto, un alimento auténtico proviene de una fuente específica, la cual debe estar claramente definida, como una categoría comercial del aceite de oliva, por ejemplo. Los principales problemas relacionados la autenticidad de los aceites vegetales se presentan en la tabla 1.1. La práctica más común es la mezcla de aceites de alta calidad y alto valor económico con aceites más económicos, como por ejemplo la adulteración de aceite de oliva virgen extra con aceite de orujo de oliva o con aceites vegetales de diferente especie (girasol, soja, etc.). Otro problema frecuente es el

engaño sobre el origen geográfico, falsificación de la indicación Geográfica Protegida (IGP) y la Denominación de Origen Protegida (DOP) (Aparicio y Harwood, 2013).

En el contexto de la producción y el comercio internacional de aceites vegetales comestibles, existen tres organismos reguladores principales: la Unión Europea (UE), la comisión del Codex Alimentarius y específicamente para el aceite de oliva y aceite de orujo de oliva, el Consejo Oleícola Internacional (COI). La UE aplica regulaciones propias que son de cumplimiento obligatorio únicamente dentro de los países miembros. La Comisión del Codex Alimentarius establece un marco normativo internacional compartido por un gran número de países, aunque el cumplimiento de sus estándares es voluntario con una referencia global para garantizar la calidad y seguridad alimentaria en el comercio internacional. El COI, por su parte, se dedica exclusivamente a la regulación del aceite de oliva y del aceite de orujo de oliva, es de cumplimiento voluntario, aunque muchos de los métodos de análisis propuestos por el COI han sido adoptados tanto por la Unión Europea como por el Codex Alimentarius como métodos oficiales de análisis (Aparicio y Harwood, 2013).

Respecto a los aceites de oliva y de orujo de oliva, el *Reglamento (UE) 2022/2104* establece las diferentes categorías comerciales y los requisitos de pureza y calidad que deben cumplir todos los aceites de oliva en la Unión Europea. Establece el contenido total de esteroides, el contenido de esteroides específicos y el contenido de estigmastadienos (derivados de los esteroides) como parámetros analíticos de pureza, con el fin de evaluar la autenticidad de los aceites. Para que un aceite de oliva sea genuino y apto para su comercialización el contenido del β -sitosterol aparente (β -sitosterol + Δ^5 -avenasterol + $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol + sitostanol + clerosterol+ $\Delta^{5,24}$ -, estigmastadineol) debe ser mayor o igual a 93.0% del total de esteroides. El contenido de brassicasterol debe ser menor o igual al 0.2% del total de esteroides en el caso del aceite de orujo de oliva y menor o igual al 0.1% para las demás categorías. El campesterol debe ser menor o igual al 4.0% y el estigmasterol debe ser menor que el campesterol. Para la determinación de los esteroides totales y específicos establece como método oficial el *COI/T.20/DOC N°26* y para la determinación de estigmastadienos el *COI/T.20/Doc. N.º 11* ambos propuesto por el Consejo Oleícola Internacional (COI). Los límites impuestos por el *Reglamento (UE) 2022/2104*, coinciden con los de la norma CXS 33-1981 del Codex Alimentarius. (Codex Alimentarius, 1981; International Olive Council, 2020; International Olive Council,

2017; Unión Europea, 2022).

Respecto a los demás aceites vegetales comestibles, la UE no establece límites en la composición de esteroides, pero podemos adoptar los propuestos por el Codex Alimentarius en la norma CXS 210-1999 para aceites vegetales específicos, en la cual especifica la concentración de esteroides característica de cada aceite vegetal y recomienda seguir el método propuesto en ISO 6799:1991 (Codex Alimentarius, 1999).

1.2. Esteroides en aceites vegetales

1.2.1. Definición y estructura química de los esteroides

Los esteroides son una subclase de los esteroides, derivados del triterpeno escualeno mediante procesos biosintéticos. Su estructura básica consta de un núcleo esteroide (ciclopentanoperhidrofenantreno), compuesto por cuatro anillos fusionados, denominados A, B, C, y D. Este núcleo se complementa con una cadena lateral alquílica en el carbono 17 (ubicada en el anillo D) y un grupo hidroxilo (-OH) unido al carbono 3 del anillo A, como se muestra en la figura 1.2 (Pérez-Castaño et al., 2013).

Dentro del núcleo esteroide, el anillo A es el único que contiene un grupo funcional clave: el grupo hidroxilo en el carbono C-3, responsable de la interacción de los esteroides con las membranas celulares lo que contribuye a su naturaleza anfipática. Los anillos B y C son ciclohexanos fusionados, mientras que el anillo D es un ciclopentano. La fusión rígida de estos anillos confiere una estructura tridimensional plana y poco flexible. La cadena lateral alquílica en el carbono C-17 del anillo D es lo que diferencia a los diversos esteroides. A diferencia del colesterol de origen animal, los fitoesteroides contienen grupos metilo o etilo en el carbono C-24 de dicha cadena (Aparicio y Aparicio-Ruiz, 2000; Pérez-Castaño et al., 2013).

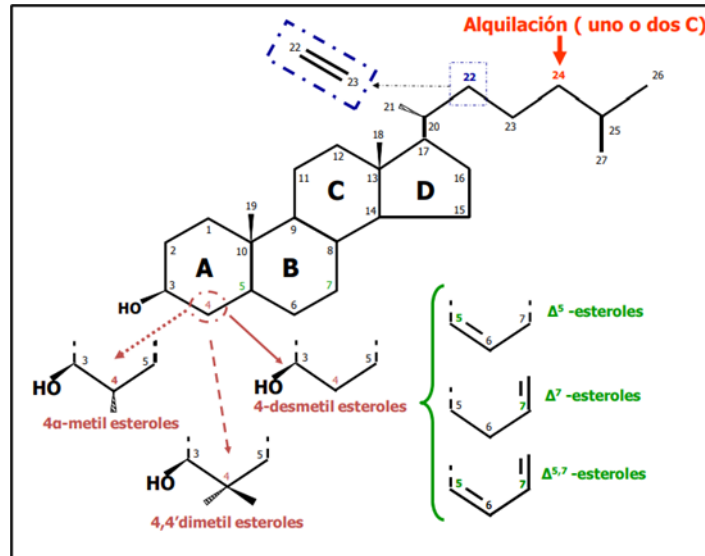


Figura 1.1 Esquema de la estructura básica de los esteroides, carbonos numerados de acuerdo con la nomenclatura IUPAC 1989. Adaptado de Pérez-Castaño et al., 2013.

Dentro de los esteroides vegetales se incluyen dos tipos: los esteroides y los estanoles, ambos comparten una estructura química similar, con la diferencia de que los estanoles carecen del doble enlace entre los carbonos C-5 y C-6 del anillo B. En lugar de esta insaturación, los estanoles están completamente saturados en esta posición, lo que significa que los enlaces son todos simples. Los estanoles se encuentran en una proporción muy baja en los aceites vegetales por lo que el término “esteroides” se utiliza comúnmente para referirse tanto a esteroides y estanoles (Meco-López et al., 2016).

La cantidad de grupos metilo presentes en el cuarto carbono (dos, uno o ninguno) es la característica distintiva más importante de los esteroides. En función de esta característica, los EV se pueden clasificar en tres categorías:

4-desmetilesteroides (sin grupo metilo): Este es el grupo más abundante en los aceites vegetales. Dentro de esta categoría, y en función a la posición y número de dobles enlaces en el anillo B, se subdividen en Δ^5 -esteroides, Δ^7 -esteroides y $\Delta^{5,7}$ -esteroides (Pérez-Castaño et al., 2012). Entre los más destacados se encuentran:

- β -Sitosterol (Figura 1.2). Su fórmula molecular es $C_{29}H_{50}O$ y presenta una cadena lateral de 8 átomos de carbono en el carbono 17 del núcleo esteroide. En esta cadena lateral, se encuentra un grupo etilo ($-CH_2CH_3$) en la posición C-24. Este es el EV más abundante en la mayoría de los aceites vegetales, especialmente en el aceite de oliva

y el de girasol. Su estructura es muy similar a la del colesterol, pero la adición de un grupo etilo en el carbono C-24 lo diferencia (Moreau et al., 2018; Pérez-Castaño et al., 2013).

- Campesterol (Figura 1.2). Su fórmula molecular es $C_{28}H_{48}O$ y se caracteriza por una cadena lateral más corta que el β -Sitosterol, con solo un grupo metilo ($-CH_3$) en la posición C-24. Cu concentración varía según el tipo de aceite vegetal, siendo más abundante en aceites como el de soja y el de colza. Es más abundante en aceites como el de soja y colza (Moreau et al., 2018; Pérez-Castaño et al., 2013).
- Estigmasterol (Figura 1.2). Su fórmula molecular es $C_{29}H_{48}O$, presenta una cadena lateral de 8 átomos de carbono, similar al β -Sitosterol, pero con un doble enlace entre los carbonos C-22 y C-23. Este doble enlace le da una mayor reactividad y propiedades ligeramente diferentes en cuanto a su función biología y fisicoquímica. Es un esteroles predominante en el aceite de soja (Moreau et al., 2018; Pérez-Castaño et al., 2012).
- Brassicasterol (Figura 1.2). Su fórmula molecular es $C_{28}H_{46}O$, presenta un doble enlace entre los carbonos C-22 y C-23, similar al estigmasterol, pero tiene una cadena lateral más corta, con un grupo metilo en C-24 (Moreau et al., 2018; Pérez-Castaño et al., 2012).
- Δ^5 -Avenasterol (Figura 1.2). Cuya fórmula molecular es $C_{29}H_{48}O$, presenta una estructura similar al estigmasterol, pero con un doble enlace adicional entre los carbonos C-7 y C-8. Es un esteroles característico del aceite de oliva virgen extra y tiene propiedades antioxidantes (Moreau et al., 2018).

4-desmetilesteroles

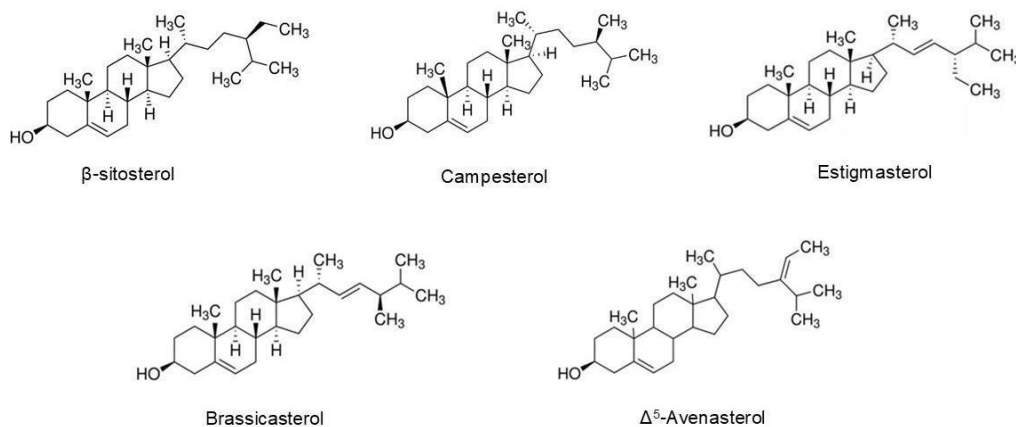


Figura 1.1.2. Estructura de los 4-desmetilesteroles. Fuente: Sigma

4 α -metilesteroles (un grupo metilo). Son menos abundantes en los aceites vegetales que los 4-desmetilesteroles (Moreau et al., 2018).

4,4'-dimetilesteroles (dos grupos metilo). Al igual que los 4-monometilesteroles se encuentran en concentraciones muy bajas en los aceites vegetales. Aunque este grupo es interesante, ya que, además de los esteroides incluye también a los alcoholes triterpénicos, compuestos que tienen estructuras químicas relacionadas (Moreau et al., 2018). Entre ellos podemos destacar:

- Cicloartenol (Figura 1.3). Su fórmula molecular es $C_{30}H_{50}O$, su estructura se caracteriza por tener un grupo metilo en el carbono 4, que lo diferencia de los 4-desmetilesteroles como el β -sitosterol. Además, tiene un anillo ciclopropano fusionado entre los carbonos 9 y 10 (Moreau et al., 2018).
- Lupeol (Figura 1.3). Su fórmula molecular es $C_{30}H_{50}O$. Es un triterpenoide que también se incluye en el grupo de los alcoholes triterpénicos. Su estructura difiere notablemente de los esteroides mencionados anteriormente debido a que tiene un esqueleto de lupano, lo que implica una organización más compleja de los anillos. En el carbono 3, presenta un grupo hidroxilo (-OH), y no tiene una cadena lateral alifática larga como los esteroides anteriores, sino una estructura pentacíclica (Schlag et al., 2024).

4,4'-dimetilesteroles

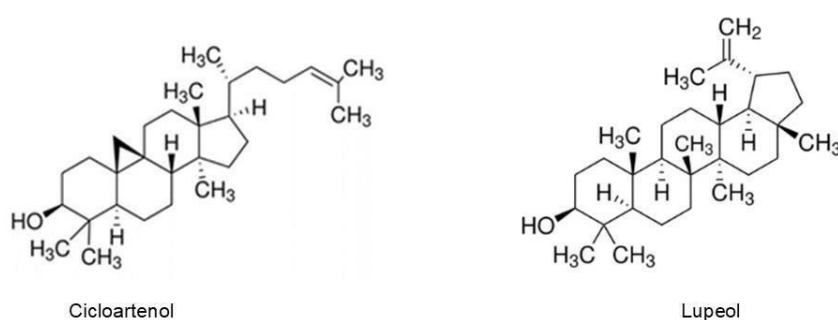


Figura 1.3. Estructura de los 4,4'-dimetilesteroles más comunes. Fuente: SIGMA

A parte de los esteroides mencionados, los cuales son los principales presentes en los aceites vegetales, podemos encontrar muchos más en concentraciones más pequeñas. Recientemente se ha hecho un estudio mediante GC/MS en 24 aceites vegetales con el objetivo de crear un base de datos (Schlag et al., 2024).

1.2.1.1. *Esteroles esterificados*

Los EV pueden presentarse como **esteroles libres**, es decir, con el grupo OH libre, o como **conjugados**, cuando el grupo OH está unido covalentemente mediante un enlace éster o un enlace glucosídico con glucosa (y ocasionalmente otros azúcares). Los cuatro tipos comunes de conjugados de esteroles son: **ésteres de esterol** (SE, esterificados con ácidos grasos), **ésteres de ácido hidroxicinámico** (HSP, principalmente esterificados con ácido ferúlico o p-cumárico), **glucósidos de esterol** (SG) y **glucósidos de esterol acilado** (ASG). Los más comunes o estudiados son los esteres de esteroles (de ácidos grasos) (Moreau et al., 2018).

1.2.2. *Distribución de esteroles en diferentes aceites vegetales*

La distribución de esteroles libres en aceites vegetales crudos es un factor clave para su caracterización y autenticación, ya que cada tipo de aceite presenta un perfil específico. El colesterol, aunque generalmente se encuentra en bajas concentraciones en los aceites vegetales, destaca en el aceite de palma donde puede alcanzar el 6.7% del total de esteroles. En aceites con bajo contenido de esteroles totales, como el de oliva (1.000-2.000 mg/kg) y el de avellana (1.500-3000 mg/kg), es mínimo o no detectable. El brassicasterol es característico de aceites de colza, especialmente en variedades de bajo contenido de ácido erúrico, donde puede representar entre el 5% y el 13% del total de esteroles, su presencia en otros aceites es limitada. El campesterol está presente en la mayoría de los aceites vegetales, siendo especialmente abundante en los aceites de semillas, como el de colza y el de soja, donde puede representar hasta el 30% del total de esteroles, mientras que en el aceite de oliva su concentración es menor, situándose por debajo del 5%. El estigmasterol, al igual que el campesterol, se encuentra en la mayoría de los aceites vegetales, siendo predominante en los aceites de maíz (10-15%) o soja (20%), mientras que en aceites como el de oliva y el de palma aparece se encuentra en proporciones más reducidas (1-10%). El β -sitosterol es el esterol predominante en la mayoría de los aceites vegetales, en aceites de oliva y de avellana alcanza concentraciones sobre el 90%, siendo el esterol más abundante, mientras que en otros aceites específicos se encuentra en menor concentración, como el aceite de colza y soja (55-60%) o maíz y trigo (60-65%). Otros esteroles menores, como el Δ^5 -avenasterol y los Δ^7 -estigmasterol, se encuentran en concentraciones específicas en los aceites de

sésamo y cártamo. La suma de todos los esteroides libres se denomina esteroides totales y se expresa como mg/kg de aceite, los esteroides totales también son un parámetro de pureza característico de cada aceite (Normén et al., 2007; Nyström et al., 2012; Moreau et al., 2018; Plumb et al., 2011).

1.2.3. Efecto del refinado en la composición de esteroides.

El refinado es un proceso destinado a mejorar la calidad de los aceites mediante la eliminación impurezas. El desodorizado es una etapa clave del refinado en la que se aplica vapor a altas temperaturas (180-240°C) en vacío, esto provoca la eliminación a grandes rasgos de aldehídos y cetonas, compuestos fenólicos y peróxidos, causantes de olores a rancio, acidez y sabores amargos. Las altas temperaturas también pueden eliminar/alterar compuestos beneficiosos como es el caso de los esteroides. Estos procesos provocan la deshidratación de los esteroides presentes en el aceite, lo que da lugar a la formación de hidrocarburos esteroideos, conocidos como estigmastadienos. La deshidratación del β -sitosterol (figura 1.4), el esteroide predominante en los aceites vegetales, general 24-etilcolesta-3,5-dieno (estigmasta-3,5-dieno), y en menor cantidad, sus isómeros posicionales, como estigmasta-2,4-dieno y estigmasta-2,5-dieno. Otros estigmastadienos como 24-metilcolesta-3,5-dieno (campesta-3,5-dieno) y 24-etilcolesta-3,5,22-trieno (estigmasta-3,5,22-trieno), resultan de la deshidratación del campesterol y el estigmasterol, respectivamente (Aparicio y Harwood, 2013; Bai, Ma y Chen, 2020; García, Martins y Cabrita, 2013).

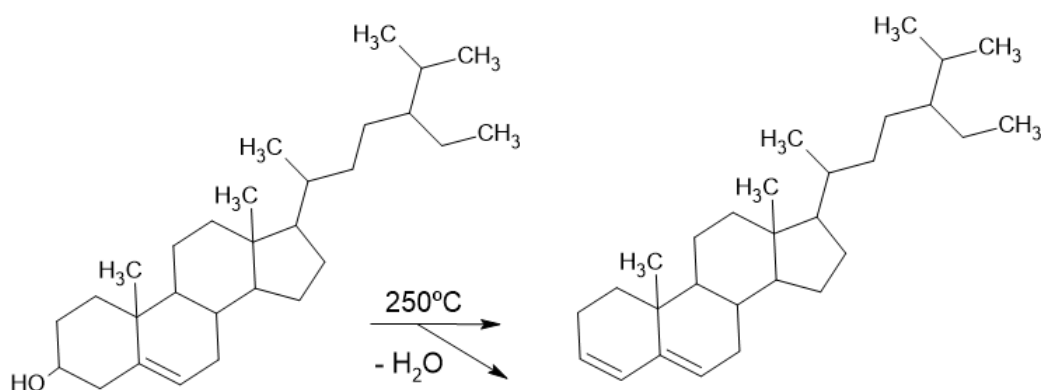


Figura 1.4. Deshidratación del β -sitosterol para formar estigmasta-3,5-dieno. Fuente: Elaboración propia.

El Consejo Oleícola Internacional (COI) propone el análisis de estigmastadienos como una técnica esencial para detectar la presencia de aceites refinados en mezclas con aceite de oliva virgen. Para asegurar la autenticidad del producto, el COI ha establecido límites específicos de concentración de estigmastadienos para cada

categoría comercial de aceite de oliva, los cuales se presentan en la figura 1.5. Se dispone de dos métodos oficiales de análisis, detallados en los documentos COI/T.20/Doc. n° 16 y COI/T.20/Doc. n° 11 (International Olive Council, 2017; International Olive Council, 2021).

	Estigmastadienos ppm	R1
Aceites de oliva vírgenes comestibles	≤0,15	-
Aceite de oliva virgen lampante	≤0,50	-
Aceite de oliva refinado	≤50*	≥12
Aceite de oliva	≤50*	≥12
Aceite de orujo de oliva crudo	≤5*	-
Aceite de orujo de oliva refinado	≤120*	≥10
Aceite de orujo de oliva	≤120*	≥10

$$R1 = \frac{\text{estigmasta} - 3,5 - \text{dieno}}{\text{campesta} - 3,5 - \text{dieno}}$$

*La relación R1 se aplica a los aceites que contengan más de 4 ppm de estigmastadienos.

Figura 1.5. Límites de concentración de estigmastadienos para las diferentes categorías comerciales del aceite de oliva. Adaptado de International Olive Council, 2017.

Otra etapa que afecta a la composición de esteroides es el “blanqueo o decoloración”. Esta etapa consiste en la eliminación de las sustancias responsables del color. El aceite se trata con arcilla activada con ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico actúa como catalizador en la esterificación de Fisher, los grupos hidroxilos presentes en los esteroides libres reaccionan con los grupos carboxilo presentes en los ácidos grasos para formar un enlace éster, dando lugar a los ésteres de esteroides (figura 1.6). Este proceso implica la reducción de esteroides totales, recordemos que es la cuantificación total de esteroides libres, ya que parte de ellos han sido esterificados. En consecuencia, cuando un aceite es refinado baja la proporción de esteroides libres y aumenta la proporción de esteroides esterificados (Bai, Ma, y Chen, 2020).

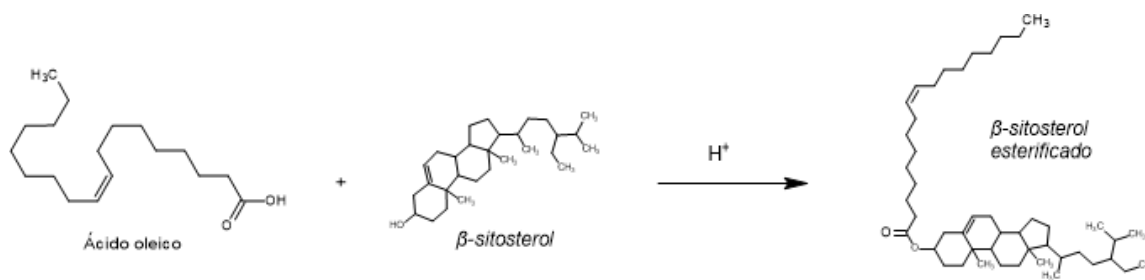


Figura 1.6. Esterificación entre el β-sitosterol y el ácido oleico. Fuente: Elaboración propia

1.3. Proceso analítico para la determinación de esteroides en aceites vegetales

1.3.1. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Método oficial. COI/T.20/DOC n°26.

El Reglamento de Ejecución (UE) 2022/2104 establece como método oficial el

COI/T.20/DOC N°26, desarrollado por el Consejo Oleícola Internacional (COI). El COI propone este método para determinar el contenido y la composición de esteroides en aceites vegetales a través de cromatografía de gases con columna capilar y detector de ionización de llama (GC-FID) (International Olive Council, 2020; *Unión Europea*, 2022). El procedimiento oficial consta de varias etapas:

Preparación del insaponificable. El objetivo de este paso es que todos los esteroides que se encuentren esterificados de forma natural en el aceite pasen a esteroides libres para realizar la determinación total. Si el objetivo es analizar los esteroides esterificados este paso debe omitirse. Para llevar a cabo la saponificación, se añade a las muestras una cantidad específica de α -colestanol al como patrón interno. A continuación, las muestras se someten a una saponificación alcalina con hidróxido de potasio (KOH), lo que permite liberar los esteroides de las fracciones de ácidos grasos. Se calienta la muestra con la disolución alcalina a reflujo durante un tiempo determinado, generalmente de 30 min a 1. Posteriormente, la muestra se trasvasa a un embudo de decantación y se separa la fase orgánica (que contiene los esteroides) de la fase acuosa. Una vez terminado todo el proceso de decantación, se seca con sulfato de sodio anhidro. La saponificación de esteroides implica la hidrólisis de ésteres en presencia de una base fuerte, lo que resulta en la liberación de esteroides libres y la formación de sales de ácido carboxílico, como se muestra en la figura 1.7. (International Olive Council, 2020).

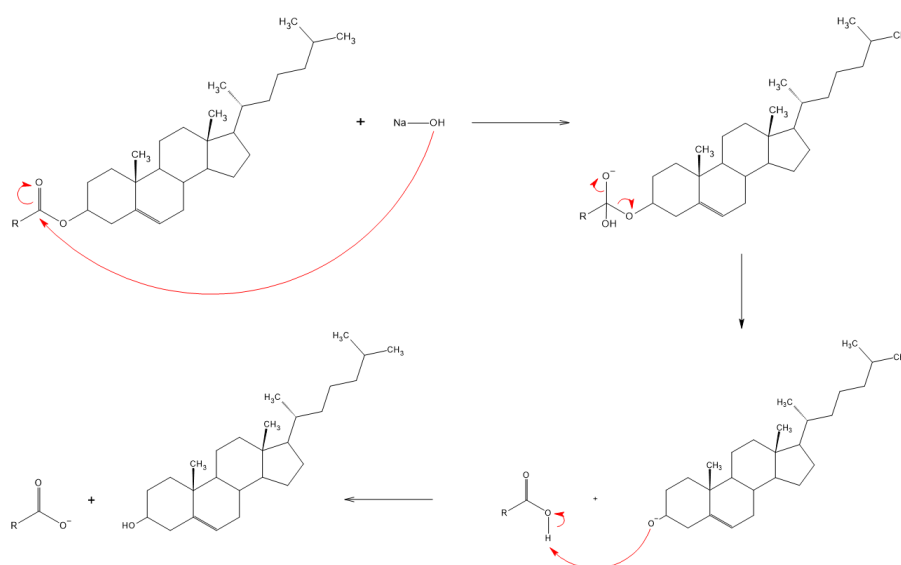


Figura 1.7. Mecanismo simplificado de la reacción de saponificación de esteroides conjugados.
Fuente: Elaboración propia.

Separación de la fracción de esteroides. Los esteroides se extraen mediante cromatografía en capa fina (CCF) o mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La figura 1.8.A. muestra una capa cromatográfica correspondiente a un aceite de orujo de oliva, en la que se observa la separación de componentes. Para extraer los esteroides, es necesario recuperar la zona 2, que contiene tanto los esteroides como los alcoholes triterpénicos (eritrodiool+uvaol). En el caso de la HPLC, la figura 1.8.B. presenta un cromatograma de un aceite de oliva en el cual la zona 2 corresponde con la fracción de esteroides y alcoholes triterpénicos (International Olive Council, 2020).

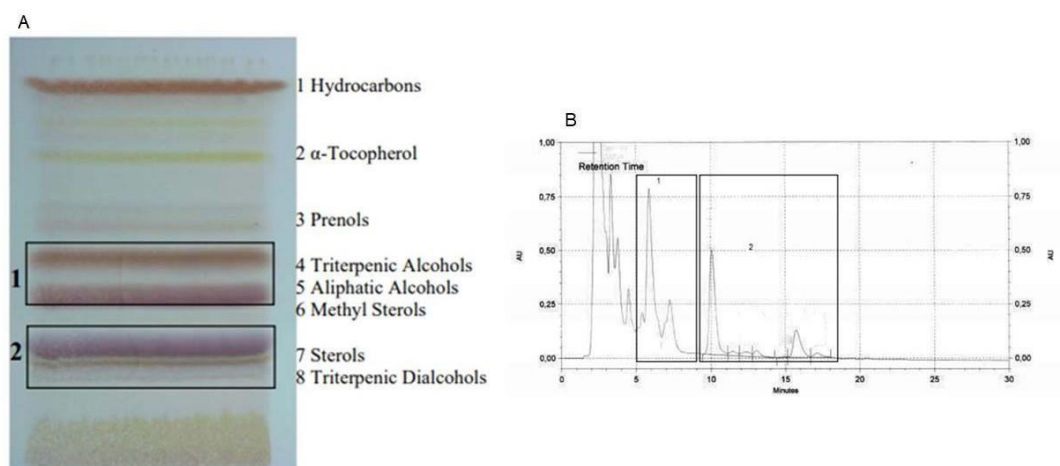
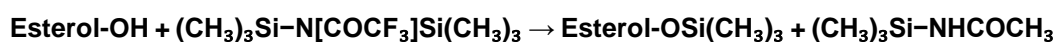


Figura 1.8. **A)** Placa cromatográfica del aceite de orujo donde se observa el área que debería rasparse. **B)** Cromatograma HPLC de la fracción insaponificable separada de un aceite de oliva, la zona 2 corresponde con los esteroides y los alcoholes triterpénicos. Adaptado de International Olive Council, 2020.

Derivatización. Los esteroides en su forma libre deben someterse a un proceso de derivatización antes de ser analizados mediante GC, comúnmente realizado a través de silanización. Se utilizan reactivos como como TMS (trimetilsilil) o BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) para transformas los grupos hidroxilo (-OH) en grupos trimetilsilil, aumentando si la volatilidad y estabilidad térmica de los esteroides, lo que facilita su análisis. La derivatización es crucial para obtener resultados más precisos y fiables (García-González et al., 2019; International Olive Council, 2020). La reacción se resume de la siguiente manera:



Cromatografía de gases. Para el análisis por GC-FID, se introduce una pequeña cantidad de la muestra derivatizada en el cromatógrafo de gases. La columna capilar de fase no polar, como la de dimetilpolisiloxano, permite la separación de los diferentes esteroides en la muestra. Los esteroides se detectan y cuantifican mediante un detector de ionización de llama (FID), que es especialmente sensible a compuestos que contienen carbono (International Olive Council, 2020).

Identificación de los picos. La identificación de los esteroides se realiza comparando los tiempos de retención con los de estándares de esteroides conocidos, como colesterol, estigmasterol, β -sitosterol y campesterol, entre otros. La figura 1.9 muestra un cromatograma típico de un aceite de oliva lampante (International Olive Council, 2020)

Determinación cuantitativa. La cuantificación se lleva a cabo utilizando un estándar interno (α -colestanol) o una curva de calibración generada con soluciones de concentraciones conocidas de los esteroides de interés y se expresa como mg de esteroide por 100g de materia grasas (International Olive Council, 2020), de la siguiente manera:

$$\text{esteroide } X = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m}$$

Siendo:

A_x : área del pico del esteroide X

A_s : área del pico del α – colestanol

m_s : peso de α – colestanol añadido, en miligramos

m : peso de la muestra tomado para la determinación, en gramos

Expresión de los resultados. Se registra el contenido de cada uno de los esteroides en mg/100g de materia grasas, y como “esteroides totales”, su suma. El porcentaje de cada uno de los esteroides simples es la razón entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de los esteroides (International Olive Council, 2020).

$$\% \text{ del esteroide } X = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

Siendo:

A_x : área del pico de X

$\sum A$: suma de las áreas de todos los picos

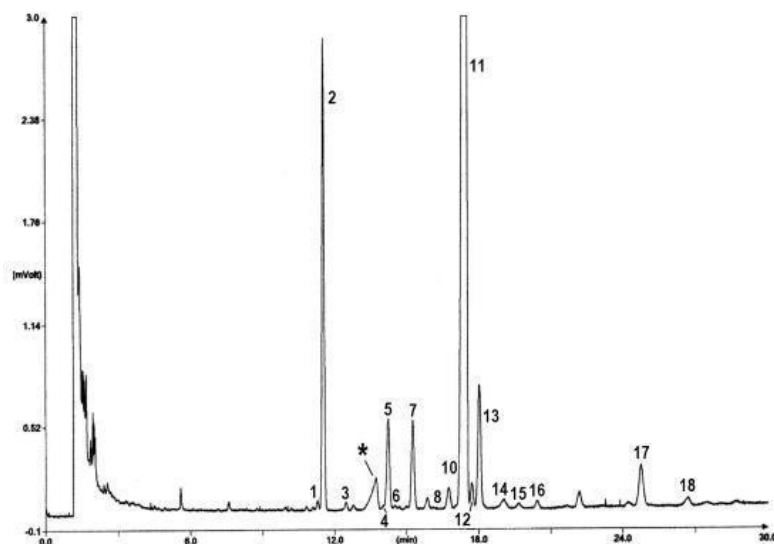


Figura 1.9. Cromatografía de gases de la fracción de esteroides y de dialcoholes triterpénicos de aceite de oliva lampante (con ayuda de patrón interno). Adaptado de International Olive Council, 2020.

1.3.2. Alternativas al método oficial

1.3.2.1. Tratamiento de muestra

Como hemos visto en el método oficial, el paso de la extracción líquido-líquido es laborioso, consume grandes cantidades de disolvente, es propenso a la formación de emulsiones y requiere pasos de lavado. El paso de la TLC también es lento, tiene un bajo rendimiento y una recuperación baja. Por ello se han propuesto numerosas alternativas que se describen a continuación (Mathison y Holstege, 2013).

Mathison y Holstege desarrollaron una mejora al método oficial para la determinación de esteroides en el aceite de oliva, implementada en el Centro de Aceite de Oliva de UC Davis. En lugar de la extracción líquido-líquido (LLE), utilizaron la extracción en fase sólida con soporte líquido (SLE) en un cartucho de tierra de diatomeas, y reemplazaron la cromatografía en capa fina (TLC) por la extracción en fase sólida (SPE) en una columna de gel de sílice. Este método mejorado elimina varios inconvenientes y permite preparar múltiples muestras en paralelo. Posteriormente

este método ha sido validado por Phenomenex. Este método no tiene carácter oficial (Chapa et al., s.f.; Mathison y Holstege, 2013).

1.3.2.2. Detección

Una alternativa al método clásico (GC-FID) es utilizar la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS). El detector MS determina las relaciones masa-carga de las moléculas al ionizarlas y fragmentarlas dentro del espectrómetro de masas. Cuando los iones llegan al detector se genera un espectro de masas. El método GC-MS nos proporciona una información estructural detallada de cada compuesto, mediante el uso de espectro de masas de referencia. Esto es útil para diferenciar compuestos con tiempos de retención similares evitando así la posible coelución de esteroides por GC-FID (Srivastava et al., 2024). En la figura 1.10 se ilustra un ejemplo de espectro de masas junto con su esquema de fragmentaciones para el β -sitosterol (Saini et al., 2021).

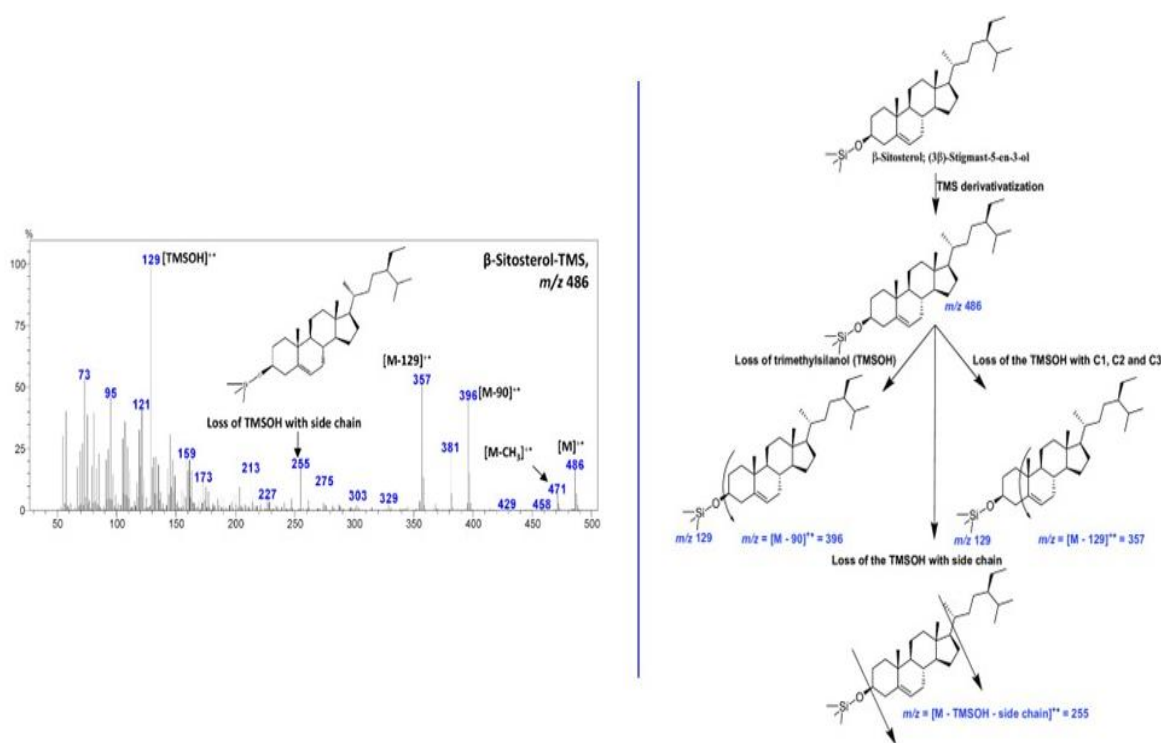


Figura 1.10. Espectro de masas y esquema de fragmentación para el β -sitosterol. Adaptado de Saini et al., 2021, con permiso de la editorial Elsevier.

2. OBJETIVOS

En esta memoria, se ha llevado a cabo una revisión bibliografía de los métodos de análisis del perfil de esteroides en aceites vegetales y su aplicación a la autenticidad de cada aceite determinado y a la determinación de mezclas fraudulentas entre aceites vegetales.

Debido a la extensión del tema a tratar y a la gran cantidad de métodos aplicados a este propósito, la memoria se centra en la aplicación de la cromatografía de gases ya que es la técnica más ampliamente utilizada.

El objetivo principal es revisar la bibliografía científica que ha aplicado la cromatografía de gases en el estudio de la fracción de esteroides del aceite de oliva y otros aceites vegetales.

Como objetivos específicos se plantean:

- Examinar la utilidad y la bibliografía existente sobre el análisis de la fracción de esteroides para la identificación de la autenticidad de un aceite determinado.
- Examinar la utilidad y la bibliografía existente sobre el análisis de la fracción de esteroides para la determinación de una mezcla fraudulenta de aceites vegetales.

3. METODOLOGIA

La memoria consiste en una revisión bibliográfica de la literatura acerca de la autenticación de los aceites vegetales a través del análisis de la fracción de esteroides mediante técnicas cromatográficas. La búsqueda se efectuó en las bases de datos de *ScienceDirect*, *Scopus* y *Google Académico*.

Realizo una búsqueda general con la sintaxis: (“vegetable oil” OR “edible oil” AND “sterols”) con el objetivo de obtener información general sobre el tema.

Una vez vista la magnitud de artículos y técnicas empleada se decide acotar el tema a la técnica de cromatografía de gases.

Para una búsqueda más específica se emplea la sintaxis ("vegetable oil" OR "edible oil") AND ("authentication" OR "adulteration") AND "sterols" AND " gas chromatography". No se realizaron restricciones de idiomas y se incluyeron todos los artículos publicados entre 2005-2025. La última búsqueda se realizó el 15 de septiembre de 2024. A través de otras fuentes (TFG, Tesis, conferencias etc.) he obtenido 26 artículos.

En la primera búsqueda se identificaron 277 (ScienceDirect), 11 (Scopus) y 1640 (Google Académico) resultados. A través de otras fuentes (TFG, Tesis, conferencias etc.) he obtenido 26 resultados, siendo un total de 1952 resultados. En función del título y autor se eliminan los artículos duplicados, y obtenemos 1722 resultados. A continuación, en función del título y resumen se seleccionan aquellos que emplean análisis GC-FID de esteroides en aceites vegetales y obtenemos 288 resultados. En la figura 3.1 se representa un diagrama de flujo de la búsqueda bibliográfica.

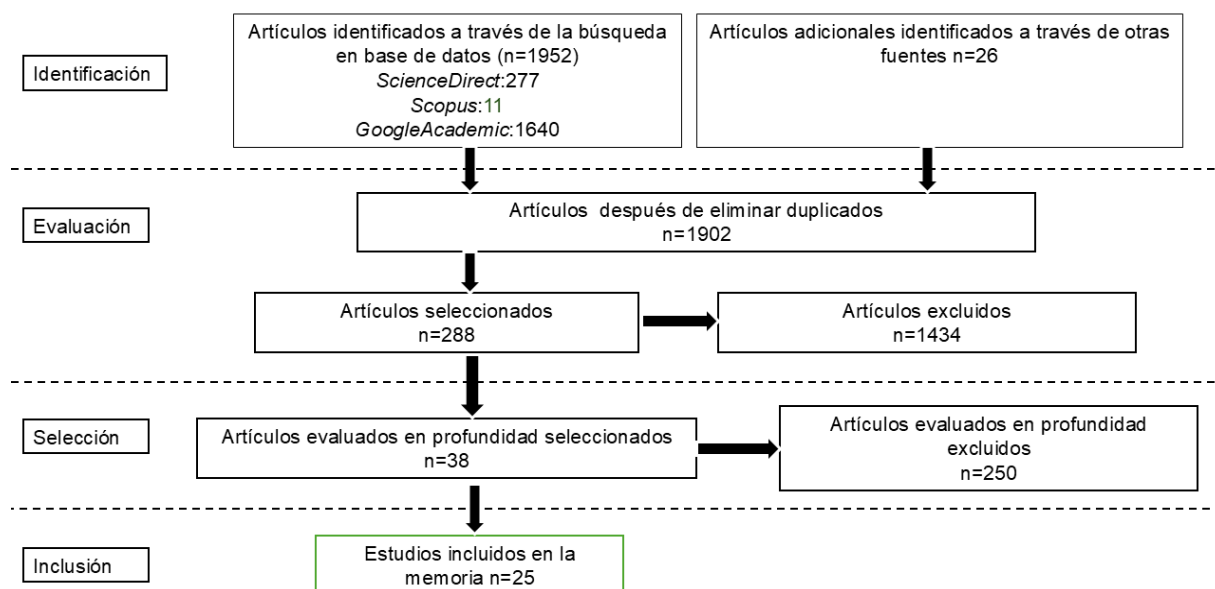


Figura 3.1. Diagrama de flujo de la búsqueda bibliográfica. Fuente: Elaboración propia

Una vez seleccionados los 288 resultados se emplean criterios de exclusión, los cuales son:

- Descartamos aquellos cuya finalidad es la validación del método empleado, ya que no es el objetivo de esta memoria, la cual está enfocada en los resultados proporcionados por un método ya validado.

- Descartamos aquellos que tienen un enfoque más general sobre todos los componentes del aceite, como es el caso de los ácidos grasos y un análisis superficial sobre los componentes menores del aceite, como es el caso de los esteroides.
- Descartamos aquellos cuyo enfoque está dirigido al campo de salud, como es el caso de tratar enfermedades o sus beneficios nutricionales.
- Descartamos aquellos que realizan un análisis de esteroides en matrices diferentes al aceite vegetal, como es el caso de grasas animales y diferentes alimentos.

En una etapa de selección final seleccionamos aquellos que emplean la cromatografía de gases como un método robusto para la determinación de esteroides en matrices de aceites vegetales con un enfoque crítico y son capaz de discriminar diferentes tipos de aceites.

Una vez aplicados los criterios mencionados he seleccionado 25 artículos para incluir en la presente memoria, los cuales se muestra en la tabla 3.1.

Paradigma	Matriz	Ref. Bibliográfica	Aplicado a:
Autenticidad	Aceite de Oliva	Baccouri et al., 2018	Aceite de Oliva Virgen
		Gagour et al., 2024	Aceite de Oliva Virgen
		Gharby et al., 2012	Aceite de Oliva Virgen
		Giacalone et al., 2015	Aceite de Oliva Virgen
		Skiada et al., 2023	Aceite de Oliva Virgen
	Otros aceites	Da Silva et al., 2020	Aceite de coco y aceite de linaza
		Almeida et al., 2020	Aceite de soja y aceite de colza
		Dulf et al., 2010	Aceite de maíz, aceite de semilla de uva y aceite de almendras
		Green y Wang., 2023	Aceite de aguacate
Adulteración/Fraude	Aceite de Oliva Virgen	Mathison y Holstege, 2013	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de orujo de oliva
		Garcia, Martins y Cabrita, 2013	Aceite de oliva virgen adulterado con aceites refinados

	Azadmard-Darmichi y Dutta, 2006	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de avellana
	Schalag et al., 2024	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de avellana
	Al-Ismaïl et al., 2010	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de soja, aceite de maíz, aceite de colza y aceite de girasol
	Jabeur et al., 2014	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de soja y aceite de maíz
	Kesen, 2019	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de soja
	Youseff et al., 2014	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de soja, aceite de maíz, aceite de colza y aceite de algodón
	Strigley et al., 2016	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de colza
	Dulf et al., 2022	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de colza
	Valli et al., 2021	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de girasol
	Gómez-Coca et al., 2020	Aceite de oliva virgen adulterado con aceite de soja, aceite de girasol y aceite de colza.
	Mariani et al., 2006	Aceite de oliva virgen/refinado adulterado con aceite de avellana
Otros aceites	Deme et al., 2021	Aceite de semilla de niger y aceite de semilla de sésamo adulterado con aceite de palma
	Chen et al., 2023	Aceite de sésamo adulterado con aceite de colza
	Yang et al., 2024	Aceite de linaza adulterado con aceite de colza, aceite de maní, aceite de girasol y aceite de sésamo.

Tabla 3.1. Resultados seleccionados para incluir en la memoria. Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyen que el aceite de oliva virgen es el aceite más estudiado en cuanto a autenticidad y detección de fraudes. Por ello, la discusión de la bibliografía se ha dividido en dos enfoques principales, por un lado, el análisis de estudios centrados en el aceite de oliva virgen, y, por otro lado, aceites de semillas específicos como el de girasol, soja, avellana, cacahuete, sésamo, linaza,

coco, níger, colza, maíz y palma. Esta estructura proporciona una visión clara y organizada de la revisión bibliográfica.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

A continuación, se realiza una discusión de los resultados de la búsqueda bibliográfica.

4.1. Estudios de autenticidad de aceites de oliva virgen por su origen geográfico y/o botánico empleando esteroides.

El análisis del perfil de esteroides en aceites de olivos silvestres de distintas regiones de Marruecos, realizado según el método oficial ISO 12228-2:2014, ha revelado variaciones significativas que permiten diferenciar estos aceites según su origen geográfico. Las regiones estudiadas incluyen Essaouira, Agadir, Beni Mellal, Marrakech, Meknes, Taliouin, Taroudant y Tiout. Los estudios indican que, aunque el β -sitosterol es el esteroide predominante en todos los aceites, la concentración y proporción de otros desmetilesteroides menores varían en función de la región de cultivo (figura 4.1.A). Estas diferencias generan un perfil distintivo para cada área, permitiendo identificar el origen específico de los aceites analizados (Baccouri et al., 2018; Gagour et al., 2024; Gharby et al., 2011).

En la región de Marrakech, los aceites presentan niveles ligeramente más bajos de β -sitosterol en comparación con otras zonas, aunque sigue siendo el esteroide más abundante. Además, tiene una mayor concentración de campesterol y estigmasterol, lo que los distingue de los aceites de otras regiones marroquíes. Por otro lado, los aceites de la región de Meknes se caracterizan por altos niveles de β -sitosterol y diferencias en los niveles de Δ^5 -avenasterol y Δ^5 -estigmastenol, que podrían estar relacionadas con las condiciones ambientales de Meknes. En cuanto a la región de Taroudant, sus aceites destacan por tener una alta proporción de β -sitosterol y niveles moderados de campesterol y estigmasterol, ofreciendo un perfil equilibrado que se asemeja a los estándares típicos del aceite de oliva virgen o virgen extra. Los aceites de la región de Agadir muestran una composición de esteroides similar a la de otras regiones, pero con una mayor variabilidad en la concentración de algunos compuestos menores, lo que podría deberse a la diversidad de microclimas de la zona. Por otro lado, la región de Beni Mellal, se distingue por tener niveles significativamente altos de β -sitosterol, junto con una proporción considerable de Δ^5 -avenasterol. La región de

Essaouira presenta una tendencia hacia niveles más bajos de esteroides menores como el campesterol y estigmasterol, aunque el β -sitosterol se mantiene en niveles comparables a los de otras regiones. Además de los aceites de olivos silvestres, se ha incluido la variedad Picholine marroquí en el análisis. Esta variedad es ampliamente conocida y cultivada en Marruecos y su inclusión permite establecer una referencia que facilita la comparación con los aceites silvestres (Baccouri et al., 2018; Gagour et al., 2024; Gharby et al., 2012).

Además, el análisis de componentes principales (PCA) ha sido clave para visualizar como las muestras de aceite de distintas regiones se agrupan en función de su perfil de esteroides (figura 4.1.B). Los resultados muestran que el primer componente principal (PC1) explica el 50.34% de la varianza total, con correlaciones positivas para el campesterol (+0.40) y estigmasterol (+0.21), y una correlación negativa para el β -sitosterol (-0.48). Esto sugiere que los aceites con altos niveles de campesterol y estigmasterol se ubicarían en el lado positivo de PC1, mientras que aquellos con mayor contenido de β -sitosterol se agrupan en el lado negativo. El segundo componente principal (PC2) explica el 26.15% de la varianza total, lo que sumado a PC1 cubre un 74.49% de la variabilidad total en los datos. PC2 muestra correlaciones positivas con Δ^5 -avenasterol (+0.58) y Δ^5 -estigmasterol (-0.34). Se observa que los aceites de Marrakech, Beni Mellal, Taroudant y Taliouin se agrupan en el lado positivo de PC1, con niveles más altos de Δ^7 -avenasterol y Δ^7 -estigmasterol, confirmando patrones distintivos en estos aceites. Las regiones de Essaouira y Meknes presentan los niveles más altos de estigmasterol y campesterol, ubicándose en el lado positivo de PC1. Por otro lado, los aceites de Marrakech y la variedad cultivada Picholine marroquí se agrupan hacia el lado negativo de PC1, asociados a niveles elevados de β -sitosterol, un indicador típico de aceites de alta calidad (Baccouri et al., 2018; Gagour et al., 2024; Gharby et al., 2012).

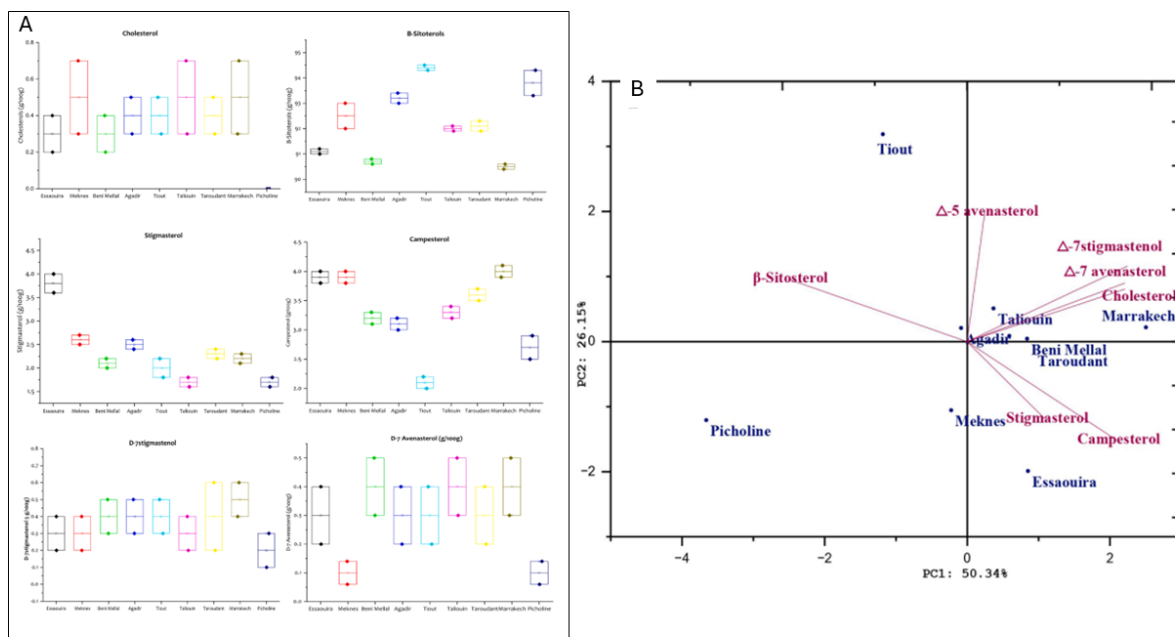


Figura 4.1. **A)** Concentración de esteroides (%) de aceites de oliva procedentes de diferentes regiones de Marruecos: Essaouira, Agadir, Beni Mellal, Marrakech, Meknes, Taliounin, Toroudant, Tiout. **B)** Análisis PCA. Adaptado de Gagour et al., 2024 con permiso de la editorial Elsevier.

En un caso de Italia y Grecia, se analizaron 385 muestras de aceites de oliva monovarietales recolectadas en dos temporadas consecutivas (2019-2020 y 2020-2021) de cinco variedades: dos griegas (Koroneiki y Lianolia Kerkyras) y tres italianas (Coratina, Peranzana y Favolozza). La identificación de esteroides mediante el método COI/T.20/Doc.26 permitió clasificar todas las muestras como "Aceite de Oliva Virgen Extra". El uso del análisis de componentes principales (PCA) reveló que las variedades griegas se diferenciaban claramente entre sí y de las italianas (figura 4.2). Por ejemplo, el β -sitosterol fue un marcador clave para la variedad griega Lianolia Kerkyras, mientras que el 24-metilen-colesterol, campestanol, Δ^5 -avenasterol y $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol se asociaron predominantemente con las variedades italianas. Además, el PCA mostró una superposición entre las tres variedades italianas, lo que sugiere similitudes en sus perfiles de esteroides. Estos resultados indican que, al igual que en los aceites de Marruecos, las concentraciones de esteroides como el β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol y campestanol desempeñan un papel importante en la diferenciación de las variedades de Italia y Grecia (Skiada et al., 2023).

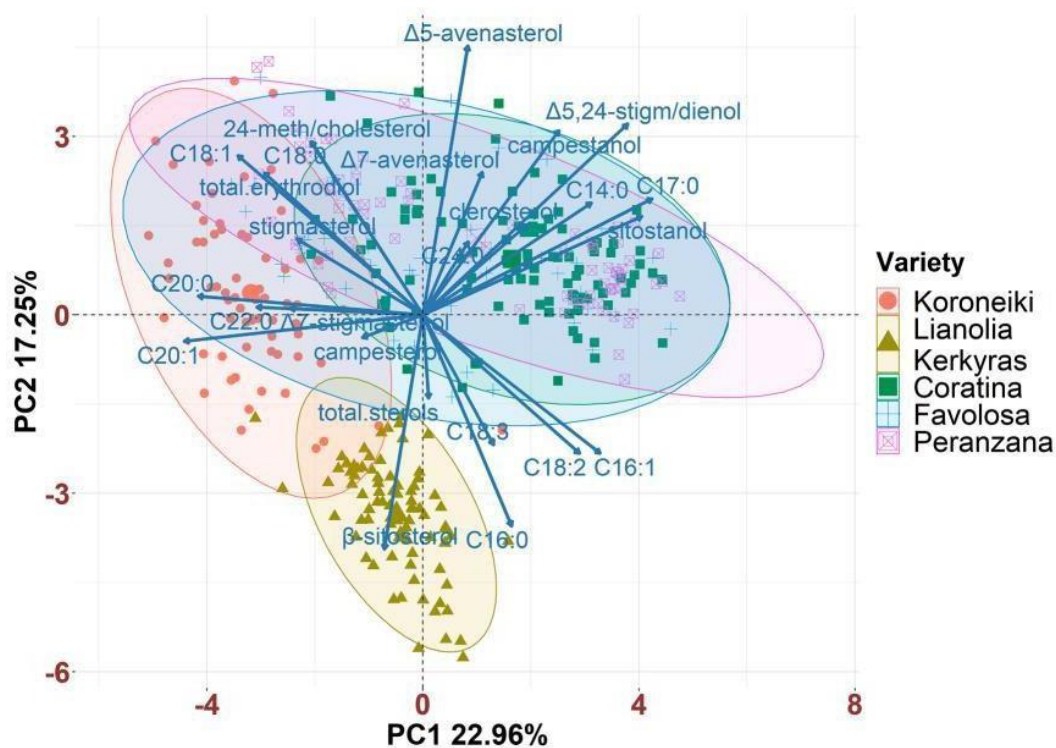


Figura 4.2. Análisis de Componentes Principales (PCA) de dos variedades botánicas griegas (Koroneiki y Lianolia Kerkyras) y tres italianas (Coratina, Peranzana y Favolosa). Adaptado de Skiada et al., 2023, con permiso de la editorial Elsevier.

Los aceites de oliva italianos también pueden diferenciarse de otros aceites de oliva de origen geográfico en función de la concentración de esteroides esterificados. Al aplicar el análisis de componentes principales (PCA) a un conjunto de 107 muestras de aceite provenientes de diversas regiones geográficas (Italia, España, Túnez y mezclas de aceites de la UE), se obtuvieron los blipots mostrados en la figura 4.3. Las muestras fueron evaluadas considerando nueve variables: esteroides esterificados totales, sitosteril-C16, campesteril-C18, cicloartenil-C18, 24-metilcicloartenil-C18, campesterol, β -sitosterol aparente, β -sitosterol y esteroides totales. Los primeros tres componentes principales explican el 91% de la varianza total, permitiendo una clasificación eficaz de las muestras. Entre ellos, el PC1 (60.3% de la varianza) y el PC3 (11.4%) resultaron ser los más significativos. El PC1 permite distinguir las muestras italianas de las no italianas. Las muestras italianas tienen a agruparse en valores positivos de PC1 y, por tanto, se asocian con un mayor contenido de cicloartenil-C18 y sitosteril-C16, variables que presentan cargas positivas en PC1. Las muestras no italianas (España, Túnez, Mezcla UE) se agrupan principalmente en

valores negativos de PC1, lo que se relaciona con un contenido superior de 24-metilcicloartenil-C18 y campesteril-C18, ambos con cargas negativas en PC1. El biplot PC1-PC3 también ha diferenciado entre los aceites de España, Túnez y mezclas de UE. Las mezclas de UE se parecen mucho a los aceites españoles, mientras que las muestras tunecinas tienden a agruparse en valores positivos de PC3 y valores negativos de PC1. Debido a su baja carga en PC1, el campesterol, el β -sitosterol aparente, el β -sitosterol y los esteroides totales son menos significativos que los esteroides esterificados en la diferenciación de las muestras según su origen geográfico (Giacalone et al., 2015).

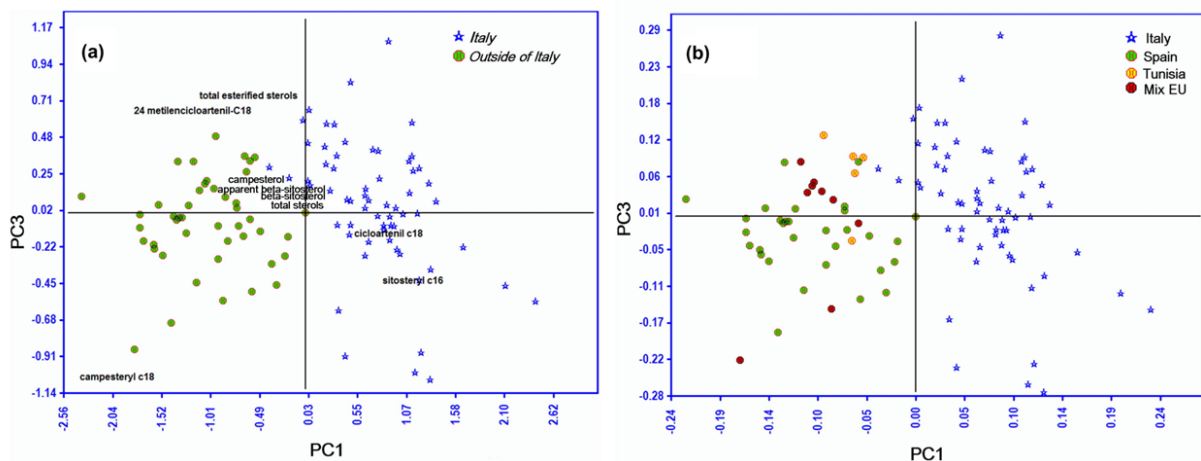


Figura 4.3. Biplot PC1-PC3 de aceites de oliva procedentes de Italia, España, Túnez y mezcla de UE. Adaptado de Giacalone et al., 2015, con permiso de la editorial Elsevier.

4.2. Estudios de autenticidad de otros aceites vegetales empleando la composición de esteroides.

Los aceites vegetales específicos han de cumplir los requisitos de calidad y pureza impuestos en la norma *CXS 210-1999*. A continuación, se expone una revisión para algunos de los aceites vegetales más comunes (Codex Alimentarius, 1999).

4.2.1. Aceite de maíz.

Los estudios realizados en aceites de maíz procedentes de Rumania destacan una concentración total de 745,21 mg/100g de esteroides, de los cuales el 60.7% se encuentran en forma esterificada (tabla 4.1). Esto indica un proceso mínimo de refinado, manteniendo sus características naturales. Los esteroides predominantes, como el β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y Δ^5 -avenasterol, cumplen con los límites establecidos en la normativa, lo que respalda la autenticidad del aceite como producto natural y no adulterado (Dulf et al., 2010).

4.2.2. Aceite de almendra

El aceite de almendras procedente de Rumania presenta un perfil de esteroides (%) coherente con la normativa, con la excepción de la concentración (%) de esteroides totales, la cual está por encima del límite permitido (tabla 4.1). Esto podría deberse a la influencia climática (Dulf et al., 2010).

4.2.3. Aceite de semilla de uva

En contraste con el aceite de maíz, el aceite de semilla de uva procedente de Rumania analizado en el mismo estudio muestra niveles de colesterol, Δ^5 -avenasterol y "otros esteroides" se aproximan al límite mínimo (tabla 4.1). Estas diferencias sugieren la influencia de factores geográficos en la composición de esteroides, así como posibles adulteraciones si se observan aumentos significativos en estos compuestos (Dulf et al., 2010).

4.2.4. Aceite de coco

Por otro lado, en aceites de coco de Brasil, se detectan niveles de campesterol, estigmasterol y β -sitosterol que exceden los límites impuestos, lo que apunta a una baja calidad del producto (tabla 4.2). Las diferencias en la composición pueden deberse a prácticas de refinado inadecuado o a variaciones en el origen geográfico que afectan a la concentración de esteroides (Da Silva et al., 2020).

4.2.5. Aceite de girasol

En el caso del aceite de girasol, los análisis revelan concentraciones elevadas de campesterol y β -sitosterol por encima de los valores establecidos, junto con un contenido total de esteroides significativamente bajo (tabla 4.2). Esto sugiere procesos intensivos de refinado o posibles adulteraciones (Da Silva et al., 2020).

4.2.6. Aceite de linaza

El aceite de linaza presenta una concentración de esteroides ligeramente inferior al mínimo requerido (2273.4 mg/kg), y niveles elevados de β -sitosterol, lo que indica un refinado agresivo o condiciones específicas del área de cultivo que influyen en su composición (tabla 4.2) (Da Silva et al., 2020).

4.2.7. Aceite de aguacate

El aceite de aguacate, incorporado a la normativa CXS 210-1999 en 2021 debido a su creciente popularidad se caracteriza por variaciones en la concentración de campesterol (4.85%-9.75%), que en algunos casos superan el límite máximo

establecido. Esta variabilidad podría reflejar diferencias en el origen botánico del aguacate y subraya la importancia de ajustar los estándares para una evaluación más precisa. El β -sitosterol, predominante en todas las muestras (81.71%-85.87%), confirma la pureza del aceite, mientras que los bajos niveles de Δ^7 -avenasterol y Δ^7 -estigmastenol (<0.27%) se pueden utilizar como marcadores fiables para detectar adulteraciones, ya que los aceites vegetales usados para mezclar suelen tener concentraciones más altas de estos compuestos (Green y Wang, 2023).

Desmetilesteroles	Aceite de maíz procedente de Rumania			Análisis aceite de almendra procedente de Rumania			Análisis aceite de semilla de uva procedente de Rumania		
	Mg/100g	%	CODEX STAN 210-1999 (%)	Mg/kg	%	CODEX STAN 210-1999 (%)	Mg/kg	%	CODEX STAN 210-1999 (%)
β-Sitosterol	478.5	4.3	54.8-66.6	152.70	76.39	73.0-86.0	158.30	52.56	64.0-70.0
Colesterol	131.9	1.77	0.2-0.6	-	-	ND-0.1	2.83	0.94	ND-0.5
Campesterol	129.40	17.4	16.0-24.1	6.27	3.14	2.0-5.0	25.77	8.56	7.5-14.0
Estigmasterol	56.51	7.6	4.3-8.0	5.95	2.98	0.4-4.0	23.53	7.81	7.5-12.0
Δ⁵-avenasterol	35.76	4.8	1.5-8.2	20.05	10.03	5.0-14.0	18.62	6.18	1.0-3.5
Campestanol	10.48	-	-	3.81	1.90	-	3.24	1.08	-
Sitostanol	15.43	-	-	4.85	2.43	-	6.84	2.27	-
Otros esteroides	15.36	-	-	6.27	3.14	ND-0.6	61.97	20.58	ND-5.1
Esteroides totales (mg/100g)	745.21	-	-	199.9	-	-	301.10	-	-
Esteroides totales (mg/kg)	7452.1	-	7000-22100	1999.0	-	1590-4590	3011.0	-	2000-7000

Tabla 4.1. Concentración de esteroides en muestras de aceite de maíz, aceite de semilla de uva y aceite de almendra procedentes de Rumanía. Comparación con la norma CODEX STAN 210-1999. El color rojo representa que la concentración está fuera del rango. Fuente: Dulf et al., 2010.

Desmetilesteroles	Aceite de coco procedente de Brasil			Aceite de girasol procedente de Brasil			Aceite de linaza procedente de Brasil		
	Mg/kg	%	CODEX STAN 210-1999 (%)	Mg/kg	%	CODEX STAN 210-1999 (%)	Mg/kg	%	CODEX STAN 210-1999 (%)
Campesterol	48.3	11.35	6.0-11.2	244.3	17.17	5.0-13.0	624.1	27.45	25.0-31.0
Estigmasterol	109.3	25.69	11.4-15.6	158.1	11.11	4.5-13.0	176.6	7.77	7.0-9.0
β-Sitosterol	267.8	63.01	32.6-50.7	1020.8	71.69	42.0-70	1472.8	64.79	45.0-53.0
Esteroides totales	425.4	-	400-1200	1423.2	-	1700-5200	2273.4	-	2300-6900

Tabla 4.2. Concentración de esteroides en muestras de aceite de coco, aceite de girasol y aceite de linaza procedentes de Brasil. Comparación con la norma CODEX-STAN 210-1999. Fuente: Da Silva et al., 2022.

4.3. Estudios de detección de fraude y adulteraciones

4.3.1. Adulteración de AOV con otros aceites de oliva de inferior calidad (refinado/deodorizado y de orujo).

El aceite de oliva refinado y el aceite de orujo de oliva comparten el hecho de haber sido sometidos al proceso de refinado. En la tabla 4.3. se representa la composición de estigmasta-3,5-dieno para aceite de oliva virgen extra puro, aceite de oliva refinado, aceite de orujo de oliva y sus respectivas mezclas con diferentes porcentajes. Se observa que la presencia de estigmasta-3,5-dieno en el AOVE es prácticamente nula, pero aumenta significativamente cuando se mezcla con aceite de oliva refinado (ROO) o con aceite de orujo de oliva (RPOO). Según el reglamento, el límite máximo permitido de estigmastadienos en aceites de oliva vírgenes es de 0,15 mg/kg, lo que permite detectar la adulteración de AOVE con aceite refinado a partir del 0.4% y con aceite de orujo a partir del 1% (figura 4.3) (García, Martins y Cabrita, 2013; Jabeur, Zribi y Bouaziz, 2015).

	AOVE	ROO	AOVE+0%	AOVE+0.2%	AOVE+0.3%	AOVE+0.4%	AOVE+0.5%	AOVE+1%	AOVE+2%	AOVE+3%	AOVE+4%	AOVE+5%	AOVE+10%
Estigmasta-3,5-dieno (mg/kg)	0.007	4.25	0.009	0.013	0.015	0.022	0.029	0.039	0.081	0.113	0.155	0.200	0.414
	AOVE	RPOO	AOVE+0.1%	AOVE+0.2%	AOVE+0.3%	AOVE+0.4%	AOVE+0.5%	AOVE+1%	AOVE+2%	AOVE+3%	AOVE+4%	AOVE+5%	AOVE+10%
Estigmasta-3,5-dieno (mg/kg)	0.007	12.54	0.017	0.029	0.041	0.062	0.077	0.117	0.218	0.324	0.422	0.533	1.172

Tabla 4.3. Contenido de estigmasta-3,5-dieno del AOVE, ROO Y RPOO y de mezclas de AOVE con ROO Y RPOO con diferentes porcentajes de cada aceite refinado. Fuente: Jabeur, Zribi y Bouaziz, 2015.

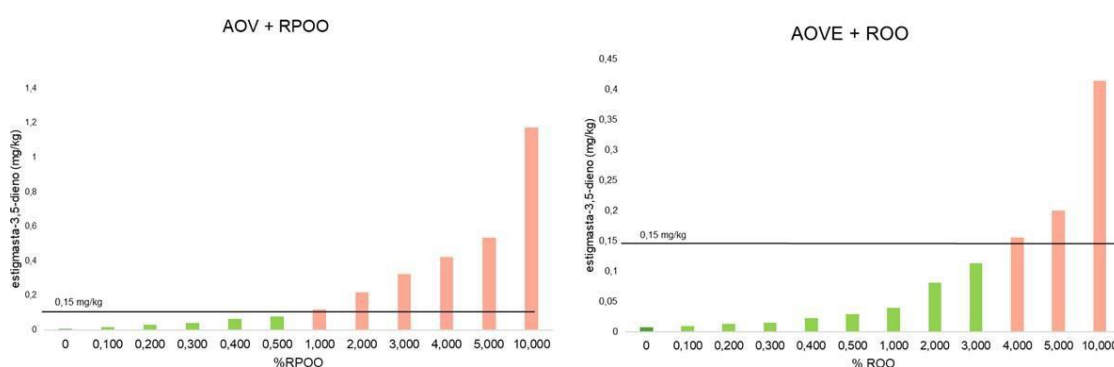


Figura 4.3. Representación gráfica de la tabla 4.3. Fuente: Elaboración propia.

4.4. Adulteración de AOVE con aceites de semilla y otros aceites vegetales.

4.4.1. Aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de semilla de uva, aceite de semilla de algodón.

Los aceites extraídos a partir de semillas presentan una composición similar (semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de soja, maíz) y con frecuencia son adulterantes del aceite de oliva virgen. A partir de los cromatogramas obtenidos a partir del análisis de una muestra de aceite de oliva virgen y de aceite de oliva virgen adulterado al 10% con aceite de maíz, aceite de girasol y aceite de soja podemos observar una clara diferencia en el perfil de esteroides de cada muestra (Figura 4.3, izquierda). La adición de aceites de soja, girasol y maíz al aceite de oliva virgen incrementa los porcentajes de campesterol y estigmasterol, superando los límites permitidos para un aceite de oliva virgen, y a su vez, disminuye el contenido de β -sitosterol por debajo del mínimo legal establecido (93%). Así, las concentraciones de campesterol, estigmasterol y β -sitosterol pueden utilizarse como indicadores confiables para detectar la adulteración del aceite de oliva con aceites de semillas (Al-Ismael et al., 2010; Jabeur et al., 2014; Gómez-Coca et al., 2020; Kesen, 2019; Srigley et al., 2015; Youseff et al., 2014).

El análisis de la fracción de esteroides, junto con su composición en triglicéridos y los factores ECN46 Y (ECN44+ECN46), se han convertido en un conjunto de parámetros clave para identificar adulteraciones en el aceite de oliva virgen. Estos datos pueden someterse a Análisis Discriminante Lineal (ADL) con el objetivo de crear un modelo predictivo de clasificación para detectar adulteraciones. Un ejemplo de este enfoque es el gráfico de funciones discriminantes que se muestra en la figura 4.3 (derecha), obtenido mediante ADL, que evidencia una discriminación clara entre el aceite de oliva virgen extra y sus respectivas mezclas con aceite de soja, maíz y girasol en distintos porcentajes (1, 2, 3, 4, 5 y 10%) (Jabeur et al., 2014).

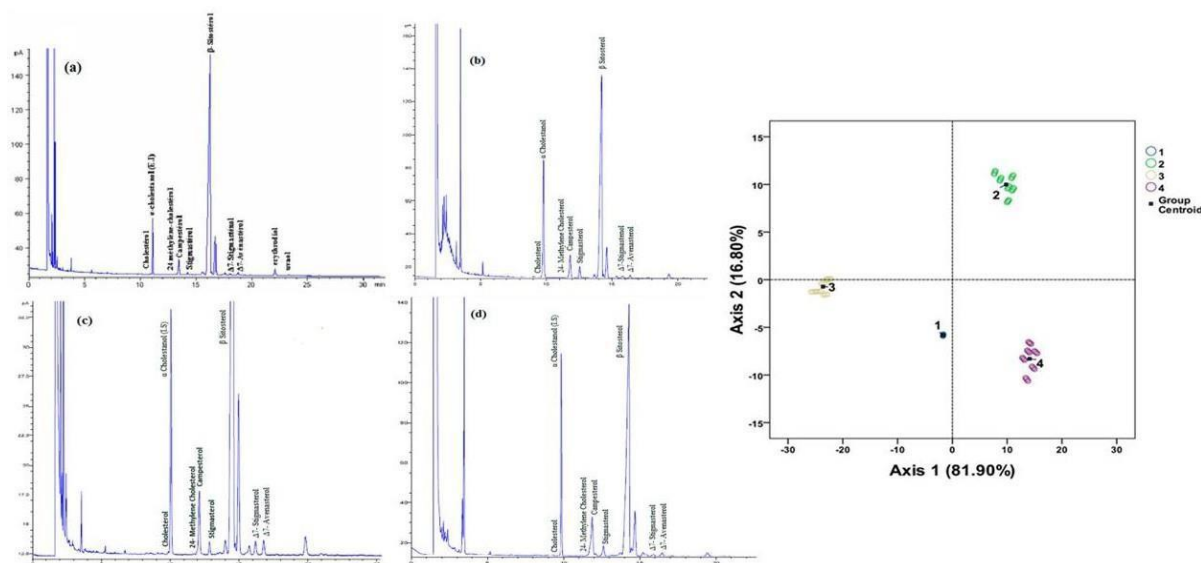


Figura 4.4. **Izquierda.** Cromatograma de gases obtenido del análisis de (a) Aceite de oliva virgen; (b) Aceite de Oliva Virgen adulterado al 10% con aceite de soja; (c) Aceite de oliva virgen adulterado al 10% con aceite de girasol; (c) Aceite de Oliva Virgen. **Derecha.** Gráfico obtenido por ADL para aceites de oliva virgen extra puro y aceite de oliva virgen extra adulterado con cuatro determinaciones: 1) AOVE; 2) AOVE + 1-10% aceite de soja; 3) AOVE + 1-10% aceite de maíz; 4) AOVE + 1-10% aceite de girasol. Adaptado de Jabeur et al., 2014, con permiso de la editorial ACS.

Para cuantificar el nivel de adulteración se ha desarrollado una ecuación matemática, denominada “factor de autenticidad” (Af), que se calcula a partir de los porcentajes de campesterol y estigmasterol en la muestra de la siguiente manera (Al-Ismail et al., 2010):

$$Af = \frac{[100 - (\text{Campesterol}\% + \text{estigmasterol}\%)]}{(\text{campesterol}\% + \text{estigmasterol}\%)}$$

Este factor tiene un valor promedio de 21.99 para aceites de oliva vírgenes auténticos. Sin embargo, en aceites vegetales como el de maíz, girasol, soja y semillas de algodón, el valor de Af es significativamente menor, con valores promedio de 2.42, 2.9, 2.04 y 2.15, respectivamente (tabla 4.5) (Al-Ismail et al., 2010).

Muestra	Maíz	Girasol	Soja	Semilla de algodón
Campesterol	20.53	12.26	18.16	20.14
Estigmasterol	8.74	8.90	14.74	11.62
Af	2.42	2.9	2.04	2.15

Tabla 4.5. Factores de autenticación (Af) para los aceites de maíz, girasol, soja y semilla de algodón. Fuente: Al-Ismail et al., 2010.

Cuando el aceite de oliva virgen se mezcla con aceites vegetales, el Af disminuye drásticamente (figura 4.5) (tabla 4.6), lo que permite detectar adulteraciones desde el 5%. Por ejemplo, una mezcla con un 5% de aceite de maíz reduce el Af del aceite de oliva de 24.45 a 9.9., representando una reducción del 40.5%. Estos cambios en el Af facilitan la identificación de adulteraciones mediante un método cuantitativo que complementa otros análisis del perfil de esteroides (Al-Ismail et al., 2010).

	% de aceite vegetal en aceite de oliva											
	Maíz			Girasol			Soja			Semilla de algodón		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
Campesterol	6.4	9.6	12.8	4.4	5.5	6.8	4.9	6.2	8.6	4.5	5.3	8.1
Estigmasterol	2.8	3.9	5.4	2.5	3.5	5.4	2.5	4.3	5.9	2.3	3.5	4.4
Af	9.9	6.4	4.5	13.5	10.1	7.2	12.5	8.5	5.9	13.7	10.4	7.0

Tabla 4.6. Valores de estigmasterol, campesterol y Af al aumentar el porcentaje de aceite adulterante en la mezcla. Fuente: Al-Ismail et al., 2010.

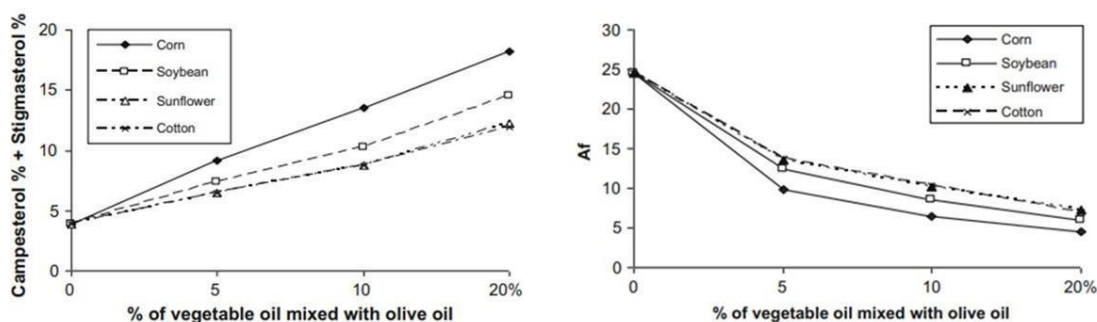


Figura 4.5. Representaciones graficas sobre la relación entre el porcentaje de campesterol y estigmasterol y el factor de autenticidad (Af) al aumentar el porcentaje de aceite adulterante en la mezcla. Adaptado de Al-Ismail et al., 2010, con permiso de la editorial Elsevier.

4.4.2. Aceite de colza

El aceite de colza ha sido utilizado como adulterante del aceite de oliva en España, especialmente en la década de 1980, cuando se mezclaba un aceite de colza desnaturalizado con anilina al 2% (destinado para uso industrial) con otros aceites, que luego se vendían como aceite de oliva a un precio reducido. Esta práctica fraudulenta provocó graves intoxicaciones alimentarias, originando la crisis conocida como el Síndrome del Aceite Tóxico en 1981. Desde entonces, el uso de aceite de colza como adulterante ha sido objeto de numerosos estudios para evitar futuras adulteraciones (Carnero et al., 2011).

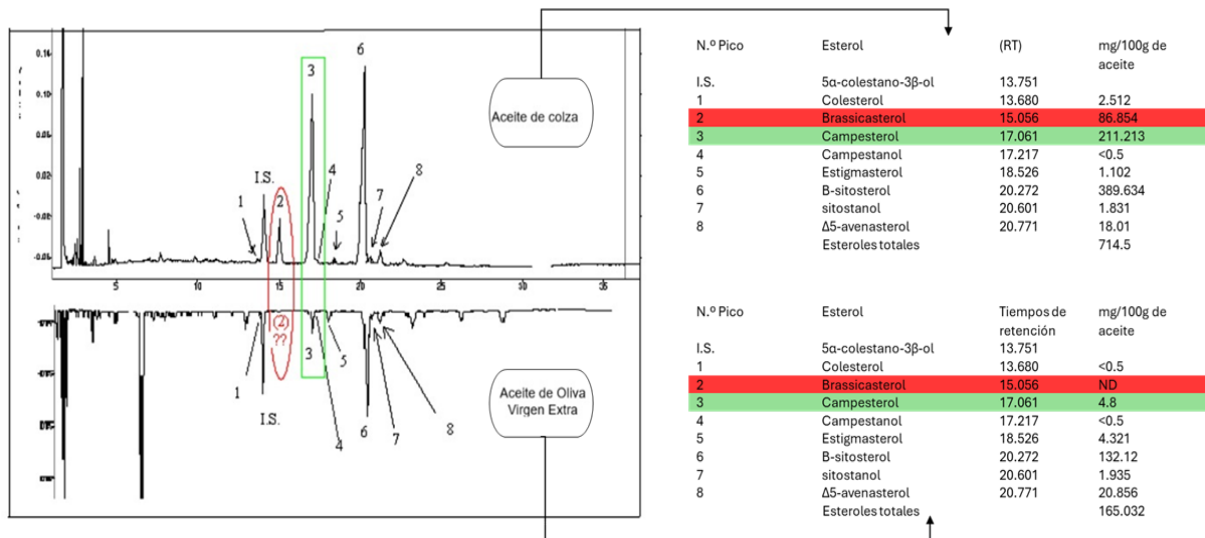
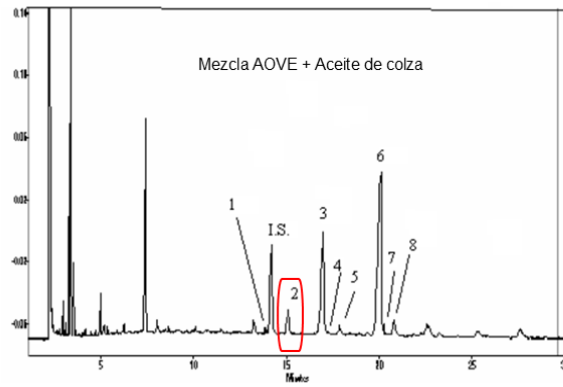


Figura 4.7. Cromatogramas obtenidos por GC-FID para un aceite de colza y un aceite de oliva virgen extra. Adaptado de Dulf et al., 2007, con permiso de la Universidad de Ciencias Agrarias y Medicina Veterinaria de Cluj-Napoca.

El aceite de colza presenta un perfil de esteroides muy diferente al del aceite de oliva. Los análisis por GC-FID muestran que el aceite de colza se puede identificar claramente por la presencia de brassicasterol (ver pico número 2 en los cromatogramas de la figura 4.7), un esteroide característico de este aceite que está ausente en el aceite de oliva (Dulf et al., 2007).

El perfil total de esteroides del aceite de oliva adulterado con aceite de colza es totalmente diferente al perfil de esteroides del aceite de oliva puro, principalmente por la presencia del pico 2 (brassicasterol) el cual debería de estar ausente (figura 4.8). Además de esto, se observa un contenido total de esteroides mayor en el aceite de colza (714.5 mg/100g aceite) que el aceite de oliva (165.032 mg/100g aceite), y un contenido mayor de campesterol (pico 3) y β -sitosterol (pico 6). Al añadir aceite de colza al AOVE se observa que el contenido total de esteroides aumenta considerablemente (370.344 mg/100 g aceite de oliva adulterado), al igual que aumenta la cantidad de campesterol y β -sitosterol (Dulf et al., 2007).



N.º Pico	Esterol	(RT)	mg/100g de aceite
I.S.	5 α -colestano-3 β -ol	13.751	
1	Colesterol	13.680	0.86
2	Brassicasterol	15.056	29.213
3	Campesterol	17.061	98.865
4	Campestanol	17.217	0.651
5	Estigmasterol	18.526	4.521
6	B-sitosterol	20.272	218.365
7	sitostanol	20.601	2.013
8	Δ^5 -avenasterol	20.771	21.856
	Esteroles totales		370.344

Figura 4.8. Cromatograma obtenido por GC-FID para una mezcla de aceite de oliva virgen y aceite de colza (% sin especificar). Adaptado de Dulf et al., 2007 con permiso de la Universidad de Ciencias Agrarias y Medicina Veterinaria de Cluj-Napoca.

4.4.3. Aceite de avellana

La adulteración del aceite de oliva con aceite de avellana es una de las más difíciles de detectar debido que tienen una composición en esteroides muy parecida. Hasta el momento hay dos métodos los cuales nos permiten detectar aceite de avellana en aceite de oliva. Uno de ellos consiste en el análisis por GC-FID de las fracciones de 4-desmetilesteroides, 4-monometilesteroides y 4,4'-dimetilesteroides para el aceite de avellana y para el aceite de oliva y hacer una comparación, con el objetivo de encontrar algún esteroide significativo para cada tipo de aceite. Los resultados no muestran diferencias significativas en la fracción de 4- desmetilesteroides y 4-monometilesteroides, sin embargo, en la fracción de 4,4'-dimetilesteroides encontramos un compuesto X desconocido y lupeol únicamente presentes en el aceite de avellana (tabla 4.7), lo cual puede indicar la presencia de aceite de avellana en aceite de oliva (Azadmard-Darmichi y Dutta, 2006).

Compuesto	RT	Aceite de avellana ug/g aceite (%)					Aceite de oliva virgen ug/g aceite (%)		
		Nueva Zelanda	Nueva Zelanda	Irán	Italia	Turquía	Italia	Nueva Zelanda	España
4,4'-Dimetilesteroles									
Compuesto X	1.4	4.4	5.5	1.7	1.9	1.1	ND	ND	ND
δ-Amirina	1.43	4.6	7.0	2.5	1.5	2.5	10.5	20.1	12.3
Taraxerol	1.45	ND	ND	ND	ND	ND	6.7	23.9	7.0
B-Amirina	1.47	1.6	2.0	1.1	1.2	1.4	25.7	58.3	30.7
Cicloartenol	1.54	5.8	4.6	2.3	2.0	3.6	151.9	182.1	75.0
Lupeol	1.56	5.7	8.5	8.0	3.4	8.9	ND	ND	ND
Δ7-Esterol	1.58	1.3	1.8	1.1	1.3	1.3	2.5	2.4	2.3
24-metileno- cicloartanol	1.64	11.7	18.1	10.8	6.2	10.1	178.5	302.8	173.4
Desconocido		17.2	19.0	16.5	13.4	17.7	36.8	105.2	28.5
Total		52.3	66.5	44.0	30.9	46.6	402.6	694.7	392.2
4,4'-Dimetilesteroles									

Tabla 4.7. Porcentaje de esteroides en diferentes muestras de aceite de avellana y aceite de oliva virgen. Fuente: Azadmard-Darmichi y Dutta, 2006.

Una de las características distintivas del lupeol es su patrón de fragmentación en GC/MS. El Lupeol muestra un pico característico en m/z 189, que se utiliza como ion fragmentado diagnóstico para identificarlo y diferenciarlo de otros compuestos triterpénicos y esteroides, el lupeol además de ser característico del aceite de avellana, también lo es del aceite del espinillo de mar y de la manteca de karité (Darmichi et al., 2005; Schalag et al., 2023).

4.4.4. Aceites de vegetales refinados

Como hemos visto en el apartado 1, cuando un aceite es sometido a refinación aumenta la concentración de esteroides esterificados y baja la de esteroides libres, lo cual es utilizado como indicador de la presencia de aceite refinado, como el aceite de girasol refinado en el aceite de oliva virgen. Estudios muestran que incluso una adición del 2% de aceite de girasol refinado (RSO) provoca un aumento significativo en los compuestos esterificados, de 360 mg/kg en el aceite de oliva virgen puro a 410 mg/kg en la mezcla adulterada (figura 4.9). Este cambio también disminuye la relación entre esteroides libres y esterificados, pasando de 4.7 a 4.1. A medida que aumenta el porcentaje de aceite de girasol, se observan incrementos lineales en los compuestos esterificados, alcanzando 850 mg/kg en mezclas con un 20% de aceite de girasol, lo que permite detectar la adulteración (Valli et al., 2021).

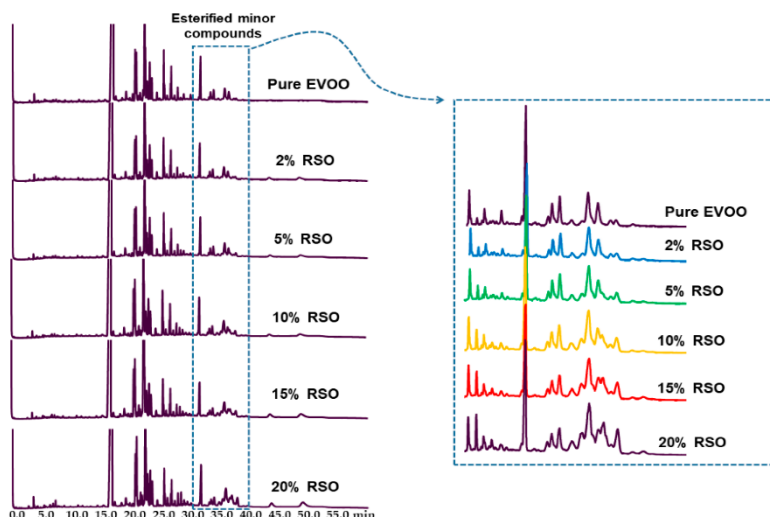


Figura 4.9. Resultados para el análisis de aceite de oliva virgen extra mezclado con aceite de girasol refinado. Adaptado de Valli et al., 2021, con permiso de la editorial Elsevier.

También existe la situación de que el aceite de oliva adulterado haya sido refinado, por lo que presenta una concentración de esteroides esterificados más elevada y es más difícil de detectar. Un estudio ha evaluado la capacidad de determinar una mezcla de aceite de oliva (refinado) adulterado con aceite de avellana refinado. Como se muestra en la tabla 4.8, al aumentar el porcentaje de aceite de avellana en una mezcla con aceite de oliva refinado, se observa un incremento lineal en los niveles de campesterol y Δ^7 -estigmasterol, tanto en formas libres como esterificadas, a excepción del Δ^7 -avenasterol esterificado. El aceite de avellana al tener más concentración de campesterol y Δ^7 -estigmasterol libre, en consecuencia, tendrá mayor concentración de estos en forma esterificada que el aceite de oliva (Mariani et al., 2006).

% de aceite de avellana en Aceite de Oliva	Esteroides esterificados (%)			Esteroides libres (%)		
	Campesterol	Δ^7 -estigmasterol	Δ^7 -avenasterol	Campesterol	Δ^7 -estigmasterol	Δ^7 -avenasterol
0%	3.30	0.42	1.00	3.13	0.10	0.24
>0% y <8%	3.48	0.48	0.86	3.20	0.18	0.21
>8% y ≤20%	3.53	0.59	0.92	3.37	0.25	0.24
100%	5.32	1.71	1.15	5.09	1.31	0.56

Tabla 4.8. Concentración (%) de Campesterol, Δ^7 -estigmasterol, Δ^7 -avenasterol (libres y esterificados) en diferentes mezclas de Aceite de Oliva con aceite de avellana (0-20%). Fuente: Mariani et al., 2006.

Basándose en estos cambios, se han desarrollado las ecuaciones matemáticas R1 y

R2 (tabla 4.9) capaces de identificar mezclas de aceite de aceite de avellana y aceite de oliva cuando el porcentaje de adulteración es superior al 8%. Estas ecuaciones han demostrado ser efectivas tanto en aceites de oliva vírgenes como refinados, y se pueden extrapolar a otros aceites de semillas como adulterantes (Cercaci et al., 2003; Mariani et al., 2006).

Concentración esteroides esterificados		$R_1 = \text{campesterol} \frac{(\Delta^7 - \text{estigmasterol})^2}{\Delta^7 - \text{avenasterol}}$
< 200 mg/kg	$R_1 < 1.6$	Aceite de oliva genuino
	$R_1 \geq 1.6$	Aceite de oliva no genuino
200-600mg/kg	$R_1 < 1.0$	Aceite de oliva genuino
	$R_1 \geq 1.0$	Aceite de oliva no genuino
>600 mg/kg	$R_1 < 1.0$	Aceite de oliva genuino
	$R_1 \geq 1.0$	Calcular R_2
$R_2 = \Delta^7 - \text{estigmasterol libre (mg} \cdot \text{kg}^{-1}) \times \frac{\Delta^7 - \text{estigmasterol libre (\%)}}{\Delta^7 - \text{estigmasterol esterificado (\%)}}$		
	$R_2 < 0.5$	Aceite de oliva genuino
	$0.6 < R_2 < 0.5$	No es posible determinar
	$R_2 \geq 0.5$	Aceite de oliva no genuino

Tabla 4.9. Ecuaciones R_1 y R_2 . Fuente: Mariani et al., 2006.

4.5. Otras adulteraciones de aceites vegetales.

A continuación, se muestran unos ejemplos prácticos encontrados en la bibliografía que aplican la cromatografía de gases al estudio de mezclas entre aceites vegetales distintos al aceite de oliva.

4.5.1. Aceite de maíz adulterado con aceite de colza.

El aceite de colza como hemos visto anteriormente presenta una concentración elevada de brassicasterol. En un estudio en el que adulteran aceite de maíz con aceite de colza al 5%, 10% y 20% se observa que al aumentar el contenido de aceite de colza en la mezcla se produce un aumento lineal de la concentración de brassicasterol mientras que los demás esteroides no presentan evidencias distintivas (Youseff et al., 2014).

4.5.2. Aceite de semilla de Níger y aceite de sésamo adulterados con aceite de palma

El análisis por GC-MS de la fracción insaponificable de los aceites de semilla de níger, sésamo y palma reveló que el β -sitosterol es el principal esteroles en los tres aceites, con concentraciones de 2778,96 mg/kg, 927,42 mg/kg y 467,2 mg/kg, respectivamente. En el aceite de níger, los siguientes esteroides más abundantes son el campesterol (869,85 mg/kg) y el estigmasterol (920,46 mg/kg), mientras que en el aceite de sésamo el campesterol (351,23 mg/kg) y el estigmasterol (125,73 mg/kg) representan más del 85 % del contenido total de esteroides. En el aceite de palma, además del β -sitosterol y el campesterol (295,9 mg/kg), se detectó exclusivamente el 24-Nor-22,23-methylenecholest-5-en-3 β -ol TMS éter (139,14 mg/kg) y colesterol, lo que sugiere que estos compuestos pueden usarse como marcadores para detectar adulteraciones con aceite de palma (Deme et al., 2021).

4.5.3. Aceite de linaza adulterado con aceite de colza, aceite de maní, aceite de girasol y aceite de sésamo.

Para evaluar la adulteración del aceite de linaza con otros aceites vegetales, se analizó la concentración de los cuatro esteroides principales identificados en los aceites de linaza, colza, soja, cacahuete y sésamo, cuyos resultados se presentan en la tabla 4.10. El análisis mostro que las variaciones en el perfil de esteroides permiten distinguir estos aceites entre sí, destacando el cicloartenol como un marcador específico que se encuentra exclusivamente en el aceite de linaza y permite detectar posibles adulteraciones (Yang et al., 2024).

Muestra	de	Esteroides (mg/100g)				
		Campesterol	Estigmasterol	β -sitosterol	Cicloartenol	Esteroides totales
Aceite linaza		64.96±6.70	18.47±2.61	126.58±13.44	106.43±15.05	316.44±3.20
Aceite colza		170.33±0.53	10.88±0.51	289.34±2.15	0.00	470.55±0.65
Aceite cacahuete		32.20±1.39	13.29±0.06	112.46±0.94	0.00	157.95±1.32
Aceite girasol		25.45±0.63	17.27±1.46	174.79±2.33	0.00	217.51±6.52
Aceite sésamo		220.81±4.70	25.55±0.16	267.99±3.46	0.00	516.35±10.61

Tabla 4.10. Contenido de esteroides (mg/kg) en el aceite de linaza, aceite de colza, aceite de cacahuete, aceite de girasol y aceite de sésamo. Fuente: Yang et al., 2024.

Se aplicaron técnicas de análisis de conglomerados (CA) y análisis discriminante (DA) para procesar los datos obtenidos. El CA clasificó 60 muestras (incluyendo puras y adulteradas) en cinco grupos, logrando una precisión del 100% en la agrupación de las muestras puras según su contenido de cicloartenol. Las muestras adulteradas se distribuyen en diferentes grupos, facilitando su diferenciación respecto a las puras. El análisis discriminante (DA) se utilizó para identificar el tipo de aceite que actúa como adulterante. Esta técnica permitió detectar mezclas de aceite de linaza con aceite de colza, cacahuete y girasol cuando estaban presentes en concentraciones superiores al 20% y con aceite de sésamo a partir del 30%. La combinación de ambas técnicas quimiométricas no solo identifica la presencia de adulteraciones, sino que también ofrece información precisa sobre la naturaleza de los aceites adulterantes (Yang et al., 2024).

5. CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Grado se ha realizado una revisión bibliográfica sobre el análisis de esteroides como marcadores de autenticidad en aceites vegetales. La búsqueda ha sido acotada a estudios que empleen el método oficial de análisis, cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), o cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS).

Se ha evaluado la capacidad de esteroides para evaluar la autenticidad de Aceite de Oliva Virgen y de otros aceites vegetales, y se obtienen los siguientes marcadores específicos:

- El perfil de esteroides nos permite diferenciar entre muestras de la misma especie, pero con diferente origen geográfico. Los esteroides específicos β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, Δ^5 -avenasterol, Δ^5 -estigmasterol y colesterol, junto con la concentración de esteroides totales (mg/kg) nos permiten diferenciar muestras de aceite de oliva salvaje de varias regiones de Marruecos. Al aplicar el análisis de componentes principales a la concentración nos permite crear un modelo predictivo que asigna patrones a cada tipo de aceite.

- El análisis de componentes principales para muestras de aceite de oliva de variedades griegas e italianas revela que el β -sitosterol es un marcador clave de la variedad griega Lianolia Kerkyras, mientras que el 24-metilen-colesterol, campestanol, Δ^5 -avenasterol y $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol se asociaron predominantemente con las variedades italianas (Coratina, Peranzana y Favolozza).
- El análisis de componentes principales también nos permite diferenciar entre aceites de oliva italianos y no italianos (España, Túnez, Mezcla UE) en función de nueve variables: esteroides esterificados totales, sitosteril-C16, campesteril-C18, cicloartenil-C18, 24-metilencicloartenil-C18, campesterol, β -sitosterol aparente, β -sitosterol y esteroides totales.
- Para aceites vegetales específicos, la autenticidad se evalúa haciendo una comparación directa de la concentración de desmetilesteroides (%) con la norma CODEX STAN 210-1999 (%) las diferencias encontradas pueden deberse a adulteraciones, factores climáticos o un refinado agresivo. Para hacer una determinación exacta debemos ampliar el análisis.

Respecto a la capacidad de los esteroides para discriminar mezclas de aceites obtenemos los siguientes marcadores específicos:

- La presencia de estigmastadienos en el aceite de oliva virgen por encima de 0.15 mg/kg indica la presencia de aceite refinado. Si el estigmastadieno predominante es el estigmasta-3,5-dieno, el aceite adulterante es un aceite de orujo o aceite de oliva refinado.
- Un valor más bajo de esteroides totales (mg/kg) en aceite de oliva virgen se relaciona con la presencia de aceites de semilla o de aceites desodorizados.
- Un aumento en la concentración de campesterol (%) y estigmasterol (%) y la disminución en la concentración de β -sitosterol (%) se relaciona con la presencia de aceite de semillas.
- Un aumento en la concentración de brassicasterol (%) en aceite de oliva virgen o en aceite de maíz, se relaciona con la presencia de aceite de colza. Se puede extrapolar a todos los aceites con una concentración inicial baja de brassicasterol (%).

- Un aumento en la concentración de colesterol (%) y la presencia de 24-Nor- 22,23-methilenecolest-5-en-3 β -ol TMS éter en el aceite de semilla de niger y de sésamo se relaciona con la presencia de aceite de palma.
- El clicoartenol solo es detectable en el aceite de linaza por lo que puede utilizarse como marcador.

Con esto concluimos que el análisis de esteroides mediante cromatografía de gases es una herramienta ampliamente utilizada para evaluar la autenticidad de los aceites vegetales, especialmente el Aceite de Oliva Virgen, y nos proporciona una serie de parámetros que pueden ser aplicados en un laboratorio de rutina. Actualmente se están empleando nuevas técnicas para el análisis de esteroides en aceites vegetales, como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), que no requiere derivatización de los esteroides o las técnicas espectroscópicas, las cuales son no destructivas para la muestra, con el objetivo de disminuir los tiempos del análisis y la cantidad de disolventes empleados.

6. BIBLIOGRAFIA

- Al-Ismael, K. M., Alsaed, A. K., Ahmad, R., y Al-Dabbas, M. (2010). Detection of olive oil adulteration with some plant oils by GLC analysis of sterols using polar column, *Food Chemistry*, 121(4), 1255-1259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.016>
- Aparicio, R., y Aparicio-Ruiz, R. (2000). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal Of Chromatography A*, 881(1-2), 93-104. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00355-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00355-1)
- Aparicio, R., y Harwood, J. (2013). *Handbook of Olive Oil and Properties* (2^a ed.). Springer.
- Azadmard-Damirchi, S., y Dutta, P. C. (2006). Novel solid-phase extraction method to separate 4-desmethyl-, 4-monomethyl-, and 4,4'-dimethylsterols in vegetable oils. *Journal Of Chromatography A*, 1108(2), 183-187.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.015>

- Baccouri, B., Manai, H., Casas, J., Osorio, E., y Zarrouk, M. (2018). Tunisian wild olive (*Olea europaea* L. subsp. *oleaster*) oils: Sterolic and triterpenic dialcohol compounds. *Industrial Crops And Products*, 120, 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.035>
- Bai, G., Ma, C., y Chen, X. (2020). Phytosterols in edible oil: Distribution, analysis and variation during processing. **Grain & Oil Science And Technology**, 4(1), 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2020.12.003>
- Carnero, P. R., Sánchez, M. C., Collado, Z. M., Moreno, J. D., y Sanz, N. M. (2011). El síndrome del aceite tóxico: 30 años después. *Revista Española de Medicina Legal*, 37(4), 155-161. [https://doi.org/10.1016/s0377-4732\(11\)70082-7](https://doi.org/10.1016/s0377-4732(11)70082-7)
- Cercaci, L., Rodriguezestrada, M., y Lercker, G. (2003). Solid-phase extraction–thin-layer chromatography–gas chromatography method for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols. *Journal Of Chromatography A*, 985(1-2), 211-220. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)01397-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)01397-3)
- Chapa, E., Brusius, M., Krepich, S., Aqeel, Z., y Detsch, J. (s.f.). Determination of sterols in olive oil using supported liquid extraction (SLE), solid phase extraction (SPE), and GC-FID. Phenomenex, Inc. Recuperado de <https://az621941.vo.msecnd.net/documents/64199b1e-0fe9-4155-8c2b-b788eb507c8a.pdf>
- Codex Alimentarius. (1981). Norma para los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva. CXS 33-1981. Adoptada en 1981. Revisada en 1989, 2003, 2015, 2017. Enmendada en 2009, 2013, 2021.
- Codex Alimentarius. (1999). Norma para aceites vegetales especificados. CXS 210-1999. Adoptada en 1999. Revisada en 2001, 2003, 2009, 2017, 2019. Enmendada en 2005, 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2022, 2023.
- Da Silva, S., Sampaio, G., y Torres, E. (2020). Phytosterols Content in Vegetable Oils of Brazil: Coconut, Safflower, Linseed and Evening Primrose. *Food/Feed*

- Science and Technology, 63. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020190216>
- Damirchi, S. A., Savage, G. P., y Dutta, P. C. (2005). Sterol fractions in hazelnut and virgin olive oils and 4,4'-dimethylsterols as possible markers for detection of adulteration of virgin olive oil. *Journal Of The American Oil Chemists Society*, 82(10), 717-725. <https://doi.org/10.1007/s11746-005-1133-y>
- Deme, T., Haki, G. D., Retta, N., Woldegiorgis, A., Geleta, M., Mateos, H., y Lewandowski, P. A. (2021). Sterols as a biomarker in tracing niger and sesame seeds oils adulterated with palm oil. *Heliyon*, 7(4), e06797. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06797>
- Dulf, F. V., Bele, C., Ungursesan, M y Socacio, C. (2007). Qualitative and quantitative markers to identify the quality and adulteration of olive oil with rapeseed oil. *University of Agriculture Science and Vererinary Medicine, Bulletin USAMV-CN*, 63/2007.
- Dulf, F.V., Ungursesan, M., Vodnar, D. y Socaciu, C. (2010). Free and Esterified Sterol Distribution in Four Romanian Vegetable Oil. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 38(2), 91-97.
- Garcia, R., Martins, N., y Cabrita, M. J. (2013). Putative markers of adulteration of extra virgin olive oil with refined olive oil: Prospects and limitations. *Food Research International*, 54(2), 2039-2044. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.008>
- Garcia-González, D. L., Casadei, E., Aparicio-Ruiz, R., Romero, C. O., Valli, E., Brereton, P., Koidis, A., Korytkowska, M., Servili, M., Selvaggini, R., Lacoste, F., Escobessa, J., Vichi, S., Quintanilla-Casas, B., Tres, A., Golay, P., Lucci, P., Moret, E., Bendini, A., y Toschi, T. G. (2023). Multianalyte analysis of volatile compounds in virgin olive oils using SPME-GC with FID or MS detection: results of an international interlaboratory validation. *European Journal Of Lipid Science And Technology*. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202300079>
- Gagour, J., Ghailassi, K. E., Ibourki, M., Sakar, E. H., & Gharby, S. (2024). Physicochemical traits of olive fruit and oil from eight Moroccan wild olive (*Olea europaea* L. Subsp. *Oleaster*) populations. *Biocatalysis And Agricultural*

- Biotechnology, 56, 103021. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103021>
- Gharby, S., Harhar, H., Monfalouti, H. E., Kartah, B., Maata, N., Guillaume, D., y Charrouf, Z.(2011). Chemical and oxidative properties of olive and argan oils sold on the Moroccan market. A comparative study. *Mediterranean Journal Of Nutrition And Metabolism*, 5(1), 31-38. <https://doi.org/10.3233/s12349-011-0076-5>
- Giacalone, R., Giuliano, S., Gulotta, E., Monfreda, M., y Presti, G. (2015). Origin assessment of EV olive oils by esterified sterols analysis. *Food Chemistry*, 188, 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.139>
- Gómez-Coca, R. B., Alassi, M., Moreda, W., y Del Carmen Pérez-Camino, M. (2020). Pyropheophytin a in Soft Deodorized Olive Oils. *Foods*, 9(8), 978. <https://doi.org/10.3390/foods9080978>
- Gómez-Coca, R. B., Del Carmen Pérez-Camino, M., Martínez-Rivas, J. M., Bendini, A., Toschi, T. G., y Moreda, W. (2020). Olive oil mixtures. Part one: Decisional trees or how to verify the olive oil percentage in declared blends.*Food Chemistry*, 315, 126235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126235>
- Green, H. S., & Wang, S. C. (2023). Purity and quality of private labelled avocado oil. *Food Control*, 152, 109837. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109837>
- International Olive Council. (2017). Method for the determination of stigmastadienes in vegetable oils. COI/T.20/Doc. No 11/Rev. 3. Enlace web: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2022/06/COI-T.20-Doc.11-REV-3-2017-Eng.pdf>
- International Olive Council. (2020). Determination of the sterol composition and content and alcoholic compounds by capillary gas chromatography. COI/T.20/Doc. No 26/Rev. 4. Enlace web: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/07/COI-T20-Doc-26-Rev5-EN-.pdf>
- Jabeur, H., Zribi, A., y Bouaziz, M. (2015). Extra-Virgin Olive Oil and Cheap Vegetable Oils: Distinction and Detection of Adulteration as Determined by GC and

- Chemometrics. *Food Analytical Methods*, 9(3), 712-723.
<https://doi.org/10.1007/s12161-015-0249-9>
- Jabeur, H., Zribi, A., Makni, J., Rebai, A., Abdelhedi, R., y Bouaziz, M. (2014). Detection of Chemlali Extra-Virgin Olive Oil Adulteration Mixed with Soybean Oil, Corn Oil, and Sunflower Oil by Using GC and HPLC. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 62(21), 4893-4904. <https://doi.org/10.1021/jf500571n>
- Kesen, S. (2019). Monitoring Fatty Acid and Sterol Profile of Nizip Yaglik Olive Oil Adulterated by Cotton and Sunflower Oil. *Journal Of Oleo Science*, 68(9), 817-826. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19130>
- Mariani, C., Bellan, G., Lestini, E., y Aparicio, R. (2006). The detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by free and esterified sterols. *European Food Research And Technology*, 223(5), 655-661. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0249-x>
- Mathison, B., y Holstege, D. (2013). A rapid method to determine sterol, erythrodiol, and uvaol concentrations in olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(19), 4506–4513. <https://doi.org/10.1021/jf400254k>
- Meco-López, J., Pascual, V., y Solá, R.** (2016). Using plant sterols in clinical practice: From the chemistry to the clinic. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 28(6), 283-294. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2016.04.001>
- Moreau, R. A., Nyström, L., Whitaker, B. D., Winkler-Moser, J. K., Baer, D. J., Gebauer, S. K., y Hicks, K. B. (2018). Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Progress In Lipid Research*, 70, 35-61. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.001>
- Normén, L., Ellegård, L., Brants, H., Dutta, P., y Andersson, H.** (2007). A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 20(3-4), 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.06.002>
- Nyström, L., Schär, A., y Lampi, A. (2012). Steryl glycosides and acylated steryl glycosides in plant foods reflect unique sterol patterns. *European Journal Of*

Lipid Science And Technology, 114(6), 656-669.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201200033>

Pérez-Castaño, E. (2013). Aplicabilidad del perfil de esteroides para la cuantificación de Aceite de oliva en alimentos. Tesis de la Universidad de Granada.

Plumb, J. A., Rhodes, M. J., Lampi, A. M., Buchgraber, M., y Kroon, P. A. (2011). Phytosterols in plant foods: Exploring contents, data distribution and aggregated values using an online bioactives database. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 24(7), 1024-1031. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.10.007>

Saini, R. K., Song, M., Yu, J., Shang, X., y Keum, Y. (2021). Phytosterol Profiling of Apiaceae Family Seeds Spices Using GC-MS. *Foods*, 10(10), 2378. <https://doi.org/10.3390/foods10102378>

Schlag, S., Schäfer, S., Sommer, K., y Vetter, W. (2024). A sterol database: GC/MS data and occurrence of 150 sterols in seventy-four oils. *Food Chemistry*, 460, 140778. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140778>

Skiada, V., Katsaris, P., Kambouris, M. E., Gkisakis, V., y Manoussopoulos, Y.** (2023). Classification of olive cultivars by machine learning based on olive oil chemical composition. *Food Chemistry*, 429, 136793. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136793>

Srigley, C. T., Oles, C. J., Kia, A. R. F., y Mossoba, M. M. (2015). Authenticity Assessment of Extra Virgin Olive Oil: Evaluation of Desmethylsterols and Triterpene Dialcohols. *Journal Of The American Oil Chemists Society*, 93(2), 171-181. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2759-4>

Srivastava, S., Pandey, V. K., Singh, K., Dar, A. H., Dash, K. K., Shams, R., Shaikh, A. M., y Kovács, B. (2024). Advances in detection technology for authentication of vegetable oils: A comprehensive review. *Heliyon*, 10(15), e34759. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34759>

Unión Europea. (2022). Reglamento (UE) 2022/2104 de la Comisión de 29 de julio de 2022 por el que se establecen disposiciones sobre normas de comercialización de los productos agrícolas y se modifica el reglamento (UE) nº. 1308/2013 del

Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, L 287, 50-56. Enlace web: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R2104>

Valli, E., Milani, A., Srbinovska, A., Moret, E., Moret, S., Bendini, A., Moreda, W., Toschi, T. G., y Lucci, P. (2021). In-House Validation of an SPE-GC-FID Method for the Detection of Free and Esterified Hydroxylated Minor Compounds in Virgin Olive Oils. *Foods*, 10(6), 1260. <https://doi.org/10.3390/foods10061260>

Yang, F., Wang, J., Han, Y., Li, Y., y Wang, S. (2024). Identification of adulteration of flaxseed oil from Qinghai area using GC-MS profiling of phytosterol composition and chemometrics. *Journal Of Food Protection*, 87(2), 100221. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100221>

Youseff, R., Soubh, L. y Alassaf, Z. (2014). Detection of vegetable oils adulteration using desmethylsterols composition. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 28(2), 229-223.