



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de
l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal

**ESTEROLES VEGETALES COMO INGREDIENTES
FUNCIONALES EN BEBIDAS A BASE DE ZUMO DE
FRUTAS: CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD**

Programa de doctorado: Ciencia de los Alimentos

Presentada por:

Marina González Larena

Dirigida por:

Dra. Guadalupe García Llatas

Dra. M^a Jesús Lagarda Blanch

Dra. Reyes Barberá Sáez

Burjassot, 26 de septiembre de 2014

Las Dras. Guadalupe García Llatas, M^a Jesús Lagarda Blanch y Reyes Barberá Sáez, Profesora Contratado Doctor y Catedráticas, respectivamente, del Area de Nutrició y Bromatologia del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal, de la Universitat de València.

CERTIFICAN QUE:

La licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Dña. Marina González Larena ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título “**Esteroles vegetales como ingredientes funcionales en bebidas a base de zumo de frutas: caracterización y estabilidad**”. El trabajo ha dado lugar a 4 artículos:

1. *Stability of plant sterols in ingredients used in functional foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2011) 59, 3624–3631. Índice de impacto (2013):3,107*
2. *Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources. Food Research International, (2012) 48, 265-270. Índice de impacto (2013): 3,050*
3. *Plant Sterols and Antioxidant Parameters in Enriched Beverages: Storage Stability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2012) 60, 4725–4734. Índice de impacto (2013): 3,107*
4. *Plant sterol oxides in functional beverages: influence of matrix and storage. Food Chemistry (en revisión). Índice de impacto (2013): 3,259.*

Por ello, autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que conste a los efectos oportunos,

En Burjassot, 26 de septiembre de 2014

Las Dras. Guadalupe García Llatas, M^a Jesús Lagarda Blanch y Reyes Barberá Sáez, directoras de la tesis doctoral presentada por Dña. Marina González Larena.

INFORMAN QUE:

La licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Dña. Marina González Larena ha contribuido en el trabajo que lleva por título “*Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plantsterol sources*” a partes iguales con Dña. Laia Alemany Costa. Este trabajo ha formado parte de la tesis doctoral de Dña. Laia Alemany Costa defendida en la Universitat de València el 16 de mayo de 2013.

En Burjassot, 26 de septiembre de 2014

Fdo: Guadalupe García Llatas Fdo: M^a Jesús Lagarda Blanch Fdo: Reyes Barberá Sáez

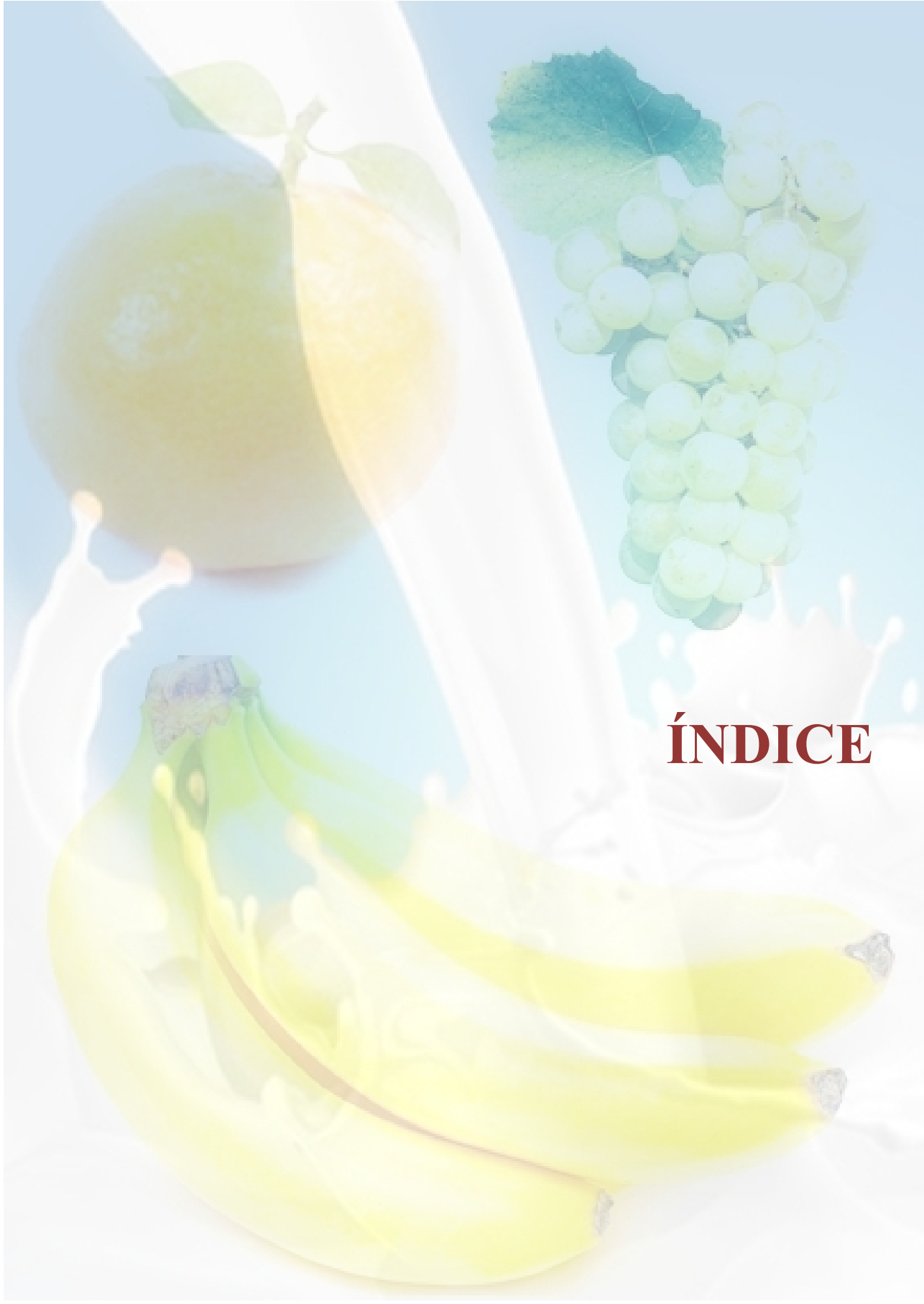
La presente tesis doctoral se ha realizado en el grupo *Bionutest*(03/003) y se enmarca en el proyecto AGL2008-02591-C02-01 “Óxidos de fitosteroles: formación, biodisponibilidad, citotoxicidad en bebidas a base de leche y zumo de frutas” financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN).

Ha sido parcialmente financiado por el proyecto Consolider-Ingenio 2010 CSD2007-00063 (Fun-C-Food).

La doctoranda Marina González Larena, ha disfrutado de una beca “Becas de investigación” Concedidas por el Instituto Danone, en el periodo entre diciembre 2008 y diciembre 2010.



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
Índice de cuadros	1
Índice de figuras	3
Abreviaturas	5
RESUMEN	9
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	15
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	19
1. Esteroles vegetales (EV)	19
1.1. Estructura	19
1.2. Contenidos de EV en alimentos.	22
1.3. Efectos biológicos	27
1.3.1. Hipocolesterolémico	27
1.3.1.1. Mecanismos de acción	29
1.3.1.2. Eficiencia de la dosis y tipo de EV	34
1.3.2. Anticarcinógeno	37
1.3.3. Antiinflamatorio	43
1.4. Fuentes de enriquecimiento en EV	46
1.4.1. Obtención industrial	46
1.4.2. Adición a alimentos	49
1.5. Legislación	53
1.5.1. Comercialización de alimentos con adición de EV	54
1.5.2. Declaraciones saludables	59
2. Óxidos de esteroides vegetales (POPs)	62
2.1. Estabilidad de los EV en alimentos	62

	Página
2.1.1. Oxidación enzimática	64
2.1.2. Oxidación no enzimática	64
2.2. Contenidos de POPs en alimentos	67
2.3. POPs en alimentos. Factores de formación	78
2.3.1. Efecto temperatura (Termo-oxidación)	78
2.3.2. Estructura de los esteroides vegetales	80
2.3.3. Esterificación	81
2.3.4. Matriz	81
2.3.5. Procesado y almacenamiento	84
2.4. POPs en el organismo	87
2.4.1. Absorción	87
2.4.2. Formación <i>in vivo</i>	89
2.5. Efectos biológicos	90
2.5.1. Citotóxicos	90
2.5.2. Aterogénicos	93
2.5.3. Pro-inflamatorios	94
2.5.4. Mutagénicos	95
2.5.5. Endocrino-reproductivos	95
2.5.6. Posibles efectos beneficiosos	96
3. Determinación de EV y POPs en ingredientes y alimentos enriquecidos	98
3.1. Extracción lipídica	100
3.2. Purificación	105
3.2.1. Saponificación	105
3.2.2. Transesterificación	107
3.3. Concentración	111

	Página
3.4. Determinación: Separación e identificación	115
3.4.1. Cromatografía de gases	115
3.4.2. Cromatografía líquida	125
RESULTADOS	135
I. Stability of plant sterols in ingredients used in functional foods	137
II. Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources	169
III. Plant sterols and antioxidant parameters in enriched beverages: storage stability	197
IV. Plant sterol oxides in functional beverages: influence of matrix and storage	233
DISCUSIÓN GENERAL	263
I. Evaluación de ingredientes fuente de EV utilizados en el enriquecimiento de alimentos, selección de los más idóneos para su utilización en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche	265
II. Estabilidad de los EV y formación de POPs en tres bebidas elaboradas a base de zumo y/o leche enriquecidas con EV a lo largo del periodo de vida útil (6 meses) a tres temperaturas de almacenamiento (4, 24 y 37 °C)	271
CONCLUSIONES	279
BIBLIOGRAFÍA	283
ANEXOS	327

	Página
I. Patentes relacionadas con la incorporación de EV a alimentos hasta 2013	329
II. Metodologías	337
1. Obtención e identificación en GC(FID)/GC-MS de patrones de POPs termo-oxidados	337
2. Determinación de EV y POPs en ingredientes fuente de EV	346
3. Determinación de EV y POPs en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en EV.	351
DIFUSIÓN DE RESULTADOS	359

ÍNDICE DE CUADROS

Nº de Cuadro	Página
1 Contenido de esteroides vegetales (mg/100 g) en alimentos grasos, aceites crudos y refinados	23
2 Contenido de esteroides vegetales (mg/100 g) en alimentos no grasos	24
3 Porcentajes relativos de esteroides vegetales en aceites vegetales	26
4 Decisiones de la Comisión Europea relativas a la comercialización de alimentos con adición de esteroides vegetales	55
5 Declaraciones permitidas de propiedades saludables relativas a los esteroides vegetales	61
6 Contenidos POPs en distintos alimentos y porcentaje de oxidación de los EV	69
7 Determinación de EV y POPs. Extracción de la fracción lipídica	103
8 Determinación de EV y POPs. Sistemas de purificación mediante saponificación y transesterificación	108
9 Determinación de EV y POPs. Sistemas de extracción en fase sólida aplicados para la concentración de POPs en alimentos	113
10 Determinación de EV y POPs. Separación e identificación por GC	119
11 Bandas de la TLC de los productos de oxidación obtenidos por termo-oxidación	339

N° de Cuadro	Página
12 Condiciones instrumentales para la determinación de POPs en GC(FID) y GC-MS	341
13 Identificación de POPs termooxidados	345
14 Curvas de calibrado e intervalos de linealidad de EV	348
15 Factores respuesta calculados para los patrones de COPs	351
16 Curvas de calibrado e intervalos de linealidad de los patrones de COPs.	354

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº de Figura		Página
1	Estructura de los EV más comunes s y colesterol, la numeración seguida es acorde con la IUPAC	20
2	Modificaciones del grupo 3 β -hidroxilo de los esteroides vegetales	21
3	Formación de la micela mixta	30
4	Mecanismos de acción de los EV en el transporte del enterocito a la linfa	32
5	Sistemas de adición que contienen componentes bioactivos cristalinos.	52
6	Estructuras de los principales productos de oxidación de los esteroides vegetales	63
7	Mecanismo radicalario de oxidación del β -sitosterol	65
8	Etapas determinación de EV y POPs	99
9	Esquema del diseño experimental	131
10	Difusión de resultados	133
11	Placa de TLC	338
12	Cromatogramas de POPs en GC-MS y GC(FID) obtenidos por termo-oxidación y purificado por SPE.	343
13	Perfil cromatográfico GC-MS y GC(FID) de la banda nº 3. Espectro de masas de 7-cetositosterol	344
14	Cromatograma de EV correspondiente al ingrediente nº 5	347
15	Cromatograma de patrones de COPs obtenido en GC-FID	353
16	Esquema general de la determinación de EV y POP	355

ABREVIATURAS

- 19-OHcol: 19-hidroxicolesterol
- 24-OH: 24-hidroxi
- 25-OH: 25-hidroxi
- 27-OH: 27-hidroxi
- 5 α -col: 5 α -colestano
- 5 β -col: 5 β -colestano
- 6 α / β -OH: 6 α / β -hidroxi
- 7-ceto : 7-ceto
- 7-OOH: 7 α / β -hidroperoxido
- 7 α / β -OH: 7 α / β -hidroxi
- α / β -epoxi: (α / β)5,6-epoxi
- ABC transportadores adenosin trifosfato (ATP) binding cassette
- ABCG5: co-transportador G5
- ABCG8: co-transportador G8
- ACAT: “Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase” enzima A colesterol aciltransferasa
- ADD: agua destilada desionizada
- AG: ácidos grasos
- ANXA2/CAV1: complejo lípido-proteína annexin2/caveolin1
- APCI: “atmospheric-pressure chemical ionization” ionización química a presión atmosférica
- BDE: entalpía de disociación de enlaces
- BFT : bis(trimetil)-trifluoroacetamida
- BHT: butilhidroxitolueno
- BSTFA: N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
- CE: Comisión Europea
- COPs : “cholesterol oxidation products” productos de oxidación de colesterol

- COX-2: ciclooxigenasa 2
- CRP: proteína C reactiva
- DAD: “diode-array detector” detector de fotodiodos en serie
- DCM: diclorometano
- Dihidrocol: dihidrocolesterol
- DPPP: 1,3-Bis(difenilfosfino)propano; o difosfina
- E450: estabilizante (difosfatos de sodio y de potasio)
- EAS: “European Atherosclerosis Society” Sociedad Europea de Aterosclerosis.
- EE: dietiléter
- ELSD: “evaporating light scattering detector” dispersión de luz evaporativa
- EPIC: “European prospective investigation of cancer” estudio prospectivo europeo sobre dieta y cáncer
- EV: esteroides vegetales
- FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos
- FID: detector de ionización de llama
- FL: fluorescencia
- FR: factor respuesta
- FT-IR: espectroscopía transformada de Fourier de infrarrojos
- GC(FID): cromatografía de gases con detector de ionización de llama
- GC-MS: cromatografía de gases con detector de masas
- HDL-col : colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
- HMDS: hexametildisilazano
- HMGCoA: hidroximetilglutaril coenzima A reductasa
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
- HPSEC: “high pressure size exclusion chromatography” cromatografía de exclusión molecular de alta resolución
- ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1
- IL-1b: interleuquina-1b
- IL-6: interleuquina-6.

- IL-8: interleuquina-8
- LC: cromatografía líquida
- LDH: lactato deshidrogenasa
- LDL-col: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
- LXR: receptor X del hígado
- MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1
- (MIP)-1b: proteína inflamatoria de monocitos
- MM: micelas mixtas
- mRNA: ácido ribonucleico mensajero
- MS: espectroscopía de masas
- MSTFA: trifluoroacetamida
- MTBE: metil-*tert*butil éter
- MTP: proteína microsomal transportadora de triglicéridos
- NK: “natural killers” células asesinas naturales
- NPC1L1: “Niemann-Pick C1-Like1” proteína de transporte transmembrana
- PGE2: prostaglandina E2
- PI: patrón interno
- POPs: “phytosterol oxidation products” productos de oxidación de EV
- QM: quilomicrones
- (Ran/Oph.): oxidación con Rancimat/Oxidograph
- RI: “refraction index” detector de índice de refracción
- RMN: resonancia magnética nuclear
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- SCF: “scientific committee on food” comité científico de la alimentación humana
- SEC: “size exclusion chromatography” cromatografía de exclusión molecular
- SFE: “supercritical fluid extraction” extracción con fluidos supercríticos
- SOP: “sterols oxidation products” productos de oxidación de esteroides
- SPE: extracción en fase sólida
- TFC: factores de corrección teóricos

- TG: triacilglicerolos
- TIC: total ion current
- TLC: “Thin-layer chromatography” cromatografía en capa fina
- TMCS: trimetilclorosilano
- TMSE: trimetilsilileteres
- TNF α : factor de necrosis tumoral alfa
- TXA2: tromboxano A2
- UV: ultravioleta
- VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1

RESUMEN

Los esteroides vegetales (EV) se añaden a determinados alimentos debido a su conocido efecto hipocolesterolemiante. Se ha demostrado, mediante numerosos estudios clínicos que el consumo de 2 g de EV/día reduce entre 5-10% las concentraciones séricas de LDL colesterol. La Sociedad Europea de Aterosclerosis (EAS) indica que es de interés el consumo de alimentos funcionales con EV en pacientes con colesterolemia moderada, así como en personas con riesgo cardiovascular que no estén en tratamiento farmacológico. Dado que la dieta habitual no aporta las ingestas de EV necesarias para conseguir este efecto hipocolesterolemiante, son diversos los alimentos se han sido autorizados para su enriquecimiento en EV, libres o esterificados. Algo a tener en cuenta en estos alimentos enriquecidos en EV, es la estabilidad de estos compuestos, durante el procesamiento y almacenamiento. Al igual que el colesterol, los EV pueden oxidarse dando lugar a los óxidos de EV (POPs) que podrían ejercer efectos adversos, a semejanza de los productos de oxidación del colesterol (COPs), estos han sido ampliamente estudiados, y se conoce su implicación en la iniciación y progresión de enfermedades crónicas, como aterosclerosis, procesos neurodegenerativos y diabetes, entre otros.

El objetivo de la presente tesis doctoral es identificar y cuantificar los EV y POPs en ingredientes utilizados actualmente en el enriquecimiento de alimentos con EV. Así evaluar la estabilidad de los EV en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en EV.

Se optimiza la identificación de POPs por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y se cuantifican los

mismos por cromatografía de gases con detector de ionización de llama GC(FID) en ingredientes y bebidas. En los ocho ingredientes analizados, se confirma la estabilidad de los EV, dado el bajo porcentaje de oxidación del β -sitosterol hallado ($< 0,05\%$) y se seleccionan dos ingredientes (“tall oil” con EV libres y aceites vegetales con EV esterificados) para ser adicionados a bebidas a base de zumo de frutas y zumo-leche.

En general, el porcentaje de oxidación del β -sitosterol (EV mayoritario) en las bebidas es bajo ($0,07\%$). No obstante, al comparar este porcentaje con el obtenido en los ingredientes utilizados ($0,014-0,016\%$) se observa un mayor grado de oxidación en las bebidas que puede atribuirse al procesado de las mismas. No existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido total de POPs en función del ingrediente utilizado, de modo que se selecciona el ingrediente procedente de “tall oil” en base a criterios analíticos.

El almacenamiento (a temperaturas de $4, 24$ y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 6 meses) de las tres bebidas (a base de zumo de frutas y/o leche) enriquecidas con EV no produce cambios en el contenido de EV, si bien, en la capacidad antioxidante total existen diferencias significativas entre matrices, de modo que la bebida que contiene zumo y leche es la que presenta mayor capacidad antioxidante total. El orden de capacidad antioxidante total es: bebida de leche y zumo de frutas $>$ bebida de zumo de frutas \gg bebida de leche. Por su parte, la bebida que no contiene zumo de frutas es la que presenta los mayores contenidos de POPs, mientras que la bebida a base de zumo de frutas y leche presenta los menores contenidos de POPs a lo largo del almacenamiento,

posiblemente debido a la mayor capacidad antioxidante total de estas bebidas. De los resultados obtenidos, tanto del contenido de EV como de POPs en el estudio de estabilidad, se puede concluir que la bebida de zumo de frutas y leche, es una matriz apropiada para la elaboración de bebidas enriquecidas con EV, dado que ofrece la mejor estabilidad de los mismos durante su periodo de vida útil.



**OBJETIVOS Y PLAN
DE TRABAJO**

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es identificar y cuantificar los esteroides vegetales (EV) y sus productos de oxidación (POPs) en ingredientes utilizados actualmente en el enriquecimiento de alimentos con EV. Así como evaluar la estabilidad de los mismos en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en EV.

Los objetivos específicos son:

- ❖ Evaluación de ingredientes fuente de EV utilizados en el enriquecimiento de alimentos y selección de los más idóneos para su utilización en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche.
- ❖ Estabilidad de los EV y formación de POPs en tres bebidas a base de zumo y/o leche enriquecidas con EV a lo largo del periodo de vida útil (6 meses) a tres temperaturas de almacenamiento (4, 24 y 37 °C).

La presente tesis doctoral se encuadra en el marco de un proyecto más amplio cuyo objetivo es evaluar la estabilidad, biodisponibilidad (*in vitro* e *in vivo*) y el efecto de una bebida de zumo de frutas y leche enriquecida en EV sobre biomarcadores intermediarios de riesgo cardiovascular y remodelado óseo.

PLAN DE TRABAJO

Para alcanzar los objetivos mencionados se propone el siguiente plan de trabajo:

- 1) Revisión de los antecedentes bibliográficos relativos a la determinación de EV y POPs en alimentos.
- 2) Adaptación y validación de un método de determinación de EV por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG(FID)) y validación del mismo, para su aplicación a ingredientes y bebidas enriquecidas con EV.
- 3) Obtención de POPs por termooxidación y posterior identificación por técnicas cromatográficas.
- 4) Puesta a punto de un método de identificación de POPs por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (CG-MS), cuantificación por CG(FID) y validación del mismo para su aplicación a ingredientes fuente de EV.
- 5) Evaluación de ingredientes fuente de EV utilizados en el enriquecimiento de alimentos y selección del más idóneo a utilizar en la bebidas objeto de estudio.
- 6) Aplicación del método de determinación de EV y POPs a las bebidas. Estudio de estabilidad.
- 7) Evaluación de los resultados obtenidos.
- 8) Redacción de la tesis doctoral.



**ANTECEDENTES
BIBLIOGRÁFICOS**

1. ESTEROLES VEGETALES

1.1 Estructura

Los EV se asemejan al colesterol, tanto en su estructura química como en su función biológica. Ambos se sintetizan a partir del escualeno dando lugar al grupo de los triterpenos, a partir de este compuesto las plantas producen una gran diversidad de productos derivados, disponiendo cada especie de perfiles de esteroides característicos.

Dependiendo de su estructura y biosíntesis, los EV se dividen en los siguientes grupos: 4-desmetil esteroides, 4 α -monometil esteroides y 4,4-dimetil esteroides. Sin embargo, estos dos últimos están presentes en concentraciones mucho más bajas que los 4-desmetil esteroides (Piironen et al., 2000a). Habitualmente, el término EV se restringe a los 4-desmetil esteroides (Brufau et al., 2008) tal y como será considerado en adelante.

Los EV incluyen ambas formas (fitoesteroides y fitoestanoles). Los fitoesteroides se componen de un núcleo tetracíclico (ciclopentano perhidrofenantreno) y una cadena lateral unida al átomo de carbono (C) 17 (**figura nº 1**). Según la posición y número de los dobles enlaces en el segundo anillo se diferencian 3 tipos de fitoesteroides: Δ^5 -esteroides (doble enlace en posición 5) Δ^7 -esteroides (doble enlace en posición 7) y $\Delta^{5,7}$ -esteroides (doble enlace en ambos). Los fitoesteroides que más se asemejan al colesterol son los Δ^5 -esteroides ya que solo se diferencian de este por la cadena lateral en C17 (Piironen et al., 2000a). Los fitoesteroides Δ^5 son estructuras Δ -5 insaturadas con un grupo hidroxilo en el carbono 3 de la estructura cíclica, la forma saturada de los fitoesteroides son los fitoestanoles que han sufrido una 5 α -reducción del doble enlace Δ^5 (**figura nº 1**). Estos dos tipos se reflejan en los nombres comunes de los

compuestos, por ejemplo, el β -sitosterol es estructuralmente idéntico al sitostanol excepto en el doble enlace en la posición 5, y el campesterol tiene la misma relación con el campestanol (Ostlund, 2002).

En la **figura n° 1** se puede observar la numeración de los C para el β -sitosterol, así como las estructuras del colesterol, campesterol, estigmasterol, y las formas saturadas sitostanol y campestanol.

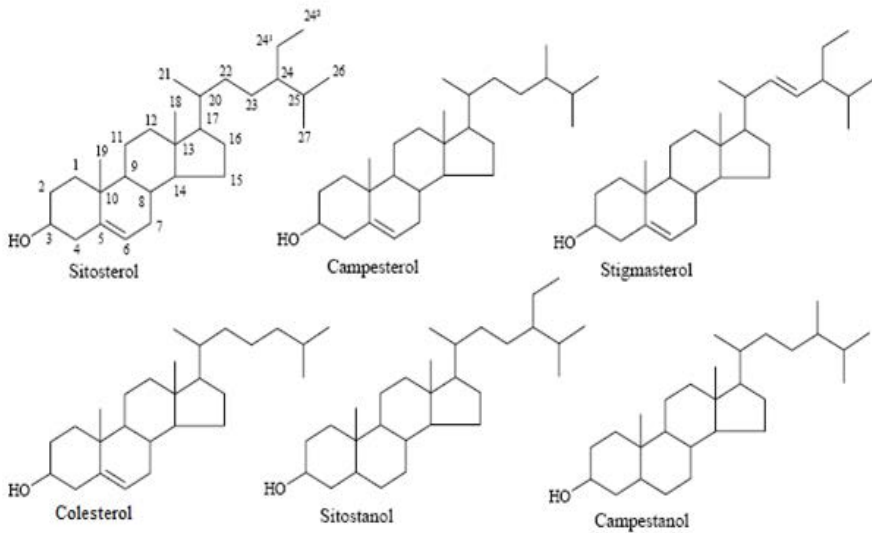


Figura n° 1. Estructura de los EV más comunes y colesterol, la numeración seguida es acorde con la IUPAC (adaptado de Lagarda et al., 2006)

En los animales, la mayor parte del colesterol se encuentra en forma libre, con una cierta proporción en forma de ésteres con ácidos grasos (AG). Sin embargo, en los tejidos vegetales, los EV pueden hallarse de cinco formas: libres, o bien como compuestos “conjugados” en el grupo 3β -OH del esterol, que puede estar esterificado con AG, esterificado con ácido ferúlico (potente antioxidante), o bien glicosilados

(esterol glicosilado); a su vez, este último puede acetilarse obteniendo acetil esteril glicósidos (esterol glicosilado acetilado) (Moreau, 2002) (figura n° 2).

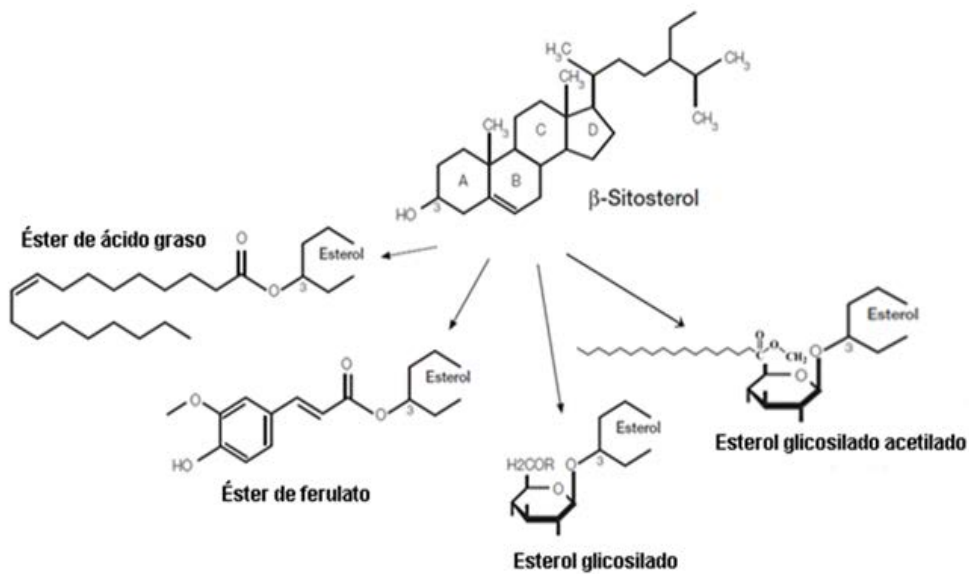


Figura n° 2. Modificaciones del grupo 3β -hidroxilo de los esteroides vegetales

Los EV libres son sólidos y muy poco solubles en medios lipídicos y su hidrofobicidad aumenta con la longitud de la cadena lateral. Así, los EV con 28 o 29 C son más hidrófobos y tienen una menor solubilidad micelar que el colesterol con 27 C (Piironen et al., 2000a). Por el contrario, las formas esterificadas se disuelven fácilmente en alimentos que contengan una matriz grasa.

1.2 Contenidos de EV en alimentos

Todos los alimentos de origen vegetal contienen EV. En general, los aceites vegetales y productos derivados de los mismos como las margarinas se consideran las fuentes naturales más ricas en EV (Piironen et al., 2000a), los aceites con mayor concentración en EV son los de maíz, girasol, soja y colza (que contienen entre un 0,1% y 0,8%).

El proceso del refinado de los aceites vegetales puede afectar considerablemente el contenido en EV, ya que pueden ser parcialmente eliminados o transformados por oxidación, isomerización y otras transformaciones por reacciones intramoleculares. En el **cuadro n° 1** se muestran los contenidos en EV en diferentes aceites crudos y refinados. La magnitud de la pérdida de EV depende del tipo de aceite y de las condiciones utilizadas en el proceso de refinado, variando esta pérdida entre un 10-70%. El proceso de refinado también afecta al estado en que se están los EV (libres o esterificados a AG). Así, el desgomado y el blanqueo hidrolizan gran parte de los ésteres de EV aumentando el contenido en su forma libre; la neutralización y desodorización disminuyen el contenido de los EV libres, afectando así a su contenido total (Verleyen et al., 2002b).

Cuadro n° 1. Contenido de esteroles vegetales (mg/100 g) en alimentos grasos, aceites crudos y refinados.

Aceites vegetales	Crudo	Refinado	Referencia
Cacahuete	153	171-258	1, 4, 6, 8, 11
Colza	803-861	709-859	2, 4, 6, 7, 8, 10, 11
	513-979	250-731	5
	941	814	12
Coco		71-125	4, 6, 7
	70		8
Girasol	352-430	270-350	2, 6
		411-493	1, 3, 4, 7, 11
	374-725		5
Maíz		330-368	8, 10
	779-975	685-793	3, 8, 9
Oliva	809-1557	715-968	1, 4, 5, 6, 7, 10, 11
	144-155		5, 6
	176-221		8, 1
	256-260	216-283	3, 7, 10
Palma		154-177	4, 11
	69-79	60-68	8, 9
	71-117	39-61	4, 5, 6, 11
Semilla de algodón	431-539	308-397	1, 5, 6
		460	8
Soja	350	250-297	1, 2, 6, 10
	302-327	307-216	8, 9, 11
	229-460	221-328	5
		349-436	4
Margarinas		126-554	4, 6, 7, 11

1: Abidi et al., 2001; 2: Fernandes y Cabral, 2007; 3: Jiménez-Escrig et al., 2006; 4: Normén et al., 2007; 5: Piironen et al., 2000a; 6: Phillips et al., 2002; 7: Schwartz et al., 2008; 8: Verleyen et al., 2002a; 9: Verleyen et al., 2002b; 10: Plumb et al 2011; 11: Marangoni y Poli, 2010; Ghazani et al., 2013.

También debe destacarse el contenido de EV en legumbres (0,2%) y frutos secos y en menor cantidad en cereales y vegetales. Aunque los contenidos de EV en frutas, hortalizas, cereales y derivados es relativamente bajo, al ser elevado el consumo de estos productos en la dieta deben tenerse en cuenta al estimar la ingesta total de EV (Piironen y Lampi, 2004). En el **cuadro n° 2** se recopilan contenidos en EV en alimentos distintos a los aceites.

Cuadro nº 2. Contenido de esteroles vegetales (mg/100 g) en alimentos no grasos.

Alimento	Contenido	Referencia	Alimento	Contenido	Referencia
Cereales					
Arroz	29-79	2, 6, 10, 11	Centeno (pan)	51	3
Arroz (harina)	23-55	3, 11	Trigo (germen)	344-411	3, 6, 10, 11
Arroz (integral)	72,3	6	Trigo (salvado)	178-200	6, 10, 11
Cebada	59-83	5, 6	Trigo (harina integral)	70-74	3, 6, 11
Avena	33-52	3, 5	Trigo (harina)	28-51	3, 6
Avena copos	75,55	6	Trigo (pan)	40-54	2, 3, 6, 11
Centeno	69-110	3, 5	Trigo (pan integral)	86	3, 11
Centeno (harina)	81-95	3, 6, 11			
Frutas					
Aguacate	75	7	Naranja	23-30	2, 5, 7, 10, 11
Cereza	20	2	Pera	8-11	1, 2
Ciruela	13-19	2, 7	Plátano	12-20	1, 2, 7, 10
Kiwi	7-18	2, 7, 10, 11	Sandía	1-4	2, 11
Manzana	12-18	1-2, 5, 7, 11	Uva	18-33	2, 7, 11
Frutos secos					
Almendra	138-208	1-2, 4, 7, 8, 11	Chocolate	126-167	4, 8
Anacardo	150-158	1, 8	Nuez	113-131	2, 4, 8, 11
Avellana	121-138	2, 4, 8, 11	Piñones	236	8
Cacahuete	104-220	1-2, 4, 7, 8, 11	Pistacho	243- 297	2, 4, 8, 11
Legumbres					
Alubia	127-108	1, 2	Lenteja	117	2
Garbanzo	121	2	Guisante	124	7
Vegetales					
Ajo	18	2	Col de Bruselas	37-43	5, 7
Alcachofa	48	2	Coliflor	34-44	2, 5, 10, 11
Berenjena	6	2	Esparrago	11	2
Brócoli	18-39	2, 5, 7, 11	Lechuga	9-14	1-2, 7
Zanahoria	12-19	1-2, 5, 7, 10, 11	Patata	4-5	1-2, 5, 7
Cebolla	7-15	1-2, 7, 10, 11	Tomate	5-10	1-2, 7, 10, 11
Col	27-31	2, 7	Batata	17-29	9

1: Abidi et al., 2001; 2: Jiménez-Escrig et al., 2006; 3: Normén et al., 2002; 4: Normén et al., 2007; 5: Piironen et al., 2000a; 6: Piironen et al., 2002; 7: Piironen et al., 2003; 8: Phillips et al., 2005; 9: Cordeiro et al., 2013; 10: Plumb et al., 2011; 11: Marangoni y Poli, 2010.

En estimaciones de ingesta total de EV, cabe destacar el estudio realizado en España por Jiménez-Escrig et al. (2006) quienes determinan el contenido de EV en los alimentos de mayor consumo en España y se

evalúa la ingesta media diaria de EV, estimándose en 276 mg, siendo la fuente principal los aceites con una contribución del 39,3%. En otro estudio prospectivo europeo sobre dieta y cáncer (EPIC) basado en un análisis transversal de cohorte en población española, Escurriol et al. (2009) estiman la ingesta de EV en 309-349 mg/día en hombres y 241-259 mg/día en mujeres. También existen estudios europeos de estimación de ingesta de EV: En Suiza, Klingberg et al. (2008) estiman una ingesta diaria de entre 197-219 mg en mujeres y 226-257 mg en hombres, empleando cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos, así como encuestas de recuerdo de 24 h. En el caso de Bélgica, Sioen et al. (2011), en un estudio basado en encuestas de recuerdo de 24h, estiman la ingesta de EV en 301 y 229 mg/día en hombres y mujeres, respectivamente. En estos últimos estudios (Klingberg et al., 2008 y Sioen et al., 2011) estiman que el pan y otros cereales son los que más contribuyen a la ingesta de EV, seguidos de las grasas, contrariamente a lo determinado en España (Jiménez-Escrig et al., 2006).

En cuanto al perfil de los EV en los alimentos, los fitoesteroles son mayoritarios frente a sus formas reducidas (fitoestanoles). Los más abundantes son el β -sitosterol, seguido de campesterol y estigmasterol. En los aceites vegetales, el 85% de los esteroides son 4-desmetilesteroides, contribuyendo, en más del 50%, el β -sitosterol. El porcentaje del resto de fitoesteroides varía en función del tipo de aceite de forma muy singular, por ejemplo, en el caso del aceite de colza y otros aceites del género *Cruciferaeae* (*Brassicaceae*) el contenido en brassicasterol es relevante (Piironen et al., 2000a). En el **cuadro n° 3** se presenta el perfil de los distintos EV para aceites vegetales.

Cuadro n° 3. Porcentajes relativos de esteroles vegetales en aceites vegetales.

Aceite	S	C	E	B	Stn	Ctn	Ref.
Cacahuete	64,44	16,51	8,89	1,9	1,05		4
	73,90	16,53	9,58				8
	61,11	21,4	17,48				9
Colza	48,77	36,09	0,78	10,48	0,28	0,40	4
	48,40-55,70	28,6-35,6	0,40-0,50	8,60-12,90	0,27-0,90	0,08-0,13	5
	46,80-48,10	34,60-35,2	0,40-0,60	8,00-9,10	0,20-0,50	0,20-0,40	6
	50,84-50,96	35,57-39,06					7
	40,12	51,19	1,03	7,66			9
54,06	33,80	0,39	11,75			10	
Coco	48,80	13,60	12,00	5,04	2,88		4
	51,22-59,44	7,30-8,03	14,32-15,63		2,00	1,89-2,11	5
	39,47	8,16	10,53	-	0,96	-	6
	70,54	11,32	18,14				7
Girasol	44,53	7,39	1,66				3
	70,87	11,92	10,78		0,69		4
	69,7-71,92	7,80-10,03	6,55-9,02	0,78	1,07-1,11	0,44	5
	45,68	7,54	6,21	0,27	1,13	1,51	6
	64,63-68,47	10,84-11,90	8,11-8,52				7
69,46	14,34	16,19	-			9	
Maíz	59,92-61,57	21,83-21,98	6,64-6,75	0,34-0,69	2,86-3,20	1,43-1,54	4
	63,25-66,50	16,95-18,13	7,64-7,14		1,89-2,08	1,20-1,38	5
	59,13	19,63	5,51	0,44	3,33	1,72	6
	69,19-70,26	21,25-21,69	7,10-7,52				7
	68,87-71,14	20,15-22,98	6,92-7,24				8
57,42	32,29	9,99	-			9	
Oliva	89,86	2,63	2,20				3
	79,66	5,08	2,26				4
	79,88-83,35	2,71-2,86	0,54-1,80		1,08-2,27	0,42-0,46	5
	46,87-47,00	1,98-2,30	5,51-6,21		1,52-1,77		6
66,13-73,91	0,96-2,74					7	
Palma	61,51	23,08	15,38				4
	42,47	15,91	9,35				5
	58,31-65,87	20,06-26,14	9,19-14,03				7
	60,93-62,00	22,1-22,87	11,85-13,50				8
	46,55	31,91	21,54	-			9
Soja	54,15-54,95	19,48-21,41	18,85-19,54	0,80	1,60-5,16	0,70-1,43	4
	59,00-52,80	19,08-16,20	20,23-17,57		1,86-1,31	1,02-0,76	5
	59,69-56,25	22,61-17,18	20,87-16,80				7
	57,39-56,25	21,24-19,03	16,44-18,80				8
39,91	28,07	32,65	-			9	

3: Jiménez-Escrig et al., 2006; 4: Normén et al., 2007; 5: Piironen et al., 2000a; 6: Phillips et al., 2002; 7: Schwartz et al., 2008; 8: Verleyen et al., 2002a; 9: Li et al., 2011; 10: Ghazani et al., 2013.

S: β -sitosterol; C: Campesterol; E: Estigmasterol; B: Brassicasterol; Stn: Sitostanol; Ctn: Campestanol; Ref.: referencia.

1.3 Efectos biológicos

1.3.1 Hipocolesterolémico

El colesterol es una molécula imprescindible para el organismo humano con importantes funciones biológicas. Su homeostasis requiere de una precisa regulación mediante procesos de síntesis, absorción y excreción del mismo, ya que un desequilibrio puede elevar su concentración plasmática, acumulándose en diferentes tejidos y, en consecuencia, producir un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Calpe-Berdiel et al., 2009).

La absorción de colesterol es un mecanismo fisiológico que depende tanto de la ingesta de colesterol de la dieta (~300 mg/día), como del procedente de la recirculación biliar (~ 1000 mg/día). La disminución de la absorción intestinal es la principal vía de eliminación de colesterol del organismo (tanto endógeno como procedente de la dieta) (Ostlund, 2002).

La absorción de colesterol y, por consiguiente, de los EV, es un proceso de múltiples etapas, donde los pasos más importantes son: (De Smet et al., 2012)

- ❖ Escisión, en el lumen intestinal, de los esteroides esterificados a sus formas libres, mediante la acción de la enzima colesteroleserasa.
- ❖ Solubilización de los esteroides en la fase grasa emulsionada y formación de las micelas mixtas (MM) en el lumen.

- ❖ Transferencia de los esteroides a través de la mucosa intestinal. En este proceso participan proteínas transportadoras de esteroides como la proteína de transporte transmembrana Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1L1).
- ❖ Re-esterificación en el interior del enterocito, por la acilcoenzima A colesterol aciltransferasa (ACAT).
- ❖ Incorporación de los esteroides esterificados a los quilomicrones (QM) por la actuación de la proteína microsomal de transferencia de triacilglicéridos (MTP).
- ❖ Los transportadores ABC dependientes de adenosin trifosfato (ATP) “binding cassette”, concretamente los co-transportadores G5 y G8 (ABCG5 y ABCG8) situados en la parte apical del enterocito, son los encargados de devolver los esteroides no esterificados del interior del enterocito al lumen intestinal.
- ❖ Liberación de los esteroides en la linfa.

En general, se puede decir que la absorción de colesterol tanto de la dieta como de la circulación enterohepática, se reduce por la acción de los EV (Brufau et al., 2008; Gylling et al., 2014). Estudios epidemiológicos en UK, Suecia y China han concluido que la ingesta de EV está inversamente relacionado con los niveles plasmáticos de colesterol total y las lipoproteínas de baja densidad (LDL-col) (Andersson et al., 2004; Klingberg et al., 2008; Wang et al., 2012, respectivamente).

Mientras que la absorción intestinal del colesterol varía del 30-60% (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011), la de los EV es inferior, siendo la de los fitoesteroides del orden de 0,5-2% y de 0,04-0,2% para los

fitoestanoles. Como resultado de la baja absorción y una eficiente excreción en la bilis después de la absorción por el hígado, los niveles circulantes de EV son bajos, entre 7 y 24 mmol/L (0,3-1,0 mg/dL) para los fitoesteroles y de 0,05 a 0,3 $\mu\text{mol/L}$ (0,002-0,012 mg/dL) para los fitoestanoles. Estos niveles son, por lo tanto, del orden de 500 y 10.000 veces menores, respectivamente, que los del colesterol (Gylling et al., 2014).

1.3.1.1 Mecanismos de acción

Se han propuesto distintos mecanismos de acción de los EV (Rozner y Garti, 2006; Marangoni y Poli, 2010; García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011; De Smet et al., 2012; Gylling et al., 2014):

➤ *Acción en el lumen intestinal:*

- ❖ Co-cristalización de los EV con el colesterol. Durante la lipólisis de los alimentos (digestión enzimática), en la emulsión intestinal de triacilglicéridos (TG) y nutrientes hidrofóbicos, se genera la precipitación de los EV con el colesterol por cristalización, reduciendo su absorción intestinal. Mel'nikov et al. (2004) demuestran la formación de estos cristales mediante difracción de rayos X y microscopía; pero indican que, dada la alta solubilidad de los esteroides libres en los productos de hidrólisis de los lípidos, este mecanismo no puede afectar en gran medida a la absorción del colesterol.
- ❖ Competencia por la colesterolesfera. Los EV esterificados con AG pueden actuar como sustratos (no muy específicos) de esta enzima, reduciendo la absorción del colesterol esterificado (aproximadamente un 20% del colesterol ingerido), ya que sólo la

forma libre del colesterol puede formar parte de la MM (Ikeda et al., 2002) (**figura n° 3**).

- ❖ Competencia entre el colesterol y los EV por su incorporación a las MM (compuestas de sales biliares, monoacilgliceroles, AG libres, lisofosfolípidos, fosfolípidos y colesterol libre). Los EV presentan mayor afinidad por las MM debido a su mayor hidrofobicidad (propiedad derivada de la mayor longitud y complejidad de la cadena lateral), lo que hace que la adhesión del colesterol a las MM se reduzca (Ikeda et al., 1988) (**figura n° 3**). El colesterol no emulsionado (desplazado de la micela) no puede ser absorbido y se elimina con las heces.

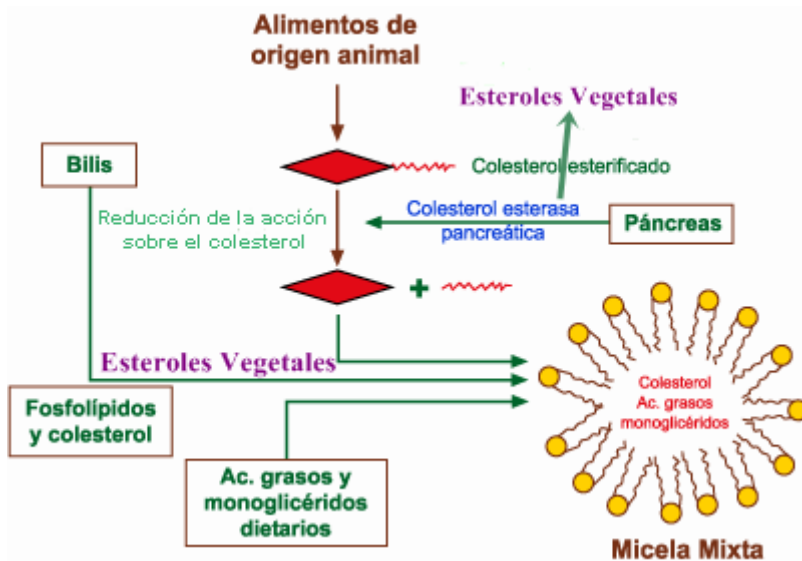


Figura n° 3: Formación de la micela mixta (adaptado de Valenzuela y Ronco, 2004).

- ❖ Competencia por las proteínas transportadoras de colesterol, como las NPC1L1 (Davis y Altmann, 2009). Wang (2007)

demuestra que las NPC1L1 también transportan EV, ya que al bloquear estos transportadores con ezetimiba (fármaco para tratar la hipercolesterolemia) se reduce a la mitad la absorción tanto de colesterol como de los EV. Por otra parte se ha demostrado que células intestinales humanas (FH 74) tratadas con β -sitosterol (250 μ M) disminuyen la síntesis proteica de NPC1L1 (Jesch et al., 2009).

- ❖ La absorción del colesterol también podría darse por invaginación mediante caveolas. Se puede dar la formación de un complejo lípido-proteína de los ésteres de colesterol con las proteínas annexin2/caveolin1 (ANXA2/CAV1) en las balsas lipídicas (“lipid rafts”) del borde en cepillo intestinal. Smart et al. (2004) demuestran que los EV pueden disminuir la actividad de ANXA2, reduciendo de este modo el transporte de colesterol. De todos modos, la importancia de este complejo para la absorción de colesterol todavía no está clara (De Smet et al., 2012).

- *Acción en el interior del enterocito:*
 - ❖ Efecto inhibitorio de la ACAT intestinal por los EV (Trautwein et al., 2003). En ensayos con cultivos celulares del epitelio intestinal (Caco-2) incubados con colesterol y β -sitosterol, la actividad de la ACAT se ve reducida por la presencia del EV (Field et al., 1997) (**figura nº 4**). Por otra parte, Field y Mathur (1983) demuestran que la ACAT es mucho menos eficiente en la esterificación de los EV que del colesterol, lo cual explicaría por qué la absorción de los EV es tan baja.

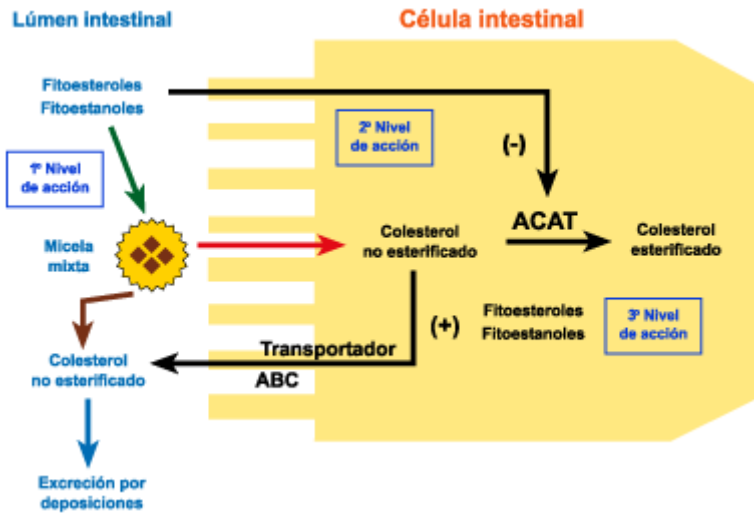


Figura n° 4: Mecanismos de acción de los EV en el transporte del enterocito a la linfa (Valenzuela y Ronco, 2004)

- ❖ Reducción de la síntesis de MTP. Recientemente se ha demostrado, en hámsteres, que el β -sitosterol se asocia con una disminución en el nivel del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de la MTP. Por lo que los EV podrían tener un efecto sobre la expresión de la enzima que participa en la incorporación de los esteroides a los QM (Liang et al., 2011).
- ❖ Regulación positiva de transportadores ABCG5 y ABCG8 de la membrana de los enterocitos encargados de devolver los esteroides no esterificados al lumen intestinal. Esto supone una disminución de los esteroides que pasaran a formar parte de los QM y un aumento de la excreción por heces de los mismos (Plat y Mensink, 2005) (**figura n° 4**).

➤ *Otros efectos*

- ❖ Disminución de la actividad de la hidroximetilglutaril Coenzima A reductasa (HMGCoA), enzima encargada de la síntesis endógena de colesterol, principalmente a nivel hepático. Field et al. (1997) hallan una reducción de la actividad de HMGCoA en células Caco-2 con la adición de β -sitosterol, al no discriminar entre EV y colesterol, produciendo una reducción de la concentración intracelular del colesterol (De Smet et al., 2012).
- ❖ Aumento de la expresión de transportadores modulada por el receptor X del hígado (LXR). De hecho el LXR modularía la expresión de: NPC1L1, ABCG5 y ABCG8, entre otros. De tal modo que, en caso de una alta concentración sanguínea de colesterol, el LXR se activa y se expresan dichos transportadores. Se ha sugerido que los EV podrían activar el LXR directa o indirectamente después de la conversión en metabolitos todavía desconocidos (De Smet et al., 2012).

Por otra parte, debido a que los EV reducen la absorción intestinal de colesterol, el nivel de éste en sangre disminuye, lo que induce un aumento compensatorio en la síntesis del colesterol endógeno. Sin embargo, a pesar de este incremento, el efecto neto es una reducción en suero de las concentraciones de LDL-col, ya que se aumenta la expresión del receptor de LDL-col en el hígado (Plat y Mensink, 2005).

1.3.1.2 Eficiencia de la dosis y tipo de EV (asociación entre consumo de EV y niveles de colesterol plasmático: evidencia epidemiológica).

En un meta-análisis efectuado por Katan et al. (2003) de 41 ensayos con diversos alimentos (margarina, mayonesa, aceite y mantequilla enriquecidos con EV), indican que la dosis óptima diaria de EV es 2 g/día, produciendo una reducción del colesterol LDL-col de 10%. La relación dosis-efecto comienza a mostrar efectos hipocolesterolémicos significativos con la ingesta de 500 mg/día, este efecto se incrementa por la ingesta diaria en el intervalo de 500-2500 mg/día. Una mayor ingesta produce efectos mínimos sobre los niveles de LDL-col. Naumann et al. (2008) sugieren una relación dosis-respuesta lineal entre el aumento de las concentraciones dietéticas de EV y la disminución de las concentraciones séricas de LDL-col para ingestas de hasta 4 g/día, obteniendo un efecto óptimo con dosis de 2 g/día tanto para fitoesteroles como para fitoestanoles. Abumweis et al. (2008) desarrollan un meta-análisis donde se examinan 59 estudios con alimentos enriquecidos con EV. Se demuestra un efecto dosis-respuesta con reducciones de LDL-col de 0,29; 0,32 y 0,42 mmol/L para ingestas de EV de 1,5-2,0; 2,1-2,5 y > 2,5 g/día, respectivamente. Otro meta-análisis (Demonty et al., 2009) de un conjunto de 84 ensayos, concluyen que se obtiene una máxima reducción del LDL-col (12,7%) para unos 3 g EV/día, y una ingesta promedio de 2,15 g EV/día produce una disminución media en la concentración del LDL-col del 8,8%.

En la revisión realizada por Derdemezis et al. (2010), donde se recopilan estudios clínicos en humanos y, en menor medida, estudios con

animales, se concluye que con el consumo de 2 g/día de EV se consigue reducir aproximadamente el 9% del LDL-col, así como también efectos beneficiosos sobre parámetros lipídicos, tales como TG y colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL-col). En relación al enriquecimiento con concentraciones elevadas, en un informe llevado a cabo por 60 expertos procedentes del ámbito académico e industrial (Plat et al., 2012) concluyen que con dosis por encima 3 g/día de EV se obtiene igual eficacia en la disminución del colesterol que a 3 g/día.

Recientemente, Ras et al. (2013) han publicado un meta-análisis que incluye 41 ensayos controlados aleatorios, en los que la concentración de EV en los alimentos consumidos oscila entre 0,3 y 3,2 g/día, siendo la media de 1,6 g/día, y obteniendo una reducción media de la concentración de LDL-col de 0,33 mmol/L (8,5%). Debido a la ingesta de estos alimentos la concentración plasmática de β -sitosterol y campesterol aumenta en 2,24 y 5,00 μ mol/L, respectivamente, en general los EV totales se mantienen por debajo del 1% de esteroles totales plasmáticos.

Diversos meta-análisis han evaluado la eficacia de los fitoesteroles vs fitoestanoles. Katan et al. (2003) señalan diferencias no significativas entre ellos: una reducción máxima de 10,1% con 2,5 g/día para fitoesteroles frente a un 9,7% con 2,3 g/día para fitoestanoles, Demonty et al. (2009) tampoco hallan diferencias entre fitoesteroles y fitoestanoles, pero sí determinan la diferencia entre ellos en su máxima reducción del LDL-col siendo del 6,7% y no estadísticamente significativa. Talati et al. (2010) evalúan 14 ensayos (n = 531) con un intervalo de ingesta de EV entre 0,6 y 2,5 g/día y no identifican ninguna diferencia estadística o clínica en el efecto de la disminución de

colesterol total, LDL-col, HDL-col, o TG entre los fitoesteroles y los fitoestanoles. Mensink et al. (2010) observan que, en el caso de los fitoestanoles se da una relación lineal dosis-respuesta a concentraciones superiores a los 2 g/día, llegando hasta a una reducción de 17,4% de LDL-col con 9 g/día. En el meta-análisis de Musa-Veloso et al. (2011), basado en 114 ensayos donde el intervalo de EV es de 0,2-9,0 g/día, se obtiene una reducción máxima del LDL-col del 16,4% en el caso de fitoestanoles y del 8,3% para fitoesteroles, siendo significativamente diferentes. En cualquier caso, a la dosis de 2 g/día actualmente recomendada, la reducción del LDL-col tanto para fitoesteroles como para fitoestanoles es prácticamente la misma (Katan et al., 2003; Talati et al., 2010 y Musa-Veloso et al., 2011).

Sin embargo, a pesar del potencial impacto positivo sobre el riesgo cardiovascular debido a la disminución del colesterol, Genser et al. (2012) han planteado que los EV podrían ejercer efectos cardiovasculares adversos, por dos razones principales. Por una parte, en individuos con sitosterolemia (trastorno hereditario autosómico recesivo poco frecuente, causado por mutaciones en los genes que codifican para los transportadores ABCG5 y ABCG8, afectando a los transportadores ABC intestinal y hepáticos), en los que las concentraciones séricas de EV son 50-100 veces más elevadas pudiendo, en este caso, generar enfermedades cardiovasculares prematuras y severas (Salen et al., 1985). Por otra parte, existen algunos estudios que han encontrado una relación entre concentraciones séricas elevadas de EV y la aparición de enfermedades cardiovasculares (Assmann et al., 2006). Genser et al. (2012) han realizado un meta-análisis basado en 17 estudios epidemiológicos controlados (n=11182) con adultos, no obteniendo ninguna evidencia de

una asociación entre las concentraciones séricas moderadas de EV y el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Recientemente, la Sociedad Europea de Aterosclerosis (EAS) ha publicado un documento de posición sobre el impacto de los EV en la homeostasis del colesterol y el riesgo cardiovascular (Gylling et al., 2014). Concluyen que, en base a los efectos de descenso del LDL-col, los alimentos funcionales con EV pueden ser recomendados en pacientes con riesgo cardiovascular medio y bajo, y con niveles altos de colesterol que no requieren de tratamiento farmacológico. Por otra parte como complemento al tratamiento farmacológico en pacientes de alto y muy alto riesgo cardiovascular, que no alcanzan los objetivos de reducción de LDL-col y en los adultos y niños mayores de 6 años con hipercolesterolemia familiar.

1.3.2 Anticarcinógeno

Aunque hay muchos factores implicados en la etiología del cáncer, se ha establecido que la dieta afecta significativamente al desarrollo de esta enfermedad. La creciente evidencia de los efectos bioquímicos y moleculares de los EV puede hacerlos fuertes candidatos para disminuir el riesgo y para la terapia del cáncer (Grattan, 2013). Diversas revisiones han tratado dicha relación (Awad y Fink, 2000a; Bradford y Awad, 2007; Woyengo et al., 2009; Grattan, 2013).

➤ *Estudios in vitro*

❖ Producción de carcinógenos

Diversos estudios sugieren que los EV pueden evitar el desarrollo del cáncer mediante la reducción de la producción de carcinógenos

(Woyengo et al., 2009). Awad et al. (2004) obtienen una disminución de la producción de prostaglandina E y prostaglandina I en células de macrófagos tratadas con EV. Vivancos y Moreno (2005) indican que los EV pueden proteger a las células del daño producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a que los EV incrementan la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) en células de macrófagos cultivadas con estrés oxidativo inducido.

❖ Ciclo celular

En células cancerosas, la progresión del ciclo celular normal es aberrante. Cada vez hay más evidencias de que muchos fitoquímicos naturales y dietéticos (entre ellos los EV) pueden ejercer protección contra el cáncer mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular y la promoción de la apoptosis (Bradford y Awad, 2007). El β -sitosterol disminuye la viabilidad de células de: cáncer de mama MCF-7 y adenocarcinoma MDA-MB-231 (Awad et al., 2007), cáncer de colon HCT 116 (Choi et al., 2003), cáncer de próstata PC-3 (Awad et al., 2005) y leucemia humanas U937 (Park et al., 2007). Por regla general, los EV no son potentes inhibidores de la progresión del ciclo celular como los fármacos antineoplásicos, sino más bien actúan como débiles inhibidores que, durante periodos prolongados de exposición, regulan sutilmente la actividad de las proteínas y la expresión de genes implicados en el crecimiento celular y la apoptosis (Bradford y Awad, 2007).

❖ Apoptosis celular

Los EV han demostrado promover la apoptosis (muerte celular programada), un mecanismo importante en la inhibición de la carcinogénesis (Woyengo et al., 2009). La apoptosis se desarrolla por la acción en cascada de eventos enzimáticos y las enzimas que intervienen son las caspasas aspartato específicas (caspasas) (Woyengo et al., 2009). El β -sitosterol induce la apoptosis por activación de caspasas-3 en células de leucemia humanas U937, fibrosarcoma de ratón MCA-102 y endoteliales humanas HAAE-2 (Park et al., 2007; Moon et al., 2007; Rubis et al., 2008). Vundru et al. (2013) obtienen, por acción del β -sitosterol, un importante efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico en células de cáncer de mama (MDA-MB-231), mientras que sólo detectan un efecto moderado en células de cáncer de pulmón A549 y no describen efecto en células de cáncer de piel A431.

❖ Angiogénesis y metástasis

En estudios realizados por Awad y colaboradores (2001a y 2001b) en células de cáncer de próstata PC-3 y mama MDA-MB-231, respectivamente, se ve reducida la invasividad y la adhesividad de las células por acción de los EV. Por lo que estos compuestos podrían inhibir la angiogénesis (vascularización del tumor) y metástasis (Woyengo et al., 2009).

❖ Acción estrogénica

Hay pruebas contradictorias sobre la posible actividad estrogénica de los EV. Dada la similitud estructural, los EV podrían afectar a los niveles de estrógenos endógenos por la competencia con el receptor de estrógenos (Bradford y Awad, 2007). Los estrógenos juegan un papel

importante en la etiología del cáncer de mama, ya que unos niveles elevados de esta hormona están reconocidos como un factor de riesgo de cáncer de mama potencialmente modificable (Grattan, 2013). Estudios en células de cáncer de mama (Gutendorf et al., 2001; Touillaud et al., 2005) sugieren que los EV pueden estar funcionando como moduladores débiles de los receptores de estrógeno, aunque otros estudios sugieren que no ejercen ningún efecto (Grattan, 2013).

❖ Sistema inmunitario e inflamación

El sistema inmune desempeña un papel fundamental en la etiología del cáncer junto con la inflamación crónica, ya que se reconoce que la desregulación del sistema inmune desempeña un papel importante en la metástasis del cáncer (Grattan, 2013). Bouic et al. (1996) y Calpe-Berdiel et al. (2007) indican que los EV estimulan la proliferación de linfocitos por una regulación de la producción de citoquinas, siendo estos efectos preventivos sobre la metástasis del cáncer (Grattan, 2013). Bouic et al. (2001), en una revisión del papel de los EV en la modulación del sistema inmunitario, concluyen que estos compuestos producen una mejora de la capacidad de respuesta celular de los linfocitos T tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudios adicionales han demostrado que, después de la preincubación de células “natural killers” (NK) con una mezcla de EV, se obtiene una elevada mejora de las actividades citotóxicas de estas células contra las líneas celulares cancerosas (Bradford y Awad, 2007).

❖ Efecto de la colesterolemia

Diversos estudios muestran que el consumo de dietas con elevadas concentraciones de colesterol acelera la formación de tumores en diferentes modelos animales (Zhuang et al., 2005; Llaverias et al., 2010).

Llaverias et al. (2013) estudian el desarrollo de cáncer de mama en ratones alimentados con dietas ricas en EV y colesterol, y dietas con EV pero sin colesterol, obteniendo una diferencia en el desarrollo del cáncer por el efecto protector de los EV solo en aquellos ratones alimentados con una dieta rica en colesterol. Los autores sugieren que niveles elevados de colesterol en plasma aumentan el contenido de colesterol en las balsas lipídicas “lipid rafts” mejorando la supervivencia de las células cancerosas mediante la reducción de la apoptosis (Llaverias et al., 2013). Se ha sugerido que los EV pueden promover cambios beneficiosos en la transducción de señales mediante la reducción del contenido de colesterol de las balsas lipídicas, al ser incorporado directamente en las células. Además de reducir las concentraciones de colesterol, de modo que actuaría por ambos mecanismos (Awad et al., 2007).

➤ *Estudios in vivo*

Diversos análisis observacionales y estudios epidemiológicos controlados confirman que las personas que se alimentan predominantemente de alimentos de origen vegetal, siendo dietas enriquecidas con EV, tienen una menor incidencia de diversos cánceres (Bradford y Awad, 2007). En un ensayo de casos y controles en Uruguay (Mendilaharsu et al., 1998) con pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón señalaron que el consumo de EV se asocia con un menor riesgo de cáncer de pulmón en aproximadamente un 50%. De Stefani et al. (2000) obtienen una relación inversa entre la ingesta total de EV y la prevalencia de cáncer de estómago. McCann et al. (2003) realizan un ensayo de casos y controles para obtener una relación entre el consumo de fitoquímicos (incluidos los EV) y el riesgo de padecer cáncer de ovario, con 124 mujeres diagnosticadas de carcinoma de ovario y 696

mujeres de grupo control. Obtienen una reducción del riesgo de desarrollo de cáncer de ovario con ingestas elevadas de estigmasterol (> 23 mg/día), sin señalar efecto con otros EV o EV totales.

Se han realizado ensayos en roedores para determinar si los EV dietéticos proporcionan protección contra el cáncer de colon. Para ello, ratas y ratones son alimentados con dietas enriquecidas o no en EV, se les administran carcinógenos químicos y se analiza la incidencia de cáncer de colon bien patológicamente o por medidas indirectas de la proliferación celular (Bradford y Awad, 2007). Deschner et al. (1982) indican una reducción de la división celular en el colon de animales alimentados con un 0,2% de β -sitosterol. Por otro lado, también se obtienen resultados contrarios como el estudio de Quilliot et al. (2001) que observa una falta de efecto de los EV sobre el cáncer de colon en ratas, para una ingesta de 24 mg/día.

Distintos estudios sugieren que los EV dietéticos inhiben el crecimiento tumoral del cáncer de mama a través de una acción independiente a la de los estrógenos (Bradford y Awad, 2007). Awad et al. (2000b) señalan que los tamaños de tumores en ratones (inmunodeficientes) alimentados con una dieta rica en EV (2%) fueron un 33% más pequeños que los alimentados con la dieta rica en colesterol (2%) tras la inducción de cáncer de mama. Ju et al. (2004) detectan que el consumo de β -sitosterol (0,98%) en ratones ovariectomizados con células de cáncer de mama MCF-7 reducen del 32-42% en el tamaño del tumor mediante una acción independiente de los estrógenos.

Awad et al. (2001a) examinan el efecto protector de los EV frente a la proliferación y metástasis de células de cáncer de próstata humano en ratones inmunodeficientes y observan una reducción del tamaño del

tumor de los ratones alimentados con una dieta rica en EV frente a los alimentados con colesterol.

1.3.3 Antiinflamatorio

El papel de la inflamación se ha consolidado dentro de las teorías que describen el proceso de la aterosclerosis. Los marcadores más fiables e importantes de los procesos inflamatorios son las citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), además de la proteína C reactiva (CRP), marcador prototípico de la inflamación (Rudkowska, 2010). La activación de los macrófagos también conduce a la estimulación de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) con la consiguiente sobreproducción de prostaglandina E2 (PGE2), que desempeñan un papel clave en la patogénesis de los procesos inflamatorios. Otro eicosanoide de particular importancia es el tromboxano A2 (TXA2) que es un potente inductor de la agregación plaquetaria, vasoconstricción y broncoconstricción (Montserrat-de la Paz et al., 2012).

Existen evidencias que sugieren que los EV, especialmente el β -sitosterol, pueden tener actividad antiinflamatoria.

En estudios *in vitro*, Gabay et al. (2010) analizan el papel del estigmasterol en la expresión de varios genes implicados en la inflamación mediada por IL-6 y en la degradación del cartílago. El estigmasterol es capaz de unirse a la membrana de los condrocitos, posee propiedades anti-inflamatorias y anti-catabólicas, contrarresta la expresión de genes implicados en la degradación del cartílago, junto con un efecto inhibitor sobre mediadores pro-inflamatorios (PGE2). El β -sitosterol reduce algunas vías de transducción de señales pro-

inflamatorias como IL-6, TNF α , en macrófagos de ratón J774A.1 (Valerio y Awad, 2011). Montserrat-de la Paz et al. (2012) han estudiado el efecto de EV obtenidos a partir de aceite de *Evening Primrose* en macrófagos, observando una disminución tanto de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α , IL-1 β y el tromboxano B2, como de la fosfolipasa A2 secretora, que promueve la liberación del ácido araquidónico, sustrato para la biosíntesis de eicosanoides proinflamatorios.

En estudios *in vivo*, en ratones, se ha indicado una reducción de la inflamación pulmonar por inyección intraperitoneal de β -sitosterol (Bouic, 2001). El consumo oral o aplicación tópica de una mezcla de EV también demuestra una disminución o incluso inhibición de edemas (Navarro et al., 2001). Valerio et al. (2011) realizan un estudio en un modelo animal de esclerosis múltiple (ratones), obteniendo que el tratamiento con EV disminuye la incidencia de la enfermedad por la reducción de la presencia y actividad inflamatoria de los macrófagos en el cerebro de los animales. Sin embargo, los resultados de otros estudios sobre el efecto del β -sitosterol en la prevención o reducción de la inflamación son contradictorios (Calpe-Berdiel et al., 2007).

En humanos, los datos sobre los efectos del consumo de alimentos enriquecidos con EV en los marcadores inflamatorios son escasos y contradictorios (Trautwein y Demonty, 2007). La ingesta, durante 8 semanas, de un zumo de naranja con EV (2 g/día), muestra una reducción significativa (12%) en las concentraciones de CRP (Devaraj et al., 2006). Otros investigadores han analizado el impacto de los EV junto a otros componentes. Es conocido que la suplementación con ácidos grasos omega-3 se asocia con un efecto hipotriglicéridémico, anti-agregante y antiinflamatorio (Rudkowska, 2010). En esta línea, se ha estudiado la

combinación de AG omega-3 y EV sobre los marcadores inflamatorios, obteniendo una reducción de CRP (39%), TNF α (10%) e IL-6 (11%), el riesgo general de las enfermedades cardiovasculares se reduce en un 23% con la combinación de AG omega-3 y EV en comparación con el placebo o ambos tipos de compuestos por separado (Micallef y Garg, 2009).

Sin embargo, en otros estudios no se observa una acción antiinflamatoria de los EV. En hombres hipercolesterolémicos sanos que consumen margarina enriquecida con EV (2 g/día) no se muestran cambios en los niveles de CRP (Houweling et al., 2009). En pacientes bajo tratamiento con estatinas que consumen, a largo plazo, margarinas enriquecidas con EV (2,5 g/día), no se ven afectados sus marcadores de estado antioxidante, estrés oxidativo, disfunción endotelial o inflamación (De Jong et al., 2008).

Por otro lado, existen resultados contradictorios con respecto a los efectos proinflamatorios de β -sitosterol y campesterol. Además de los macrófagos, existen evidencias de la implicación de los linfocitos T en el proceso inmuno-inflamatorio de la aterosclerosis (Gylling et al., 2014). Los EV ejercen propiedades inmunomoduladoras, por la respuesta de la célula T “helper” 1 (Th1), debido un aumento de la producción de las citoquinas Th1, γ -interferón e IL-2 (Brüll et al., 2010). La EAS, concluye en este aspecto que, no se debe excluir la posibilidad de acumulación de EV en las células vasculares como consecuencia de un aumento en la concentraciones circulantes al incrementar su consumo (Gylling et al., 2014).

1.4 Fuentes de enriquecimiento en esteroides vegetales

1.4.1 Obtención industrial

Como se ha comentado en el punto 1.2, los EV se encuentran de forma natural en la dieta. En la población española, la ingesta media diaria es de 276-375 mg de EV/día, cantidad similar a la determinada en estudios de otros países (salvo algunas diferencias sobre todo debidas al consumo de aceite de oliva y pan integral) (Jiménez-Escrig et al., 2006). Con el fin de aumentar esta ingesta y poder reducir los niveles de LDL-col, se ha procedido al enriquecimiento en EV de diversos alimentos.

Las principales fuentes de EV para el enriquecimiento de alimentos y como suplementos dietéticos son los aceites vegetales y el destilado de “tall oil”. Dado que los EV sólo están presentes en bajas concentraciones en las células vegetales y sus membranas, éstos han de ser extraídos utilizando diferentes técnicas.

Los principales aceites vegetales fuentes de EV son el de soja, maíz, girasol, colza y germen de trigo (Kamal-Edin y Moazzami, 2009).

Los aceites vegetales crudos deben ser procesados con el fin de eliminar impurezas, tales como material proteico, fosfátidos, compuestos volátiles olorosos, ceras, AG libres, pigmentos, productos de oxidación, jabones y trazas de metales. Dicho refinado puede ser químico incluyendo: desgomado con agua, neutralización alcalina, blanqueo con arcilla ácida y desodorización por vacío. O puede ser un refinado físico que incluye: desgomado con agua, blanqueo con arcilla ácida y refinado con vapor (Fernandes y Cabral, 2007).

Los EV, tocoferoles y otros compuestos insaponificables se pierden progresivamente durante el refinado, sobre todo durante la etapa de desodorización, de tal modo que, pueden ser recuperados de los subproductos del destilado (Kamal-Edin y Moazzami, 2009). Con el tiempo, se han ido desarrollando distintos métodos de purificación y separación de los EV de este subproducto del refinado de aceites. Como la extracción con disolventes, mediante tratamientos químicos o por destilación molecular (técnica de destilación más rápida que permite la extracción de grandes cantidades de EV). Sin embargo, estas técnicas, son de bajo rendimiento (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).

El método más viable para la extracción de EV es el tratamiento de los aceites vegetales con vapor, a vacío, obteniéndose un subproducto conocido como "destilado desodorizado". Este subproducto contiene entre 10-30% de fracción insaponificable, de la cual el 40% son EV. El proceso consta de tres etapas: hidrólisis o transesterificación para romper el enlace éster entre los EV y los AG y así obtener EV libres; esterificación de éstos con un alcohol, normalmente metanol, ya que los metil-ésteres son más volátiles; y, finalmente, recuperación de los EV en mayor concentración. Esta última etapa se puede producir de tres formas distintas: a) extracción física (por cristalización de los EV), b) extracción química (mediante disolventes orgánicos) y c) extracción físico-química (mediante la formación de aductos) (Rozner y Garti, 2006).

Otra fuente importante de EV es el aceite de resina ("tall oil"). El "tall oil" es un subproducto de la industria de la pulpa de madera, obtenido a partir de maderas blandas, principalmente del género *Pinus*. El "tall oil" normalmente se recupera en el proceso del "papel kraft" (papel de estraza), proceso que se diferencia de la producción de otros

papeles por la adición de sulfitos ácidos, que generan una mayor degradación de la celulosa.

En la fabricación de la pasta de madera, en un digestor de vapor, las virutas de madera se mezclan con sulfuro e hidróxido de sodio, para disolver la mayor parte de la lignina y parte de las hemicelulosas. La mezcla alcalina se saponifica, convirtiendo las grasas y resinas ácidas en sus sales de sodio, dando lugar a una pasta y una mezcla química llamada “licor negro” (“black liquor”). La pasta obtenida se concentra obteniendo el “tall oil soap” (jabón de aceite de resina), compuesto por las sales de sodio de los AG y ácidos resínicos (jabones, “soap”) e insaponificables (alcoholes grasos, ésteres de AG, esteroides libres y esterificados) (Fernandes y Cabral, 2007). Al “tall oil soap” se le adiciona un ácido mineral, ácido sulfúrico generalmente, para obtener una fase acuosa y una fase grasa. La fase grasa obtenida es el “crude tall oil” (aceite de resina crudo) que contiene AG libres, ácidos resínicos y compuestos insaponificables. Los distintos componentes del “crude tall oil” son separados mediante una destilación fraccionada en la que se utilizan elevadas temperaturas (próximas a los 300 °C) y se generan dos fases: “depitch tall oil”, parte más ligera que contiene mayoritariamente AG y ácidos resínicos y “pitch tall oil” que contiene la mayor parte del insaponificable, teniendo en cuenta que las elevadas temperaturas degradan gran parte de los EV (Fernandes y Cabral, 2007).

En todo este proceso los EV se recuperan del “tall oil soap”, “crude tall oil” y “pitch tall oil”, mediante distintos procesos y patentes existentes (Fernandes y Cabral, 2007).

Los procesos para el aislamiento de EV a partir del “tall oil” son, generalmente, similares a los aplicados en aceites vegetales, aunque a

veces se aplica una etapa de formación de complejos de esteroides con cloruro de calcio (Kamal-Edin y Moazzami, 2009). De forma general, el proceso incluye refinado, purificación y, finalmente, se esterifican con AG (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).

En este contexto, en esta tesis doctoral, se han evaluado ocho ingredientes fuente de EV. Este estudio ha permitido la selección de los ingredientes más idóneos a utilizar en el enriquecimiento de las bebidas objeto de estudio. Los resultados han dado lugar a la publicación: *González-Larena, M., García-Llatas, G., Vidal, M.C., Sánchez-Siles, L.M., Barberá, R., & Lagarda, M.J. (2011). Stability of plant sterols in ingredients used in functional foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 3624–3631 y 13365–13365.*

Hasta el momento de la realización de este trabajo, no había sido publicado ningún estudio donde se compararan y analizaran distintos ingredientes fuente de EV utilizados en el enriquecimiento de alimentos. El interés del trabajo se centra en disponer de información acerca de la composición en EV en los ingredientes actualmente disponibles en el mercado para el enriquecimiento de alimentos, así como la presencia de POPs en los mismos. Estos aspectos son relevantes para la industria y seguridad alimentaria.

1.4.2 Adición a alimentos

En general, los alimentos grasos han constituido el principal vehículo de adición de EV, dado que los EV esterificados con AG se solubilizan fácilmente en estos alimentos. Los primeros alimentos que se desarrollaron con adición de EV fueron de alto contenido lipídico, como margarinas, mayonesa y aderezos para ensaladas (Kamal-Edin y

Moazzami, 2009). En Europa el primer alimento comercializado enriquecido con EV fue una margarina (Benecol, Raisio) en Finlandia en 1995 (Moreau et al., 2002). A partir de este momento, empieza a darse un interés creciente por la comercialización de productos alimenticios con EV.

Este tipo de alimentos grasos son contrarios a las recomendaciones dietéticas actuales orientadas a un menor consumo de grasas, por ello se han propuesto otras matrices con menor contenido lipídico, por ejemplo, leches fermentadas, bebidas a base de zumo de frutas o arroz, como alimentos con mejor perfil nutricional.

Por esta razón, se han creado nuevas técnicas para incorporar EV esterificados a alimentos tanto ricos como bajos en lípidos, como son el pan, cereales, leche o yogur, que han resultado ser tan efectivos para disminuir el colesterol sérico como cuando se incorporan a margarinas. También se ha desarrollado la incorporación de EV no esterificados a alimentos bajos en grasa, por ejemplo zumos y yogures, donde deben estar adecuadamente solubilizados, ya sea a partir de polvo fino, en formas emulsionadas o microencapsuladas (Kamal-Edin y Moazzami, 2009).

Por otro lado, la incorporación de EV a alimentos resulta difícil debido a su alto punto de fusión, lo cual hace que tiendan a formar cristales insolubles. A continuación, se enumeran distintas formas de incorporación de EV a los alimentos:

- ❖ Adición a alimentos de alto contenido en grasa. Mediante la esterificación de los EV con AG poliinsaturados, que aumentan la solubilidad de los esteroides. Las lipasas hidrolizan el AG para liberar los EV.

- ❖ Adición a alimentos de base acuosa. Mediante la formación de una emulsión aceite-en-agua, donde la fase dispersa está constituida por la fracción lipídica con los EV y la fase continua es la fracción acuosa del alimento. Estas emulsiones, al ser termodinámicamente desfavorables, requieren de la adición de emulgentes que eviten la agregación de la fase dispersa. La elección del o de los emulgentes más adecuados, es uno de los factores más importantes que determinan la vida útil del alimento (McClements et al., 2007).

Los materiales cristalinos (EV) son a menudo difíciles de incorporar en los productos líquidos, debido a su tendencia a agregarse y sedimentar, lo que provoca problemas en la propia estabilidad de la emulsión, en la dosificación de los EV en el producto (alimento), así como la absorción de los componentes bioactivos hidrófobos (EV) en el tracto gastrointestinal (McClements, 2012). Tanto para estos casos, como para proteger a los EV de la degradación durante la producción y almacenamiento del producto, se han desarrollado los sistemas de adición “delivery systems” coloidales, consistentes en pequeñas partículas dispersas dentro de un líquido portador, estando el componente activo (EV) encapsulado en dichas partículas (McClements, 2012).

➤ *Formación de encapsulados*

Un componente bioactivo hidrófobo cristalino (EV) puede constituir la totalidad de la fase lipídica o puede dispersarse en un portador lipídico antes de la formación de la emulsión. De tal modo que los EV pueden (**figura n° 5**):

- ❖ No formar cristales, se utilizan por debajo de su concentración de saturación, para ello deben ir encapsulados con un lípido portador líquido (compuesto bioactivo disuelto (a)).
- ❖ Formar cristales, su concentración es superior a la de saturación ((b), (c), (d), (e)), en este caso es importante asegurarse de que toda la fase lipídica (componente bioactivo + lípidos portadores) permanece en estado líquido durante todo el proceso de homogeneización. Para ello, la fase lipídica se calienta para fundir cualquier material cristalino antes de homogeneizar, para después de esta quedar en forma cristalina.

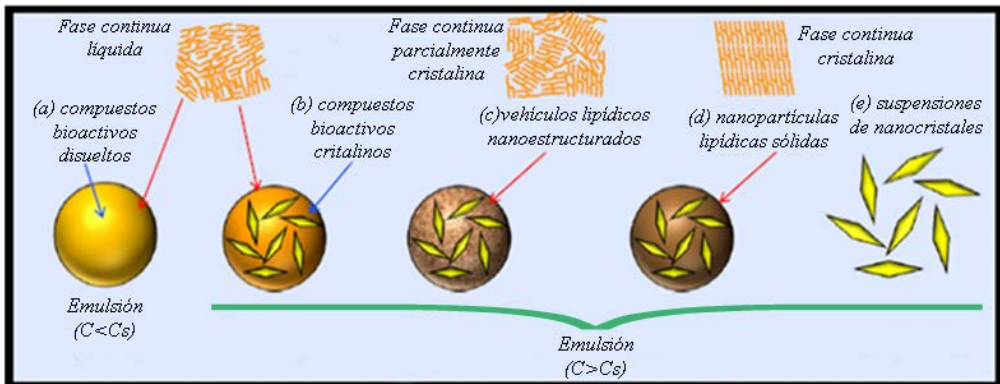


Figura n° 5: Sistemas de adición que contienen componentes bioactivos cristalinos. C : concentración, C_s : concentración de saturación (adaptado de McClements, 2012).

Por otra parte, las diferentes formas de encapsulación de componentes bioactivos cristalinos se clasifican en (**figura n° 5**):

- ❖ El portador lipídico que rodea a los EV dentro de la partícula coloidal es líquido. Si se utilizan concentraciones inferiores a la de saturación del componente, este queda disuelto (a) si es superior quedará en cristales (b).

- ❖ Portador lipídico puede ser total o parcialmente cristalino (como en vehículos lipídicos nanoestructurados (c) o nanopartículas lipídicas sólidas (d)).
- ❖ El componente bioactivo puede ser totalmente dispersado en la fase continua acuosa en forma de cristales (suspensiones de nanocristales (e)).

En cualquier caso, es importante asegurar que el sistema de adición se mantiene estable a lo largo de su vida útil, así como que cualquier componente bioactivo encapsulado dentro de un sistema de adición “delivery system” se libera realmente dentro del tracto gastrointestinal (McClements, 2012).

Existen un número considerable de patentes de las diferentes formas de adición de los EV, Kamal-Edin y Moazzami (2009) presentan un compendio de los mismos muy interesante hasta 2008. En el **Anexo n° I** se presenta una recopilación de patentes relacionadas con la incorporación de EV a alimentos hasta 2013.

1.5 Legislación

El primer Reglamento que regula la comercialización de alimentos enriquecidos en EV es la legislación europea de “nuevos alimentos” (Reglamento 1997/258/CE del Parlamento Europeo y del Consejo). Este reglamento afecta a alimentos e ingredientes tales como: a) alimentos transgénicos, b) alimentos e ingredientes que poseen una estructura molecular nueva, c) alimentos procedentes de microorganismos, hongos y algas, d) procedentes de animales y plantas en cuya reproducción se empleen métodos no tradicionales y e) los obtenidos con nuevos procesos

de producción, que impliquen cambios significativos en la composición o estructura de los alimentos o ingredientes que afecten su valor nutricional, metabolismo o las concentraciones de sustancias no deseables. Atendiendo a ello, todos aquellos alimentos enriquecidos en EV y los propios ingredientes que los contienen, se encuentran incluidos como “nuevos alimentos”.

Por otro lado, para poder comercializar un nuevo alimento o ingrediente alimentario se debe cumplir: a) no debe suponer ningún riesgo para el consumidor, b) no debe inducir a error al consumidor y c) no debe diferir de otros alimentos o ingredientes alimentarios a los que vaya a sustituir a fin de que su consumo normal no implique desventajas para el consumidor desde el punto de vista de la nutrición.

1.5.1. Comercialización de alimentos con adición de EV

Hasta la fecha, se han ido publicando distintas Decisiones Europeas en las que se autoriza el enriquecimiento en EV en distintos alimentos, en el contexto de los “nuevos alimentos” (Reglamento 1997/258/CE). En el **cuadro nº 4** se presenta un compendio de dichas Decisiones. Por otra parte, a través de un procedimiento simplificado, distintas compañías notifican a la Comisión Europea su intención de comercializar alimentos de carácter similar a los productos ya aprobados en la Unión Europea. En el procedimiento de notificación, sólo se requiere de una autoridad nacional competente en alimentos para considerar su producto sustancialmente equivalente a los productos ya aprobados. Los alimentos enriquecidos en EV que han sido aprobados para su comercialización en la Unión Europea pueden consultarse en la página web:

http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/index_en.htm

Cuadro nº 4: Decisiones de la Comisión Europea relativas a la comercialización de alimentos con adición de esteroides vegetales.

Decisión de la Comisión	Alimento	Forma de los EV	Solicitante (país de solicitud)
2000/500/CE	-Grasas amarillas para untar	Esteres de fitoesterol	Unilever (Países Bajos)
2004/333/CE	-Grasas amarillas para untar -Aliños para ensaladas que contengan mayonesa -Bebidas tipo leche: semidesnatada y leche desnatada, bebidas de frutas, cereales y soja, productos tipo leche fermentada (queso y yogur) en los que se haya reducido la grasa y/o proteína de la leche o se hayan sustituido total o parcialmente por grasa o proteína de origen vegetal	EV libres	Archer Daniels Midland Company (Países Bajos)
2004/334/CE	-Grasas amarillas para untar -Productos tipo leche semidesnatada y leche desnatada y tipo yogur en los que la grasa de la leche se haya sustituido total o parcialmente por grasa vegetal	EV libres	Pharmaconsult Oy Ltd (antes MultiBene Health Oy Ltd) (Finlandia)
2004/335/CE	-Productos tipo leche semidesnatada y leche desnatada -Productos tipo yogur -Productos tipo leche/yogur En los que la grasa de la leche se haya sustituido total o parcialmente por grasa vegetal	Esteres de fitoesterol	Unilever (Reino Unido)
2004/336/CE	-Grasas amarillas para untar -Bebidas de fruta a base de leche, productos tipo leche fermentada (queso y yogur) En los que la grasa de la leche se haya sustituido total o parcialmente por grasa vegetal	EV libres	Teriaka Ltd (Finlandia)

Cuadro n° 4 continuación: Decisiones de la Comisión Europea relativas a la comercialización de alimentos con adición de esteroides vegetales.

Decisión de la Comisión	Alimento	Forma de los EV	Solicitante (país de solicitud)
2004/845/CE	-Productos tipo leche semidesnatada y leche desnatada en los que la grasa de la leche se haya sustituido total o parcialmente por grasa vegetal	EV libres	Forbes Medi-Tech Inc (anteriormente Novartis) (Belgica)
2006/58/CE	-Pan de centeno con harina que contiene $\geq 50\%$ de centeno (harina integral de centeno, granos de centeno enteros o fragmentados y copos de centeno) y $\leq 30\%$ de trigo; con $\leq 4\%$ de azúcar añadido pero sin grasa añadida	EV libres	Pharmaconsult Oy Ltd. (anteriormente MultiBene Health Oy Ltd.) (Finlandia)
y			y Karl Fazer Ltd. P (Finlandia)
2006/59/CE			Enzymotec (Países Bajos)
2007/343/CE	-Aceites en los que: los ácidos grasos libres (expresados como ácido oleico) son un máximo del 2%, Monoacilgliceroles máximo del 10% y Diacilgliceroles máximo del 25%, con TG para completar el equilibrio	EV libres	
2008/36/CE	Bebidas de arroz	EV libres	Teriaka Ltd (Finlandia)

CE: Comisión Europea; EV: Esteroides vegetales; TG: triacilglicéridos

Los jugos y néctares de frutas enriquecidos con EV están a la espera de aprobación, ya que cuentan con el beneplácito de la EFSA (autoridad europea en seguridad alimentaria) desde 2007 (EFSA 2007 Statement).

En todas las Decisiones excepto en la primera (2000/500/CE) se establecen los porcentajes relativos de EV determinados por GC(FID) o método equivalente: < 80% β -sitosterol; < 15% β -sitostanol; < 40% campesterol; < 5% campestanol; < 30% estigmasterol; < 3% brassicasterol y < 3% otros esteroides y estanoles. Así mismo se limita el contenido máximo a 3 g de EV por día. Sin embargo, en la Decisión 2000/500/CE, se establece un contenido máximo del 8% (p/p) de fitoesterol, equivalente al 14% (p/p) de ésteres de fitoesterol, estando establecida la composición de los fitoesteroides como: Campesterol 10-40%; estigmasterol 6-30%; β -sitosterol 30-65% y otros 0%-5%.

El aumento de la ingesta de EV repercute en la absorción de algunas vitaminas liposolubles. El Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF) en el año 2000 determinó que la ingesta de 20 g al día de productos que contienen un 8% de fitoesteroides libres durante un año reducen la concentración de β -caroteno sanguíneo en un 20% (SCF, 2000). Así pues, se establecen unos requisitos específicos adicionales en materia de etiquetado, de tal modo que debe figurar: el contenido de EV, que se indique que el producto está destinado a las personas que desean bajar sus niveles séricos de colesterol, y que las personas que presenten tratamiento farmacológico sólo deben consumir el producto bajo control médico. Por otra parte, se debe indicar que el producto puede no ser nutritivamente apropiado para ciertos grupos de población y debe

consumirse como parte de una dieta rica en frutas y vegetales, para aportar β -caroteno (Decisión 2000/500/CE).

En 2002, el SCF publica una opinión general sobre el consumo de EV a largo plazo y su efecto sobre el β -caroteno. Se indica que no existen pruebas de que consumos superiores a 1-3 g de EV/día supongan beneficios adicionales en la reducción del colesterol. Por otra parte, también se indica que los EV interfieren en la absorción de β -caroteno, así como en menor medida en otras vitaminas liposolubles, como la vitamina E. Se determina que los efectos observados y los posibles mecanismos implicados tienen que ser considerados para una evaluación adecuada de los riesgos asociados con el consumo de productos enriquecidos en EV, sobre todo en una perspectiva a largo plazo. Aun así, en general, se acepta que la ingesta de 10 mg/día de β -caroteno, a partir de frutas y verduras ricas en carotenoides, produce un aumento significativo de la concentración sanguínea de β -caroteno. De modo que el SCF recomienda el uso de las fuentes naturales de β -caroteno y otros nutrientes liposolubles para compensar la reducción en sangre de los mismos, causados por el consumo a largo plazo de alimentos enriquecidos en EV. Por último, se establece la no idoneidad del consumo de estos productos en el embarazo, lactancia o infancia, por ser superiores en estas etapas las necesidades de vitamina A (SCF, 2002).

A raíz de la opinión del SCF, se adoptan medidas para la regularización del etiquetado de alimentos e ingredientes alimentarios enriquecidos en EV (Reglamento 2004/608/CE):

- ❖ La composición y el etiquetado de los productos deberán ser tales que los usuarios puedan restringir fácilmente su consumo a un máximo de 3 g/día de fitoesteroles o fitoestanoles, o bien con una

porción de 3 g como máximo o bien con tres porciones de 1 g como máximo.

- ❖ En el mismo campo de visión que el nombre con el que se comercializa el producto, aparecerán, en un formato que facilite su visión y lectura, las palabras: «con esteroides/estanoles vegetales añadidos».
- ❖ En la lista de ingredientes se indicará el contenido de fitoesteroides, ésteres de fitoesterol, fitoestanoles y ésteres de fitoestanol añadidos (expresado en porcentaje o en g de esteroides o estanoles vegetales libres por 100 g o 100 ml de alimento).

1.5.2. Declaraciones saludables

El Reglamento 2006/1924/CE relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos define los siguientes tipos de declaraciones:

- ❖ Declaraciones nutricionales (“nutritional claims”): da a entender que un alimento posee propiedades nutricionales beneficiosas específicas con motivo del aporte energético o los nutrientes u otras sustancias.
- ❖ Declaraciones de propiedades saludables (“health claims”): da a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes y la salud.
- ❖ Declaración de reducción del riesgo de enfermedad (“reduction of disease risk claim”): da a entender que el consumo del alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente el factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana.

Dichas declaraciones se pueden utilizar en el etiquetado, la presentación y la publicidad de alimentos comercializados, los cuales deben poseer un efecto nutricional o fisiológico beneficioso, establecido mediante pruebas científicas aceptadas. Además, estos alimentos deben contar con una cantidad significativa que produzca el efecto nutricional o fisiológico declarado, en la cantidad del producto que cabe razonablemente esperar que sea consumido; se debe hallar en una forma asimilable por el organismo y el consumidor medio debe poder comprender los efectos beneficiosos tal y como se expresan en la declaración. Finalmente, cumpliendo estos requisitos han de ser favorablemente evaluados por la EFSA. (Reglamento 2006/1924/CE). En el **cuadro nº 5** se resumen las distintas declaraciones de propiedades saludables que se han autorizado en alimentos adicionados de EV.

Cuadro nº 5. Declaraciones permitidas de propiedades saludables relativas a los esteroides vegetales.

Nutriente	Declaración	Condiciones de uso	Reglamento
Fitoesteroides: esteroides extraídos de plantas, libres o esterificados con ácidos grasos para uso alimentario	Se ha demostrado que los fitoesteroides disminuyen/reducen la colesterolemia. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria mínima de 2 gramos de fitoesteroides	2009/983/CE
Ésteres de fitoestanol	Se ha demostrado que los ésteres de fitoestanol disminuyen/reducen la colesterolemia. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria mínima de 2 gramos de fitoestanoles	2009/983/CE
Fitoesteroides y fitoestanoles	Los fitoesteroides y los fitoestanoles contribuyen a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria mínima de 0,8 g de fitoesteroides o fitoestanoles	2012/432/CE

CE: Comisión Europea.

2. ÓXIDOS DE ESTEROLES VEGETALES

2.1. Estabilidad de los esteroides vegetales en alimentos

Con la adición de EV a los alimentos a concentraciones superiores a las aportadas por la dieta, se plantea el problema de su estabilidad, tanto durante el procesado como en el almacenamiento de los alimentos. La oxidación de los EV suele darse en el C7, en otras posiciones del anillo esteroideo o en la cadena lateral, dando lugar a la formación de productos de oxidación de esteroides (SOPs). En el caso de la oxidación del colesterol, los productos resultantes se denominan COPs, y cuando se oxidan los EV los productos resultantes se denominan POPs (Otaegui-Arrazola et al., 2010). La formación de COPs ha sido ampliamente estudiada (Schroepfer, 2000; Lacker y Rodríguez-Estrada, 2002; Valenzuela et al., 2003; Otaegui-Arrazola et al., 2010).

Se han publicado diversas revisiones sobre la formación, contenidos en alimentos y efectos biológicos de los POPs (Dutta, 2002; Guardiola et al., 2004; Ryan et al., 2009; Hovenkamp et al., 2009; Brown y Jessup, 2009; Otaegui-Arrazola et al., 2010; García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011; Vanmierlo et al., 2013; O'Callaghan et al., 2014; Alemany et al., 2014).

En general, los oxisteroides se dividen en dos categorías: aquellos donde la oxidación se produce en el anillo, principalmente en la posición 7 (por ejemplo, $7\alpha/\beta$ -hidroperoxiesterol (7-OOH), 7-cetoesterol (7-ceto) y $7\alpha/\beta$ -hidroxiesterol ($7\alpha/\beta$ -OH)) y la que tiene lugar en la cadena lateral (por ejemplo, 24-hidroxiesterol (24-OH), 25-hidroxiesterol (25-OH) y 27-hidroxiesterol (27-OH)) (Brown y Jessup, 2009), en la **figura nº 6** se presentan los POPs principales.

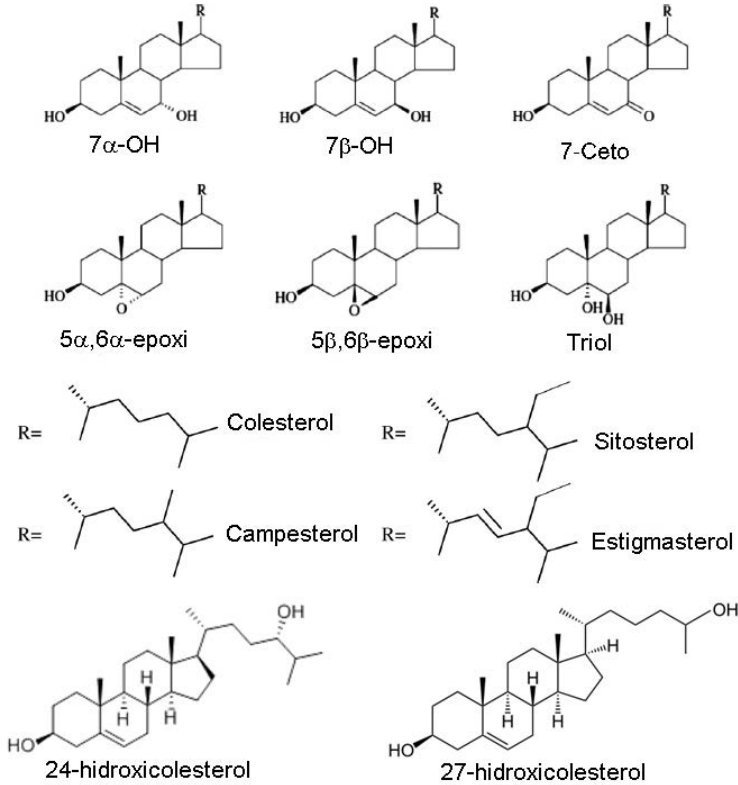


Figura n° 6: Estructuras de los principales productos de oxidación de los esteroides vegetales (adaptado de Otaegui-Arrazola et al., 2010).

La oxidación de los EV puede tener lugar por (Smith, 1987):

- mecanismos enzimáticos
- mecanismos no enzimáticos, que pueden inducirse por: calor y fotooxidación, aire, agua o metales pesados

Las vías no enzimáticas afectan principalmente al anillo de esteroide mientras que las enzimáticas lo hacen en la cadena lateral. Sin embargo, hay algunas excepciones como 25-OH y 7 α -OH que pueden ser generados por ambas vías (Otaegui-Arrazola et al., 2010).

2.1.1 Oxidación enzimática

Se asume que la oxidación de los EV es similar a la del colesterol (Dutta, 2002). La oxidación enzimática en la cadena lateral del colesterol, genera 24, 25 y 27-hidroxiesterol y cada oxisterol se genera por enzimas diferentes (Russell, 2000).

El 27-OH se genera por la enzima P450 mitocondrial esterol 27-hidroxilasa que cataliza la adición de un grupo hidroxilo en la cadena lateral del esterol. La enzima 27-hidroxilasa puede hallarse en diversos tejidos pero sobre todo en hígado. La 24-hidroxilasa es también una enzima P450 que está en el retículo endoplásmico con mayor expresión en las células neuronales del cerebro y la retina. La enzima 25-hidroxilasa es una proteína que contiene hierro no hemo que se expresa en niveles muy bajos en la mayoría de los tejidos y da lugar asimismo a 25-OH (Brown y Jessup, 2009).

2.1.2 Oxidación no enzimática

❖ Radicalaria por autooxidación

Los esteroles pueden ser oxidados por distintas ROS como ozono (O_3), oxígeno singlete (1O_2), hidroperóxidos (H_2O_2), dioxígeno catiónico (O_2^+) y radical hidroxilo ($HO\cdot$). Siendo el mecanismo más común de autooxidación el del oxígeno triplete en su estado fundamental (3O_2) (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011). Se pueden distinguir dos rutas principales, oxidación del C7 y epoxidación.

La primera (C7) implica la oxidación de dicho carbono por la abstracción del hidrógeno reactivo alílico. Esta ruta incluye (ver **figura n° 7**): 1º) Después de la abstracción del radical $H\cdot$ en C7, reacciona con el oxígeno molecular, formándose 7-OOH. 2º) A partir de 7-OOH, por

descomposición, formación de los epímeros $7\alpha/\beta$ -OH. 3º) A partir de 7-OOH por deshidratación, formación de 7-ceto. 4º) A partir de $7\alpha/\beta$ -OH por deshidrogenación, formación de 7-ceto.

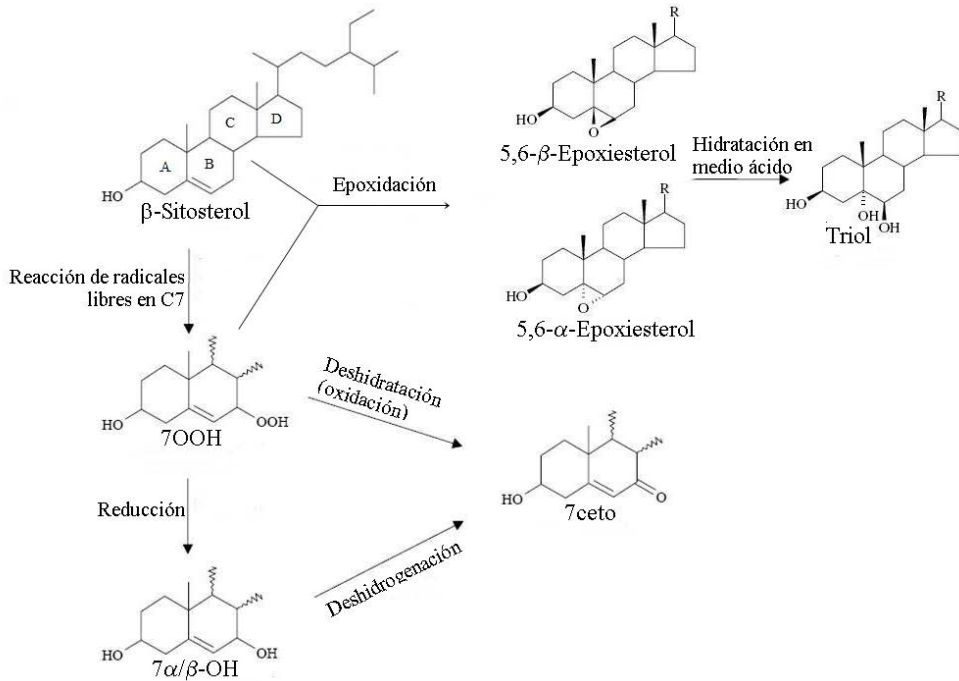


Figura n° 7: Mecanismo radicalario de oxidación del β -sitosterol (adaptación de Soupas et al., 2004a)

La ruta de epoxidación incluye la formación de (α/β) 5,6-epoxiesteroles (α/β -epoxi) a partir la reacción entre los 7OOH y el esterol no oxidado (Chien et al., 1998). A partir de los epoxiesteroles, por hidratación en medio ácido, se generan los trioles (Smith, 1987) (ver **figura n° 7**).

En un estudio de cálculo de entalpía de disociación de enlaces (BDE) se ha demostrado, que en la mayoría de los Δ^5 -esteroles el enlace con la BDE más baja corresponde al H del C7, lo que explica que este sea el mecanismo más común de autooxidación (Lengyel et al., 2012).

La autooxidación también puede darse en la estructura de la cadena lateral de la molécula esteroide, aunque en mucha menor medida. Los mecanismos de oxidación son los mismos que se dan en la oxidación del anillo, e incluyen la formación de hidroperóxidos que generan productos de oxidación secundarios. Los sitios más favorables para la formación de hidroperóxidos son C20, C24 y C25. (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).

❖ No radicalaria por fotooxidación

Esta oxidación se produce por la formación de un oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) generado por la acción de la luz sobre moléculas fotosensibles (ej: clorofila, riboflavina). En el estado singlete, los dos electrones no apareados en los orbitales exteriores tienen espín opuesto, ello genera una gran repulsión electrostática y gran reactividad. El ataque electrofílico se da en el doble enlace de la molécula esteroide, generando un hidroperóxido primario 5α -hidroperóxido que se reordena a 7-OOH. A partir de este punto, la formación de los productos de oxidación secundaria son como en la autooxidación radicalaria (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011). Los productos de oxidación secundaria mayoritarios por radiación son $7\alpha/\beta$ -OH y β -epoxi (Zhang et al., 2006).

2.2 Contenidos de POPs en alimentos

A diferencia de los alimentos de origen animal que contienen únicamente óxidos de colesterol, en los alimentos de origen vegetal, la diversidad de productos de oxidación que pueden ser descritos es al menos 3 veces mayor, dado que se puede producir la oxidación de cada EV presente en la matriz (Dutta, 2002). Por lo general, los POPs en los alimentos se presentan como componentes traza en matrices complejas que interfieren en el análisis, todo esto unido a la escasez de patrones comerciales, hace complejo el análisis de POPs en alimentos. (Guardiola et al., 2004). En el **cuadro n° 6** se presentan los contenidos de POPs en distintos alimentos, los EV de los que proceden, los tipos de POPs descritos, así como el porcentaje de oxidación de los EV.

En este contexto, en esta tesis doctoral se han identificado y cuantificado los EV y los posibles POPs formados en bebidas a base de zumo de frutas con y sin leche con EV libres o esterificados de diferentes orígenes (“tall oil” y aceites vegetales). Este estudio ha permitido la selección del ingrediente más idóneo para su adición a las bebidas objeto de estudio. Los resultados obtenidos han dado lugar a la publicación: *Alemany-Costa, L., González-Larena, M., García-Llatas, G., Alegría, A., Barberá, R., Sánchez-Siles, L.M., & Lagarda, M.J. (2012). Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources. Food Research International, 48, 265-270.* Señalar que, como consta en la publicación, Alemany-Costa y González-Larena han contribuido con la misma participación como primeras autoras del trabajo.

No constan estudios anteriores con el objetivo de identificar y cuantificar POPs en bebidas a base de zumo de frutas con o sin leche.

Este trabajo ha contribuido a aportar información sobre la idoneidad de dos fuentes distintas de EV utilizadas en el enriquecimiento con EV de este tipo de bebidas, lo que sin duda es de interés en el sector industrial. Por otra parte permite disponer del contenido en POPs por su posible repercusión biológica.

Cuadro n° 6: Contenidos POPs en µg/g grasa o en (µg/g de muestra) en distintos alimentos y porcentaje de oxidación de los EV^a.

Muestra	Tratamiento	POPs	% Ox./EV	EV	POPs	Referencia
Aceites						
Colza/Palma	2 días después de fritura (200 °C/15')	(41,0) (59,4)	- -			
Girasol	2 días después de fritura (200 °C/15')	(39,9) (56,6)	- -	S, C, E	7α/β-OH, 7-ceto, α/β-epoxi, tríol	Dutta (1997)
Girasol alto oleico	2 días después de fritura (200 °C/15')	(46,7) (55,9)	- -			
Colza (EV 0,89%) ^b	180 °C/6 h 180 °C/12 h 180 °C/24 h	Nd (266) (625) (1092)	- 2,99 7,02 12,27	S, C	7α/β-OH, 7-ceto, α/β-epoxi, 25-OH	Lampi et al. (2002)
Colza (bajo en ácido eúrico)	Semirrefinado (sin desodorización) Refinado desodorización: 200 °C 225 °C 250 °C	(70,1) (68,7) (74,0) (72,5)	- - - -	B, C, S	7α/β-OH, 7-ceto, 6β-OH	Lambelet et al. (2003)
Girasol		(4,5-67,5)	-			
Maíz		(4,1-60,1)	-			
Cacahuete		(2,6-9,6)	-			
Oliva lampante		(1,5-2,5)	-	S, C, E	7α/β-OH, 7-ceto	Bortolomeazzi et al. (2003)
Aceite nuez de palma		(5,5)	-			

Cuadro n° 6 continuación: Contenidos POPs en $\mu\text{g/g}$ grasa o en $(\mu\text{g/g}$ de muestra) en distintos alimentos y porcentaje de oxidación de los EV^a.

Muestra	Tratamiento	POPs	% Ox./EV	EV	POPs	Referencia
Girasol	150 °C/30'	(50,8)	2,0			
	200 °C/30'	(72,6)	2,6			
	150 °C/60'	(223,1)	7,6			
	200 °C/60'	(240,9)	9,5			
Oliva	150 °C/30'	nd	-	S	7-ceto, 7 α / β -OH, α / β -epoxi, triol	Zhang et al. (2005)
	200 °C/30'	(6,0)	3			
	150 °C/60'	(125,7)	4,8			
	200 °C/60'	(37,1)	7,2			
Colza (EV 0,92%)	No refinado (extracto presión frío)	(8)	0,09			
	Refinado	(100-110)	1,09-1,2			
	Refinado y 6 meses almacenamiento	(127)	1,3		7 α / β -OH α / β -epoxi, triol	Rudzinska (2005)
	No refinado (extracto presión frío)	(9)	0,09	-		
Maíz (EV 0,99%)	Refinado	(36)	0,39			
	Refinado y 6 meses almacenamiento	(89)	0,9			
	180 °C/60'	(7,7)	0,75			
	180 °C/120'	(10,2)	0,99			
Cacahuete (EV 0,21%)	180 °C/60'	(17,6)	1,71			
	180 °C/60'	(7,1)	0,34			
	180 °C/120'	(5,4)	0,26			
	180 °C/120'	(6,8)	0,32	S, C, E	7 α / β -OH, 7-ceto, α / β -epoxi, 25-OH, triol	Johnson y Dutta (2006)
Maíz (EV 0,26%)	180 °C/60'	(4,3)	0,17			
	180 °C/120'	(12,4)	0,48			
		(12,2)	0,47			

Cuadro n° 6 continuación: Contenidos POPs en µg/g grasa o en (µg/g de muestra) en distintos alimentos y porcentaje de oxidación de los EV^a.

Muestra	Tratamiento	POPs	% Ox./EV	EV	POPs	Referencia
Girasol	Radiación: Solar 10; 20; 30 días UV 21; 42; 63 horas e ⁻ 0,93; 2,69; 9,3 kGy	(9,6)	0,4			
		(633; 1156; 1007)	9; 45; 39			
		(132; 231; 354)	5; 9; 14			
Soja	Radiación: Solar 10; 20; 30 días UV 21; 42; 63 horas e ⁻ 0,93; 2,69; 9,3 kGy	(20,9; 23,4; 23,7)	0,8; 0,9; 0,9			
		(0,8)	0,1			
		(417; 1070; 895)	22; 50; 49			
Oliva	Radiación: Solar 10; 20; 30 días UV 21; 42; 63 horas e ⁻ 0,93; 2,69; 9,3 kGy	(104; 207; 331)	6; 11; 18		7-ceto, 7α/β-OH, α/β-epoxi, trioi	Zhang et al. (2006)
		(2,8; 3,5; 4,4)	0,1; 0,2; 0,2	S		
		Nd				
Colza	Radiación: Solar 10; 20; 30 días UV 21; 42; 63 horas e ⁻ 0,93; 2,69; 9,3 kGy	(297; 648; 676)	20; 44; 46			
		(102; 233; 294)	7; 16; 17			
		(1,6; 2,2; 2,8)	0,1			
Oliva (EV 0,13%)	Radiación: Solar 10; 20; 30 días UV 21; 42; 63 horas e ⁻ 0,93; 2,69; 9,3 kGy	(1,9)	0,1			
		(659; 1327; 2421)	17; 34; 62			
		(522; 626; 1082)	12; 16; 28			
Oliva + 10% extracto de romero (EV 0,13%)	Radiación: 180 °C/1 h 180 °C/3 h 180 °C/6 h	(2,5; 2,6; 2,7)	0,1			
		(3,3)	0,25			
		(19,5)	1,49			
Oliva + 10% extracto de romero (EV 0,13%)	Radiación: 180 °C/1 h 180 °C/3 h 180 °C/6 h	(74,8)	5,7		7α/β-OH, 6β-OH, α/β-epoxi, 6-ceto, 7-ceto	D'Evoli et al. (2006)
		(151,2)	11,52			
		(3,8)	0,28	S		
Oliva + 10% extracto de romero (EV 0,13%)	Radiación: 180 °C/1 h 180 °C/3 h 180 °C/6 h	(10,0)	0,74			
		(22,6)	1,68			
		(82,6)	6,13			

Cuadro n° 6 continuación: Contenidos POPs en $\mu\text{g/g}$ grasa o en $(\mu\text{g/g}$ de muestra) en distintos alimentos y porcentaje de oxidación de los EV^a.

Muestra	Tratamiento	POPs	% Ox./EV	EV	POPs	Referencia
Colza (EV 0,80%)	160 °C/5'	(4,3)	0,1 (S)		7 α / β -OH, 6 α / β -OH, α / β -epoxi, 7-ceto, 6-ceto, 25-OH	Soupas et al. (2007)
	160 °C/10'		0,2 (S)	S, Stn, C, Ctn, E, B		
	180 °C/5'	(28)	0,3 (S)			
	180 °C/10'	(72)	0,7 (S)			
	200 °C/5'		1,7 (S)			
Oliva (EV 0,13%)		(5,1)	0,39	S, Stn C, E	7 α / β -OH, 6-OH, α -epoxi, 7-ceto, triol	Tabee et al. (2009)
Palma oleína (EV 0,04%)		(1,9)	0,43			
Colza (refinado)		(98,9-59,8)		Stn, Ctn, Btn,	6 β -OH, 7-ceto	Azadmard- Damirchi y Dutta (2009)
Avellana	crudo	(10,56)		S, Stn C, E	7 α / β -OH, 6 β -OH, α -epoxi, triol, 25-OH	
	refinado	(3,19)				
Colza 0,574%EV	Ran./Oph. (180 °C/4 h) :	(120,45)	2,10			Kimiecik et al. (2009)
	Sin antioxidantes	(196,26-184,31)	3,42-3,21			
	+BHT	(164,2-176,79)	2,86-3,08			
	+Extracto de té verde	(109,8-128,87)	1,91-2,25	S, E, C		
	+ Extracto de romero	(128,54-140,31)	2,24-2,44			

Cuadro n° 6 continuación: Contenidos POPs en µg/g grasa o en (µg/g de muestra) en distintos alimentos y porcentaje de oxidación de los EV^a.

Muestra	Tratamiento	POPs	% Ox./EV	EV	POPs	Referencia
Margarinas						
Enriquecida (8% EV)		(< 68)	0,08	S, Stn, C, Ctn, E, B	7α/β-OH, 6β-OH, 4β-OH, α/β-epoxi, 7-ceto, 6-ceto, triol	Grandgirard et al. (2004a)
No enriquecida EV 0,33% (62,7% grasa)		21,2 (13,31)	0,41	S, C, E	7α/β-OH, α/β-epoxi, triol, 7-ceto	Conchillo et al. (2005)
Enriquecida 6% EV (44,1% grasa)		105,1 (46,5)	0,07			
No enriquecida (0,68% EV)		(74)	1,09	-	7α/β-OH, α/β-epoxi, triol	Rudzinska et al. (2005)
Enriquecida con esteres de EV (34,3% grasa)		(12) 35		S, C, E	7α/β-OH, α/β-epoxi, triol, 7-ceto, 24-OH	Johnson y Dutta (2006)
Enriquecida (EV 7,9%)	4 °C/6 semanas 20 °C/6 semanas	(255) (354) (734)	0,32 0,45 0,93	S, Stn, C, Ctn, E, B, Av	7α/β-OH, α/β-epoxi, triol, 7-ceto	Rudzinska et al. (2014)
Otros alimentos						
Harina de trigo almacenada	2 meses 8 meses 36 meses	35,2 24,5 329		S	7α/β-OH, α/β-epoxi	Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1992)

Cuadro nº 6 continuación: Contenidos POPs en $\mu\text{g/g}$ grasa o en ($\mu\text{g/g}$ de muestra) en distintos alimentos y porcentaje de oxidación de los EV^a.

Muestra	Tratamiento	POPs	% Ox./EV	EV	POPs	Referencia
Galleta (8,9% grasa) (0,225% EV)		18,7 (1,66)	0,07			
Pastel (18,1% grasa) (EV 0,339%)		9,5 (1,73)	0,05	S, C, E, B	7-ceto	Cercaci et al. (2006)
Caracola (18,5% grasa) (EV 0,64%)		10,2 (1,89)	0,03			
Pastel "solo grasa vegetal" (39,7% grasa) (EV 0,339%)		7,2 (2,86)	0,08			
Preparados lactantes (0,03-0,11% S)		0,7-4,1	0,52-0,1			
Preparados de continuación (0,06-0,10% S)		0,7-1,4	0,10-0,24	S	7-ceto	Zuinin et al. (1998)
Preparados de continuación con cereales (0,07-0,23% S)		0,9-5,0	0,08-0,46			
Papilla cereales con leche y miel (EV 0,0052%)	25 °C/4 meses 25 °C/9 meses	0,70 0,64 0,60	1,39 1,24 1,15			
Papillas cereales con leche y fruta (EV 0,0051%)	25 °C/4 meses a 25 °C/9 meses	0,64 0,66 0,57	1,25 1,30 1,12	S, C, E	7 α / β -OH, 7-ceto, α / β - epoxi, triol	García-Llatas et al. (2008)

Cuadro n° 6 continuación: Contenidos POPs en $\mu\text{g/g}$ grasa o en ($\mu\text{g/g}$ de muestra) en distintos alimentos y porcentaje de oxidación de los EV^a.

Muestra	Tratamiento	POPs	% Ox./EV	EV	POPs	Referencia
Leche enriquecida 0,3% EV (2,1% grasa)	Sin tratamiento	100,05 (2,1)	0,04			Menéndez- Carreño et al. (2008a)
	65 °C/24h	146,84 (3,08)	0,07		7 α / β -OH, 7-ceto, α / β - epoxi, triol	
	Microondas (900 W/1,5')	225,77 (4,74)	0,11	S, C, E		
	Microondas (900 W/2')	184,25 (3,87)	0,09			
	Calentamiento eléctrico 15'	159,64 (3,35)	0,08			
Patatas	Fritas 200 °C/15' con:					
	Colza/palma	32,0 (2,4)			7 α / β -OH, 7-ceto, α / β -epoxi, triol	Dutta (1997)
	Girasol	36,9 (2,8)		S, C		
Girasol alto oleico	53,7 (4,0)					
Patatas	Fritas en aceite de palma	5,0				Dutta y Appelqvist (1997)
	Almacenadas 10 semanas	6,1				
	Almacenadas 25 semanas	8,6				
Patatas	Fritas en aceite de girasol alto oleico	35,1			7 α / β -OH, 7-ceto, α / β - epoxi, triol	Dutta y Appelqvist (1997)
	Almacenadas 10 semanas	54,8		S, C		
	Almacenadas 25 semanas	58,5				
	Fritas en aceite de girasol	45,8				
Patatas	Almacenadas 10 semanas	49,4				Dutta y Appelqvist (1997)
	Almacenadas 25 semanas	47,1				

Cuadro n° 6 continuación: Contenidos POPs en $\mu\text{g/g}$ grasa o en ($\mu\text{g/g}$ de muestra) en distintos alimentos y porcentaje de oxidación de los EV^a.

Muestra	Tratamiento	POPs	% Ox./EV	EV	POPs	Referencia
Patatas pre-fritas comerciales (2,5-8% grasa) (EV 0,001-0,02%)	Horno 250 °C/20'	2,7-27,8 (0,1-2,1)	0,5-3,5	S, C, E	7 α / β -OH, 7-ceto, α -epoxi, triol	Tabee et al. (2008a)
Patatas (13,6-17,8% grasa) (EV 0,026-0,112%)	Fritas en restaurante	10,0-59,4 (1,5-8,1)	0,22-1,92			
Patatas	Fritas en aceite de oliva 180 °C/10'	6,6				
	3 frituras 180 °C/10'	7,3				
	5 frituras 180 °C/10'	9,6		S, Stn, C, E	7 α / β -OH, 6-OH, α -epoxi, 7-ceto, triol	Tabee et al. (2009)
Patatas	Fritas en aceite de palma oleina 180 °C/10'	3				
	3 frituras 180 °C/10'	3,8				
	5 frituras 180 °C/10'	5,3				
Chocolate negro (0,03% EV)	Sin almacenamiento	(14)	4,66			
	5 meses 30 °C	(17,6)	5,89			
Chocolate enriquecido (7,3% EV)	Sin almacenamiento	(68,67)	0,09			
	5 meses 30 °C	(71)	0,10	S, C, E	7 α / β -OH 6 β -OH 7-ceto, 6-ceto, α -epoxi, triol	Botelho et al. (2014)
Chocolate enriquecido (7,3% EV) + Antioxidantes	Sin almacenamiento	(71)	0,10			
	5 meses 30 °C	(82,67)	0,11			

Cuadro n° 6 continuación: Contenidos POPs en $\mu\text{g/g}$ grasa o en $(\mu\text{g/g}$ de muestra) en distintos alimentos y porcentaje de oxidación de los EV^a.

Muestra	Tratamiento	POPs	% Ox./EV	EV	POPs	Referencia
Patatas pre-fritas congeladas (4,2% grasa) (EV 0,02%)	Calentadas en horno 225 °C/15'	68,8 (2,88)	1,37			
Patatas pre-fritas (4,5-4,8% grasa)+E450 (0,02% EV)	Calentadas en horno 225 °C/15'	9,0-21,1 (0,41-1,01)	0,19-0,46	S, C	7 α / β -OH 7-ceto	
Fideos sin huevo (0,3-1,5% grasa) (0,01-0,03% EV)	Hervido en agua 5-8'	1,8-0,4 (0,01-0,27)	0,03-0,04			
Fideos con huevo (0,3-1,5% grasa) (0,01-0,03% EV)	Hervido en agua 5-8'	3,9 (0,059)	0,03			Derewiaka y Obiedziński (2012)
Carne picada cerdo (21,7% grasa)	Frito en aceite de colza	0,2				
Carne picada ternera (23%grasa)	Frito en aceite de colza	1,7		S, C	7-ceto	
Filete pescado (0,6-1,7% grasa)	Frito en aceite de colza	32,3-38,7				
Barritas de pescado (6,6% grasa)	Frito en aceite de colza	3,2				
Hamburguesa de pescado (5,7% grasa)	Frito en aceite de colza	13,9				

^a Los valores se presentan siempre y cuando se den en la publicación a la que hacen referencia o se cuente con la información necesaria para su cálculo. ^b porcentaje en EV. EV: Esteroles vegetales; POPs: óxidos de esteroles vegetales; Ox.: oxidación; C: Campesterol; E: Estigmasterol; S: β -Sitosterol; B: Brassicasterol; Av: Avenasterol; Sm: Sitostanol; Ctn: Campestanol; Btm: Barassicastanol; 7 α / β -hidroxi; 6 α / β -hidroxi; 6 α / β -hidroxi; 25-OH: 25-hidroxi; 24-OH: 24-hidroxi; extr.:extracción; (Ran./ Oph.): oxidación con Rancimat/ Oxidograph; e: impacto electrónico; BHT: butilhidroxitolueno; E450:estabilizante (difosfatos de sodio y de potasio).

2.3. POPs en alimentos. Factores de formación

El contenido y la distribución de POPs en los alimentos depende de numerosos factores: contenido y tipo de EV en el alimento, temperatura y tiempo de calentamiento, así como el contenido en agua de la matriz lipídica, el tipo de procesado y tiempo de almacenamiento (Ryan et al., 2009).

2.3.1. Efecto temperatura (Termo-oxidación)

Los tratamientos térmicos tienen un marcado efecto sobre el porcentaje de auto-oxidación lipídica. Las altas temperaturas producen mayores concentraciones de radicales libres, debido a la aceleración de las reacciones de propagación y su consiguiente descomposición en hidroperóxidos. Estos radicales libres promueven la iniciación y propagación de la auto-oxidación de lípidos (Soupas et al., 2004a). Soupas et al. (2004a) analizan el efecto de la temperatura en la oxidación de estigmasterol y sitostanol en distintas matrices lipídicas, obteniendo un aumento del contenido total de sus óxidos durante el calentamiento a todas las temperaturas y matrices estudiadas.

El grado de oxidación está directamente relacionado con la temperatura aplicada. Kemmo et al. (2005) en un estudio de termo-oxidación de un patrón de estigmasterol a dos temperaturas 100°C y 180°C, indican una oxidación más rápida a 180°C. En muestras alimentarias, también existe una relación directa entre la intensidad/tiempo del tratamiento térmico y la formación de POPs; así, en aceites de girasol y oliva a 150 y 200°C y distintos tiempos, la oxidación siempre es mayor a más temperatura y tiempo de tratamiento en ambas matrices (Zhang et al., 2005). Un estudio similar hacen Soupas et al. (2007) con aceite de colza sometido a 160, 180 y 200 °C durante 10 o 5 min con los mismos resultados. En aceite de colza calentado a 180 °C, la oxidación aumenta con el tiempo de tratamiento (Lampi et al., 2002); lo mismo ocurre en aceites de cacahuete y oliva en el estudio de

Johnsson y Dutta (2006) y en aceite de oliva en D'Evoli et al. (2006). En el caso de leche enriquecida en EV sometida a diferentes tratamientos térmicos (Menéndez-Carreño et al., 2008), el contenido en POPs siempre aumenta con respecto al control que no se ha calentado. Un ejemplo específico de oxidación se da en el tratamiento con microondas donde se indican niveles más altos de oxisteroles durante 1,5 minutos que durante dos minutos, lo que sugiere una degradación térmica de los POPs. Un caso similar ocurre en Johnsson y Dutta (2006) con el aceite de maíz (**cuadro n° 6**).

Generalmente durante el calentamiento de aceites vegetales los mayores contenidos de POPs corresponden a $7\alpha/\beta$ -OH, α/β -epoxi y 7-ceto derivados (Dutta, 1997; Lampi et al., 2002; Zhang et al., 2005; Rudzinska, 2005; Johnsson y Dutta, 2006; Soupas et al., 2007) Los derivados trioles se indican solo en algunos estudios de aceites (Dutta, 1997; Zhang et al., 2005; Johnsson y Dutta, 2006; Tabee et al., 2009) (**cuadro n° 6**). Este hecho es esperable cuando la termo-oxidación se da en matrices lipídicas anhidras, donde los α/β -epoxi son más estables que en condiciones acuosas, ya que en estas se hidratan a compuestos trioles (Lampi et al., 2002).

Kemmo et al. (2005) en estudios modelo de termo-oxidación con patrones de estigmasterol, señalan diferencias en la formación de los hidroperóxidos (productos de oxidación primarios) según la temperatura aplicada. A 180 °C la formación de radicales libres en posición 7 es más favorable que en posición 25. El 7β -OOHestigmasterol es el producto principal seguido de 7α -OOHestigmasterol y 25-OOHestigmasterol. Mientras que a 100 °C, 25-OOH-estigmasterol es el producto principal seguido de 7β -OOHestigmasterol y $7\alpha\beta$ -OOHestigmasterol. Para los POPs también describen diferencias según la temperatura aplicada. A 100 °C el producto de oxidación mayoritario es 7-cetoestigmasterol, seguido de 7β -OHestigmasterol, 7α -OHestigmasterol y β -epoxiestigmasterol. A 180 °C el

producto de oxidación mayoritario, inicialmente, es 7-cetoestigmasterol y, pasado un tiempo, pasa el 7 β -OHestigmasterol a ser el mayoritario seguido de 7 α -OHestigmasterol. Resultados similares señalan Kemmo et al. (2007) para 180 °C, aunque con mayor presencia de epóxidos; el producto de oxidación mayoritario, inicialmente, es el 7-cetoestigmasterol y pasado un tiempo β -epoxiestigmasterol pasa a ser el mayoritario seguido de 7 β -OHestigmasterol, α -epoxiestigmasterol y 7 α -OHestigmasterol (Kemmo et al., 2007). Posteriormente estos mismos autores (Kemmo et al., 2008) analizan la termo-oxidación de β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y brassicasterol a 180 °C. Todos los óxidos aumentan, salvo β -epoxi, 7 α -OH y 7 β -OH que, a partir de un tiempo, empiezan a disminuir. Al final del estudio los productos de oxidación mayoritarios son: 7-ceto, seguido de 7 β -OH, α -epoxi y β -epoxi.

Barriuso et al. (2012) han estudiado la formación y degradación de POPs a partir de β -sitosterol, campesterol y estigmasterol por calentamiento a 180 °C de 5-360 min. El contenido máximo de POPs se obtiene entre 5-10 min de calentamiento y a partir de este tiempo empiezan a disminuir. El POP mayoritario es el 7-ceto durante todo el proceso. Le siguen 7 α -OH y 7 β -OH (inicialmente 7 α -OH es mayoritario y posteriormente pasa a serlo 7 β -OH). Los α/β -epoxi al inicio están en concentraciones inferiores a los 7 α/β -OH pero al final del estudio sus concentraciones son superiores (se destruyen más lentamente). Los trioles son los que se forman en menor cantidad.

2.3.2. Estructura de los esteroides vegetales

Existen diferencias en cuanto a la estabilidad de los EV en su forma saturada o insaturada. Soupas et al. (2004a) en sistemas modelo, estudian la termo-oxidación de estigmasterol y sitostanol adicionados a distintas matrices lipídicas, indicando que la estructura saturada de los fitoesteroides

(sitostanol) es menos reactiva y por tanto más estable a la oxidación. Resultados similares señalan Soupas et al. (2005) entre sitostanol y el resto de fitoesteroles a estudio (β -sitosterol y campesterol). También en estudios modelo con alimentos, como leche desnatada adicionada de fitoesteroles/fitoestanoles, calentada 2 s a 127 °C, se obtiene un 0,01% de oxidación de fitoestanoles (β -sitostanol), frente a 0,08-0,09% de fitoesteroles (β -sitosterol) (Soupas et al., 2006). Este comportamiento también se observa en patatas fritas en sartén (Soupas et al., 2007) donde la oxidación del sitostanol es del 0,1%, frente a la del β -sitosterol oxidado 5,1%.

2.3.3. Esterificación

El efecto de la esterificación en la oxidación de β -sitosterol/campesterol ha sido estudiado por Soupas et al. (2005). A bajas temperaturas (≤ 100 °C) y tiempos superiores a 24 h, los EV libres se oxidan en menor proporción que los EV esterificados. A temperaturas de 180 °C la oxidación es muy similar, pero los EV libres se oxidan ligeramente menos que los EV esterificados. En un estudio con leche desnatada adicionada de fitoesteroles libres, o esterificados, llevado a cabo por Soupas et al. (2006), el calentamiento corto (127 °C, 2 s) las diferencias son mínimas, pero la forma libre es más estable que la esterificada.

Por lo general, las formas libres resultarían más estables que las esterificadas, aunque a temperaturas > 100 °C esta diferencia es mínima.

2.3.4. Matriz

La matriz en la que están EV actúa como protección frente a la oxidación de los mismos; así Xu et al. (2009) demostraron que la oxidación de β -sitosterol se da en mucha mayor medida cuando se calientan

soluciones patrón, que si estos se hallan en una matriz lipídica, tanto saturada como insaturada.

❖ Grado de saturación de la matriz

El grado de saturación de la matriz afecta a la oxidación de los fitoesteroles, y este efecto es dependiente de la temperatura (Soupas et al., 2004a): A elevadas temperaturas ($> 140\text{ }^{\circ}\text{C}$) los fitoesteroles son más estables en la matriz insaturada (aceite de colza) que en la saturada (tripalmitina) debido a que los AG insaturados se oxidan más fácilmente que los fitoesteroles protegiendo su oxidación. La matriz saturada por el contrario promovería la oxidación de los fitoesteroles. A temperaturas más bajas ($< 140\text{ }^{\circ}\text{C}$), por el contrario, los fitoesteroles son más estables en matrices saturadas debido a que en la matriz insaturada los fitoesteroles reaccionarían más rápido que la matriz, haciendo que se oxiden más fácilmente (razón no del todo dilucidada). En el caso de fitoestanoles, son más estables en matrices saturadas, independientemente de la temperatura. Coincidiendo con estos datos, en un estudio posterior del mismo grupo, en fritura a temperatura de $160\text{-}180\text{ }^{\circ}\text{C}$ la oxidación es mayor en la matriz más saturada (mantequilla) que en la insaturada (aceite de colza) (Soupas et al., 2007).

❖ Presencia de agua en la matriz

La presencia de agua en una matriz lipídica promueve la oxidación de los EV. En el proceso de fritura, el agua promueve hidrólisis de la grasa dando lugar a la liberación de ácidos grasos que facilitan la oxidación (Soupas et al., 2007). Lo mismo ocurre en el almacenamiento, donde la presencia de agua (emulsión) genera mayor oxidación, dado que los EV tienen un alto grado de actividad en superficie, lo que les permite migrar a la

interfase aceite-agua de las gotitas de la emulsión, teniendo así un elevado estrés oxidativo (Cercaci et al., 2007).

❖ Presencia de antioxidantes

La presencia de antioxidantes en la matriz lipídica protege de la oxidación a los EV, este hecho ha sido demostrado por diversos autores. La presencia de extractos de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*, L.) al 10% en aceite de oliva reduce la oxidación del β -sitosterol cuando es calentado a 180 °C (ver **cuadro n° 6**) (D'Evoli et al., 2006). La presencia de antioxidantes en aceite de colza reduce su oxidación a 180 °C durante 4 h; en este estudio se analizan tres antioxidantes diferentes siendo su eficiencia: extracto de té verde (al 0,1%) > extracto de romero (al 0,02%) > BHT (al 0,02%) (Kmiecik et al., 2009) (ver **cuadro n° 6**). Lo mismo ocurre en el tratamiento de patrón de β -sitosterol a 180 °C con antioxidantes, en este caso también los antioxidantes naturales a concentración de 200 ppm (α -tocoferol, quercetina y catequinas del té verde) resultan más eficientes que el BHT (Xu et al., 2009). Kmiecik et al. (2011) en disoluciones patrón de β -sitosterol y campesterol sometidos a oxidación mediante Oxidograph a 180 °C durante 4 h en presencia de distintos antioxidantes naturales y sintéticos a concentraciones del 0,02%, salvo el té verde al 0,1%. Inducen una reducción de la formación de POPs tanto de β -sitosterol como de campesterol en comparación con el control sin antioxidante. La efectividad de los distintos antioxidantes son: tocoferoles sintéticos > extracto de té verde > tocoferoles naturales de aceite de colza > extracto de romero > compuestos fenólicos de aceite de colza > ácido sinápico > BHT.

2.3.5. Procesado y almacenamiento

❖ Refinado de aceites

Como se ha indicado anteriormente (apartado 1.2), en el caso de aceites vegetales, el proceso de refinado supone una merma en contenidos de EV. La formación de POPs en el proceso de refinado de aceites, está directamente relacionada con la termo-oxidación. En la etapa de desodorización del proceso de refinado (convencional o físico) se emplean elevadas temperaturas (180-220 °C y 240-250 °C, respectivamente) (OMS y FAO, 1995), Lambelet et al. (2003) estudian el efecto sobre los POPs del proceso de desodorización a distintas temperaturas en aceite de colza (bajo en ácido erúico) señalando mayor contenido de POPs a mayor temperatura aplicada (**cuadro nº 6**). A su vez, la separación de la fracción de esteroides del destilado obtenido, implica también un tratamiento a altas temperaturas (entre 150-240 °C) (Sumner et al., 1995). Rudzinska et al. (2005) estudian la formación de POPs en el refinado en aceites obteniendo un aumento del porcentaje de oxidación de 0,09% a 1,09-1,2% ó 0,39% tras el refinado en colza y maíz, respectivamente (**cuadro nº 6**). Estos autores concluyen que el contenido en POPs aumenta durante la producción industrial, incrementando en un 130% el contenido en POPs del aceite refinado vs el no refinado.

❖ Almacenamiento del alimento ya procesado

Se ha estudiado el efecto del almacenamiento en el contenido de POPs de distintos alimentos. Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1992) estudian el efecto de almacenamiento entre 2 y 36 meses en harina de trigo, aumentando el contenido de 35,2 a 329 µg de oxisteroides/g grasa. En un estudio de almacenamiento durante 25 semanas a temperatura ambiente de patatas fritas en diferentes aceites vegetales, preparadas en condiciones industriales y envasadas al vacío (Dutta y Appelqvist, 1997), hallan un incremento del

contenido de POPs en todas ellas: fritura en aceite de palma, de 5,0 a 8,6 μg POPs/g grasa; fritura en aceite de girasol, de 45,8 a 47,1 μg POPs/g grasa y fritura en aceite de girasol alto oleico de 35,1 a 58,5 μg POPs/g grasa. Los autores concluyen que no hay un aumento considerable de POPs tras las condiciones aplicadas salvo en las patatas fritas en aceite de girasol alto oleico. Probablemente debido a que las patatas están envasadas al vacío.

Botelho et al. (2014) estudian los POPs en chocolate negro no enriquecidos en EV, chocolate enriquecido y chocolate enriquecido con adición de antioxidantes α -tocoferol y ácido ascórbico (ambos al 0,0009%). Tras el almacenamiento a 30 °C durante 5 meses, en los tres casos se da un aumento bajo del contenido en POPs. El incremento del porcentaje de oxidación de EV es mayor en el chocolate no enriquecido (aumenta un 1,22%) frente a los enriquecidos que es de 0,01%. Rudzinska et al. (2014) estudian el almacenamiento durante 6 semanas de margarina enriquecida en EV, obteniendo un aumento de POPs dependiente de la temperatura del almacenamiento. El porcentaje de oxidación inicial es de 0,32% y pasa a 0,45% a 4 °C y 0,93% si se almacena a 20 °C.

En el estudio de almacenamiento de papillas destinadas a la alimentación infantil listas para el consumo, llevado a cabo por García-Llatas et al. (2008) almacenadas en tetra brick durante 9 meses a 25 °C no se incrementa el contenido de POPs, los autores concluyen que la principal fuente de POPs proviene del procesado más que del almacenamiento.

❖ Efecto de la radiación

La radiación también es responsable de la oxidación de los EV. Este hecho ha sido estudiado por Zhang et al. (2006) en distintos aceites vegetales sometidos a diversas radiaciones (**cuadro nº 6**). Los autores concluyen que la fotooxidación depende de la intensidad y/o tipo de radiación aplicada, así como del tiempo de exposición. En aceites de girasol y colza sometidos a

radiación solar durante 30 días el porcentaje de oxidación de β -sitosterol es de 39% y 62%, respectivamente, y cuando son sometidos a radiación UV durante 63 h es de 14% y 28% respectivamente. Los aceites expuestos a impacto electrónico presentan una oxidación muy baja. Por otra parte, al igual que en los tratamientos térmicos drásticos, tratamientos intensos con radiación solar en aceites de soja y colza disminuyen los contenidos de POPs, por degradación de los mismos mediante una descomposición adicional al igual que en la ya observada para los hidroperóxidos de ácido graso.

En este contexto, en esta tesis doctoral, se ha evaluado la evolución del contenido de EV en bebidas a base de leche, zumo de frutas y zumo de frutas con leche, enriquecidas con EV libres procedentes de “tall oil” durante su periodo de vida útil, 6 meses, a temperaturas de almacenamiento 4, 24 y 37 °C. Paralelamente se han estudiado el contenido en carotenoides y polifenoles, capacidad antioxidante total y color de las bebidas durante dicho almacenamiento. Los resultados obtenidos han dado lugar a la publicación: *González-Larena, M., Cilla, A., García-Llatas, G., Barberá, R., & Lagarda, M.J. (2012). Plant sterols and antioxidant parameters in enriched beverages: storage stability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 4725-4734.* De la misma manera se ha evaluado los contenidos en POPs y los resultados obtenidos han dado lugar a la publicación: *González-Larena, M., García-Llatas, G., Clemente, G., Barberá, R., Lagarda, M. J. Plant sterol oxides in functional beverages: influence of matrix and storage (en revisión en Food Chemistry).*

No tenemos conocimiento de estudios anteriores donde se haya evaluado la estabilidad de los EV, ni la formación de POPs, en bebidas a base de leche, zumo de frutas y zumo de frutas con leche. Este estudio ha

puesto de manifiesto que el contenido de EV se mantiene estable a lo largo de su periodo de vida útil asegurando, por lo tanto, su funcionalidad.

A pesar de no haber sido detectada variación en el contenido de EV, al proceder a la identificación y cuantificación de POPs se observa un aumento de los mismos. Este hecho se considera de interés al haberse atribuido a los POPs posibles efectos adversos.

Los resultados obtenidos en las dos últimas publicaciones, han permitido seleccionar como matriz más idónea para la adición de EV las bebidas que contienen zumo y leche.

2.4. POPs en el organismo

El primer estudio donde se indican POPs en el organismo humano es en un paciente con macroglobulinemia de Waldenstroms (Brooks et al., 1983). Posteriormente, Plat et al. (2001) detectan altas concentraciones (40,3-47,3 mg/dl) de POPs en suero de pacientes sitosterolémicos. Grandgirard et al. (2004b); Menéndez-Carreño et al. (2008b) y Baumgartner et al. (2013) identifican POPs en plasma de voluntarios sanos. El origen de estos compuestos, presentes en plasma, puede deberse a: a) la absorción de una pequeña cantidad de POPs de los alimentos, b) transformación *in vivo* a partir de sus formas no oxidadas y c) según sugieren Tonello et al. (2006) podría deberse a la oxidación catalizada por radiaciones UV de EV, absorbidos vía cutánea de productos cosméticos (Ryan et al., 2009).

2.4.1. Absorción

En la actualidad, no existe una evidencia clara que asegure que un aumento de la ingesta de POPs genere un aumento en sus concentraciones en tejido o en circulación plasmática en el organismo humano. No obstante los resultados de estudios en animales sugieren que, de manera similar a los EV

no oxidados, hay un aumento en la concentración de POPs en plasma después de un aumento en la ingesta dietética (Hovenkamp et al., 2008).

Grandgirard et al. (1999) evalúan la absorción linfática de óxidos de β -sitosterol y campesterol administrado intragástricamente en ratas, obteniendo pequeñas cantidades de POPs recuperados en linfa. Ya que los óxidos de campesterol son mejor absorbidos que los de β -sitosterol, los autores concluyen que la longitud de la cadena de la molécula de esterol puede influir en su absorción. En general, los POPs se consideran poco biodisponibles, siendo absorbidos en muy baja proporción, similar a lo establecido para EV (2-5%) (Lütjohann et al, 1995; Grandgirard et al, 1999). Este último grupo desarrolla otro estudio, esta vez mediante alimentación oral de hámsteres con aceite de soja enriquecido con una mezcla de POPs a distintas concentraciones (Grandgirard et al., 2004c), observando que, a mayor cantidad de POPs suministrados, mayor es su concentración en plasma, aorta, hígado, riñones y corazón. Los óxidos descritos son $7\alpha/\beta$ -OH (mayoritario), β -epoxi, trioles y 7-ceto. Como en el estudio anterior, señalan mayor cantidad de óxidos de campesterol que de β -sitosterol. En los hámsteres alimentados a menor concentración y los utilizados como control, solo se detectan trioles, debido a que serían los que más rápido se absorben y menos eficiente es su eliminación. Tomoyori et al. (2004) observan resultados similares al evaluar la absorción linfática de óxidos de campesterol y β -sitosterol en ratas, obteniendo mayor cantidad de óxidos de campesterol que de β -sitosterol, siendo mayoritarios los $7\alpha/\beta$ -OH. Por otra parte, hallan mayores recuperaciones en linfa de las formas oxidadas que de los EV no oxidados.

Hay que tener en cuenta que, mientras que el análisis a nivel linfático mesentérico puede dar una buena estimación de la absorción de POPs, los resultados de las concentraciones de POPs tisulares, en plasma o suero,

deben interpretarse con más cautela, ya que están afectados tanto por la absorción como por la excreción interna de POPs (Hovenkamp et al., 2008).

Un estudio reciente (Alemany et al., 2013a) evalúa la bioaccesibilidad de COPs y POPs (concentración máxima soluble en medio gastrointestinal simulado) en bebidas enriquecidas con EV. Estos autores evidencian una menor bioaccesibilidad de COPs en relación con la del colesterol (2,2 - 17% vs 53 - 99%), mientras que los valores de bioaccesibilidad para los POP son superiores a los de sus correspondientes EV (19,1 - 49,3% vs 2,2 - 6,5%).

2.4.2. Formación *in vivo*

Cabe esperar que los POPs se puedan formar también *in vivo* (como ocurre con los COPs), tanto por auto-oxidación de los EV, como por procesos enzimáticos donde intervienen enzimas del citocromo P450. La auto-oxidación endógena puede ser iniciada por ROS, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Ryan et al., 2009). El primer estudio de formación *in vivo* fue llevado a cabo por Aringer y Eneroth (1973) quienes hallan derivados oxidados de β -sitosterol (principalmente $7\alpha/\beta$ -OH, α/β -epoxi y triol) en hígado de rata. Grandgirard et al. (2004d) estudian la transformación *in vivo* de EV a sus óxidos con ratas alimentadas con elevadas concentraciones de EV obteniendo pequeñas concentraciones de distintos POPs en plasma, salvo de trioles, que en este caso, parece que no se produzcan *in vivo*.

En cuanto a la formación enzimática de POPs, Aringer y Eneroth (1973) determinan que la enzima colesterol 7α -hidroxilasa no está implicada en la conversión de β -sitosterol en su derivado 7α -OH en hígado de rata. Mientras que en un estudio posterior Aringer et al. (1975) demuestran que se produce la hidroxilación de la cadena lateral de β -sitosterol y campesterol en

las mitocondrias del hígado de rata a 26 y 29-hidroxisitosterol y 26-hidroxicampesterol.

2.5. Efectos biológicos

La presencia de COPs está relacionada con la iniciación y progresión de enfermedades crónicas tales como, arterosclerosis, procesos neurodegenerativos, diabetes o fallo renal (Guardiola et al., 1996; Diczfalusy 2004; Sottero et al., 2009; Otaegui-Arazola, et al., 2010; Alemany et al., 2014). Se ha señalado presencia de COPs en las placas de ateroma humanos, el suero y el líquido cefalorraquídeo, así como en varios órganos (cerebro, el corazón y el hígado) (Diczfalusy, 2004). La implicación de los POPs en la aterosclerosis, procesos neurodegenerativos y otras enfermedades crónicas no está clara. Sin embargo, los POPs se han relacionado con efectos citotóxicos y pro-apoptóticos. En la bibliografía, al respecto, se han publicado diversas revisiones (Hovenkamp et al., 2008; Ryan et al., 2009; Otaegui-Arazola et al., 2010; García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011; Vanmierlo et al., 2013; O'Callaghan et al., 2014; Alemany et al., 2014).

2.5.1. Citotóxico

La citotoxicidad de los POPs es similar a la descrita para los COPs pero con menor severidad, es decir, son necesarias mayores concentraciones de POPs para generar apoptosis celular. Meyer et al. (1998) comparan citotoxicidad de COPs y POPs (α/β -epoxi y triol derivado de β -sitosterol y estigmasterol) obteniendo un efecto similar pero del orden de 5 veces menos tóxico en el caso de los POPs. Adcox et al. (2001) exponen células de macrófago (C57BL/6) a COPs y POPs (de β -sitosterol y campesterol) a elevadas concentraciones (200 $\mu\text{g/ml}$) obteniendo efectos similares de toxicidad (disminución del crecimiento celular). Sin embargo estos efectos

son menos severos en los POPs. Del mismo modo, Maguire et al. (2003) en células monocíticas humanas (U937) estudian la citotoxicidad de 7-hidroxicolesterol (30 μM) y una mezcla de POPs de β -sitosterol a concentración de 120 μM , obteniendo efectos similares en ambos, reducción de la viabilidad celular y glutatión e inducción a la apoptosis, pero siendo los efectos de los COPs más severos ya que se requieren menores dosis de COPs para observar un efecto equivalente al causado por los POPs. Ryan et al. (2005) en un estudio similar pero comparando cada POP con su COP homólogo y utilizando 3 líneas celulares diferentes, señalan apoptosis en células U937 y necrosis en Caco-2 y HepG2 (línea de hepatoma) a concentraciones entre 60-120 μM , siendo los 7 β -OH y 7-ceto los más citotóxicos en las tres líneas celulares. En todas las líneas celulares, se ha corroborado que se requiere una mayor concentración de 7 β -OH, triol, α/β -epoxi y 7-cetositosterol para disminuir la viabilidad celular en un grado similar a los correspondientes COPs.

Roussi et al. (2005) observan un efecto antiproliferativo/apoptótico de los óxidos 7 β -hidroxicolesterol y 7 β -hidroxisitosterol, en células de Caco-2 siendo más sensibles a los COPs. Sin embargo, los dos compuestos siguen diferentes vías de apoptosis celular, en el caso del 7 β -hidroxisitosterol, se induce una ruta caspasa-dependiente, mientras que en el caso del 7 β -hidroxicolesterol el proceso podría implicar también factores independientes a las caspasas. Posteriormente, en el mismo grupo de investigación se comparan los efectos de los mismos COPs y POPs del estudio anterior, sobre la integridad lisosomal y el potencial de membrana mitocondrial. Indican diferencias en cuanto a la dependencia de las caspasa y en ambos casos, se produce una pérdida del potencial de membrana mitocondrial y se modifica la integridad de la membrana lisosomal (Roussi et al., 2007).

Koschutnig et al. (2009) estudian la viabilidad celular, producción de ROS y ruptura de DNA, de diversos óxidos de β -sitosterol en células HepG2. En todos los casos, la viabilidad celular se reduce significativamente de acuerdo a la concentración de POP aplicada (30, 60 y 120 μ M), y todos los POPs estudiados aumentan la producción de ROS. El 7-ceto y 7 α -hidroxisitosterol son internalizados en las células en mayor cantidad que 7 β -hidroxisitosterol, siendo los dos primeros los POPs más severos. Los autores concluyen que el efecto citotóxico de los POPs se debe más a su internalización celular, que al estrés oxidativo generado.

Por otra parte O'Callaghan et al. (2010) observan una inducción a la apoptosis del 7 β -OH y epoxidiol, mediante un mecanismo caspasa-dependiente, a concentraciones relativamente bajas (30 μ M) en células U937. Posteriormente este mismo grupo evalúan el efecto citotóxico de óxidos de campesterol y brassicasterol (α -epoxi, β -epoxi, 7-ceto, 7 β -OH o triol) (30-120 μ M) en cultivos celulares U937 y HepG2, indicando que los monocitos son más sensibles a los óxidos de campesterol que de brassicasterol, siendo el triol, el 7 β -OH y el 7-ceto los que tienen un efecto más marcado sobre la viabilidad celular y solamente inducen apoptosis 7 β -OH y 7-cetocampesterol. En cambio, en las células HepG2 la diferencia entre la citotoxicidad de los POPs procedentes de campesterol o brassicasterol es menos marcada (O'Callaghan et al., 2012). Vejux et al. (2012) en U937, determinan que 7-cetositosterol (20 μ g/ml) no induce muerte celular mientras que 7 β -hidroxisitosterol sí lo hace levemente a la misma concentración. Y Alemany et al. (2012) señalan que el 7-cetoestigmasterol (120 μ M) no induce efecto citotóxico en células Caco-2, y además inhibe la citotoxicidad de 7-cetocolesterol cuando ambos están presentes. Este hecho ha sido también indicado por Koschutnig et al. (2009) y Ryan et al. (2005) en diversas líneas celulares.

2.5.2. Aterogénico

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico en la pared de las arterias que ocurre en respuesta a una agresión sobre el endotelio, está principalmente causado por la hipercolesterolemia y la inflamación. Cuando las concentraciones de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son altas, el LDL-col se deposita dentro de las placas de ateroma (capa íntima arterial). Las células de la pared arterial interpretan este depósito como una invasión y provocan que el sistema inmune desate el proceso inflamatorio.

La relación entre desarrollo de arterioesclerosis y SOPs se ha descrito en el caso de COPs pero, no se ha indicado hasta la fecha, que los POPs promuevan este efecto *in vivo*. Tomoyori et al. (2004) en ratones deficientes de apoenzima E alimentados durante 9 semanas con una dieta enriquecida con POPs (0,2 g/kg), señalan que el tamaño de las lesiones ateroscleróticas no aumenta (estos ratones desarrollan hipercolesterolemia y lesiones arterioscleróticas a temprana edad, siempre, y actúan como modelo para la hipercolesterolemia severa humana). Plat et al. (2014) tras un consumo durante 35 semanas de una dieta enriquecida en POPs no hallan un incremento en el tamaño de la lesión, pero la proporción de lesiones ateroscleróticas severas se incrementa en ratones LDLR +/- (ratones deficientes de receptores de LDL-col, actuando estos como modelo para la hipercolesterolemia leve humana). Por otra parte Yang et al. (2013) con mezcla de POPs de β -sitosterol obtienen atenuación de la vasorrelajación en aorta de rata aislada, siendo un marcador de la salud del endotelio vascular e indicando que los POPs pueden perjudicar la funcionalidad de la aorta. Estos hechos sugieren la posible aterogenicidad de los POPs (O'Callaghan et al., 2014).

2.5.3. Pro-inflamatorio

La inflamación se asocia con varias enfermedades crónicas, tales como obesidad, aterosclerosis, dislipemia y Alzheimer. Los óxidos de esteroides muestran una mayor reactividad bioquímica que los esteroides no oxidados, y son capaces de atravesar fácilmente las membranas lipofílicas, contribuyendo a la patogénesis de enfermedades crónicas. Se ha demostrado que los COPs están relacionados con la modulación de la expresión y/o producción de diversos biomarcadores inflamatorios, tales como moléculas de adhesión (incluyendo molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular-1 ((VCAM-1) y E-selectina) factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas (TNF α , IL-1b e IL-6; quimiocinas, tales como IL-8 interleuquina-8), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y la proteína inflamatoria de monocitos (MIP)-1b) (Otaegui-Arrazola et al., 2010; Alemany et al., 2014).

Vejux et al. (2012) evalúan el efecto pro-inflamatorio de 7 β -hidroxisitosterol y 7-cetositosterol en células monocíticas U937, al hallar únicamente una activación no significativa de mediadores pro-inflamatorios MCP-1 y IL-8, indican una ausencia de efecto pro-inflamatorio.

Por otra parte, Alemany et al. (2013b), señalan un aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF α y IL-8, y anti inflamatorias como IL-10 tras la incubación de células Caco-2 con 7-cetoestigmansterol, siendo este efecto pro-inflamatorio mayor del producido por 7-cetocolesterol. Sin embargo, se necesitan más estudios en este sentido para elucidar los mecanismos por los cuales los POPs pueden influir en estos biomarcadores y sus efectos potenciales a largo plazo (Alemany et al., 2014).

2.5.4. Mutagénico

Al contrario de lo que ocurre con los COPs, no se dispone de resultados concluyentes sobre genotoxicidad por parte de los POPs. En estudios *in vivo* con ratones (Abramsson-Zetterberg et al., 2007) la administración de trioles o epóxidos, de campesterol o β -sitosterol no presenta potencial genotóxico sobre los ratones. Por otra parte en estudios *in vitro* con exposición a disoluciones de POPs, tampoco se generan aberraciones cromosómicas en fibroblastos (V79-4) (Maguire et al., 2003) ni mutaciones bacterianas en diversas cepas de *Salmonella Typhimurium* (Lea et al., 2004; Koschutnig et al., 2010).

2.5.5. Endocrino-reproductivo

Debido a su similitud estructural, los POPs pueden interferir en la acción de las hormonas esteroideas.

Se ha observado, en estudios *in vitro*, que determinados POPs (β -epoxisitosterol, campestanotriol y sitostanotriol) actúan sobre un receptor de la activación de estrógeno en células de cáncer de útero (HeLa) (Sato et al., 2004). En otro estudio similar, se demuestra que óxidos de estigmasterol modulan la acción del 17β -estradiol (hormona sexual femenina) en células de adenocarcinoma de endometrio humano (Ishikawa) y de mama (MCG-7) (Newill et al., 2007). En otro estudio *in vitro* con óxidos de β -sitosterol y estigmasterol se observa un efecto androgénico pero no estrogénico, mientras que los mismos óxidos ensayados *in vivo* sobre pez mosquito no generan masculinización de las hembras, es decir, no confirman dicha modulación (Van den Heuvel et al., 2006).

Por otra parte, en estudios *in vivo*, en ratones, se aprecia un efecto abortivo de elevadas concentraciones de POPs (30 mg/kg peso) (Pakrashi y

Basak, 1976). Posteriormente, el mismo grupo, señala pérdida de fertilidad en ratones debido a la exposición de estos a POPs (Pakrashi y Chakrabarty, 1979). La exposición a óxidos de β -sitosterol en pez cebra, ha demostrado un efecto androgénico, provocado por un aumento de esteroides sexuales que suponen una aceleración de la espermatogénesis y el aumento de la atresia folicular (Christiansion-Heika et al., 2007).

En general se observa una ausencia de actividad agonista de los POPs sobre los receptores estrógenicos y andrógenicos. Sin embargo, hay POPs específicos que poseen afinidad estructural con el dominio de unión al receptor de estrógeno, describiéndose una cierta inhibición por competencia en la unión con este receptor (Vanmierlo et al., 2013).

2.5.6. Posibles efectos beneficiosos

Efecto hipocolesterolemiante: Plat et al. (2005) sugieren que determinados POPs, pueden estar implicados en la modulación del metabolismo del colesterol, mediante la activación del LXR y el aumento de la expresión de los transportadores ABC. Liang et al. (2011) en hámsteres alimentados con una dieta rica en colesterol, detectan una disminución de la expresión de genes para la síntesis de LDLR (responsable de la extracción del LDL-col de la sangre) y HMG-CoA reductasa (enzima encargada de la síntesis de colesterol, aunque esto no supone ningún efecto en el colesterol plasmático. Por otra parte, Alemany et al. (2013b) indican un aumento en la expresión de HMG-CoA reductasa al exponer 7-cetoestigmasterol a células Caco-2, estos autores determinan que el mecanismo por el cual 7-cetoestigmasterol interactúa con el metabolismo del colesterol parece estar relacionado con la concentración de Ca intracelular.

Efecto anti-inflamatorio: Kimura et al. (1995) sugieren que distintos óxidos de β -sitosterol inhiben la inflamación (inducida previamente) en ratones, sin embargo, estos efectos positivos sólo se han descrito en algunos derivados (7-OH y 7-ceto).

Se ha atribuido a la campesterona (óxido del campesterol) efectos sobre la pérdida de peso, de grasa, reducción de TG y glucosa en sangre, lo que podría ser de interés en el tratamiento de enfermedades coronarias, diabetes, etc., aunque esta hipótesis requiere de más estudios (Ikeda et al., 2006).

3. DETERMINACIÓN DE EV Y POPS EN INGREDIENTES Y ALIMENTOS ENRIQUECIDOS

Los EV se pueden existir en los alimentos de distintos modos, como EV libres, esterificados, glucosilados y/o acetilados glucosilados. De este modo, es de gran importancia que la preparación de la muestra permita determinar la totalidad de los EV, incluidas todas sus formas conjugadas (Lagarda et al., 2006).

Existen algunos métodos oficiales para determinar EV presentes en grasas y aceites: IUPAC 2.401 (determinación de la fracción insaponificable) y 2.403 (identificación y determinación de esteroides mediante cromatografía gas-líquida); ISO 6799 (determinación de la composición de esteroides en grasas y aceites por cromatografía gas-líquida) y 12228 (determinación de esteroides en grasa animal y vegetal por cromatografía de gases (GC)); Codex-Stan 210 (Norma del Codex Alimentarius para aceites vegetales específicos, hace referencia a ISO 6799 y IUPAC 2403). Solo existe un método oficial que hace referencia a la determinación de EV en ingredientes y suplementos dietéticos: método oficial AOCS 2007.03 (Determinación de campesterol, estigmasterol y β -sitosterol en la palma enana americana, materias primas y los suplementos dietéticos por GC). Aunque existen métodos para la determinación de EV por cromatografía líquida (LC) ninguno de ellos es oficial (Clement et al., 2010).

En el caso de los POPs, no existen métodos oficiales para su determinación, esta presenta una serie de inconvenientes que cabe remarcar: los POPs pueden hallarse en matrices complejas, dentro del insaponificable de la fracción grasa y, además, están en muy bajas concentraciones (ppm o ppb) (Dutta et al., 2006). Ello hace que sea muy importante la extracción del analito para evitar interferentes. Además, conviene destacar que son compuestos que durante el proceso analítico de la muestra pueden tanto

formarse como destruirse, por lo que en la medida de lo posible, se debe evitar la formación de artefactos y se deben aplicar condiciones suaves durante el análisis (Guardiola et al., 2004). En la bibliografía existen diversas revisiones y libros que tratan este tema (Dutta, 2002; Guardiola et al., 2004; Dutta, 2004; García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011)

Las etapas más comunes para la determinación de EV y POPs por GC se presentan en la **figura n° 8**.

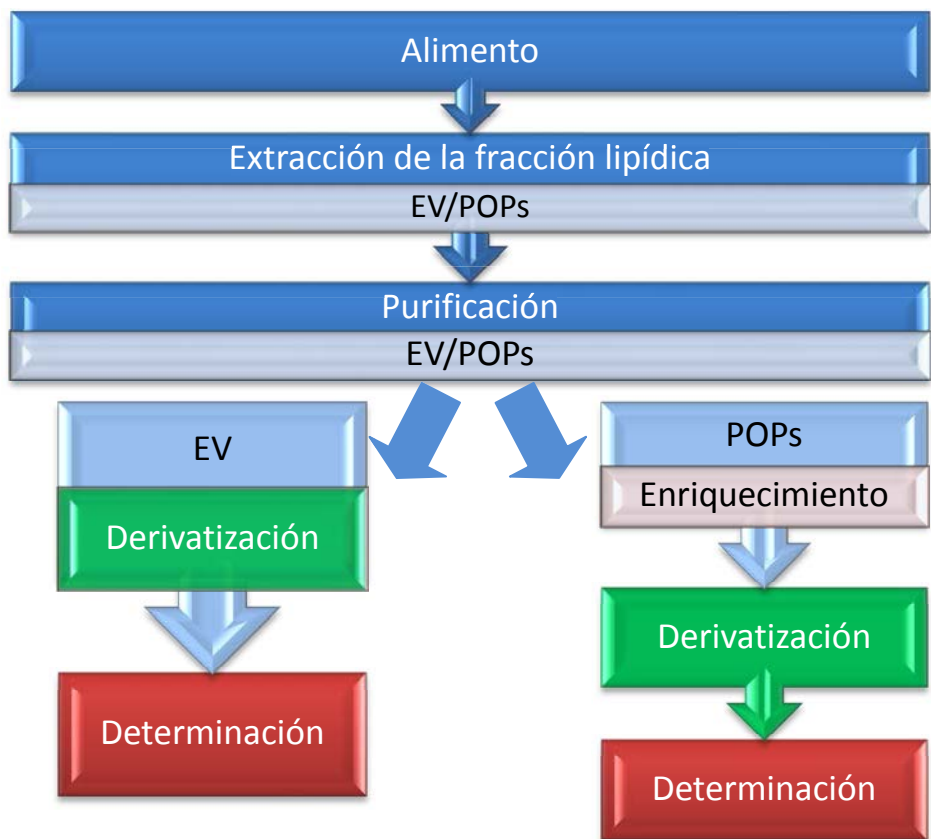


Figura n° 8: Etapas de determinación de EV y POPs por cromatografía de gases.

3.1. Extracción lipídica

El proceso de extracción lipídica es necesario para todas aquellas muestras que no se encuentren en forma de aceites vegetales o ingredientes de EV. Los POPs y EV libres y esterificados, son compuestos lipídicos que han de ser co-extraídos con otros compuestos de la matriz tales como mono y diglicerol, AG, fosfolípidos, etc. Se han diseñado distintos métodos de extracción de lípidos en alimentos, variando procedimiento y disolventes orgánicos empleados: con agitación manual (Dutta, 2004), o mecánica Soxhlet (Christie, 2003) o Röse-Gottlieb (Menéndez-Carreño et al., 2008) y fluidos supercríticos (SFE) (Sahena et al., 2009).

Lo más habitual es la extracción con diferentes combinaciones de disolventes orgánicos. Es muy importante la elección de un buen disolvente, que sea capaz de interrumpir las fuerzas asociativas de unión de los EV/POPs y lípidos, del material no lipídico de la matriz. Hay que tener en cuenta que los POPs son compuestos polares, pero su polaridad varía ampliamente desde el casi no polar, 7-cetosterol, a los trioles que son mucho más polares (Berdeaux et al., 2009). Se utilizan diferentes sistemas de disolventes para la extracción de los lípidos. El más utilizado es una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v) (Folch et al, 1957). Otro sistema es una mezcla de hexano:isopropanol (3:2, v/v) (Hara y Radin, 1978). La aplicación de estos últimos disolventes resulta de interés debido a su menor toxicidad (Dutta et al., 2006), ahora bien, al ser menos polares que en el primer caso (Folch et al., 1957), puede dar lugar a recuperaciones más bajas (Dionisi, 1998; Georgiou et al., 2014).

Existen otras combinaciones de disolventes menos utilizadas, como en Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1992) que utilizan una combinación de Heptano:Isopropanol en muestras de harina de trigo.

El método de Folch es el método más ampliamente utilizado, por considerarse la técnica más eficiente y fiable en el aislamiento exhaustivo de los lípidos de varios tejidos. Inevitablemente, el uso de un sistema disolvente muy polar, da lugar a la co-extracción de material no lipídico, por lo que Folch et al. (1957) sugieren una etapa de lavado, con el fin de eliminar estos contaminantes antes de proceder al siguiente paso del protocolo de análisis. Este paso es esencial con el fin de dividir el sistema en dos fases, la capa orgánica inferior que contiene todos los lípidos, y la superior que consta de los contaminantes co-extraídos no lipídicos (Georgiou et al., 2014). Sin embargo, un parámetro importante que puede influir en la recuperación cuantitativa de los lípidos más polares, tales como POPs, es la cantidad de agua o solución de sal que se agrega después de la homogeneización de la muestra con cloroformo/metanol (2:1). De acuerdo con el documento original, la relación de volumen propuesto de cloroformo/metanol/agua debe ser exactamente 8:4:3 (Georgiou et al., 2014).

También existen varias versiones ligeramente modificadas del método de Folch, destacando la de Boselli et al. (2001). La muestra se homogeniza con cloroformo/metanol (1:1) y se mantiene a 60 °C con el fin de maximizar el rendimiento de la extracción. La mezcla se vuelve a homogenizar con una cantidad igual de cloroformo y, a continuación, se pasa a través de papel de filtro, para eliminar el residuo sólido que contiene principalmente proteínas. Posteriormente, el filtrado que contiene los lípidos acompañados de sustancias no lipídicas, se mezcla con una solución de KCl 1M y se deja durante la noche a 4 °C, consiguiéndose así la correcta separación de fases. La fase inferior, libre de sustancias no lipídicas, se recoge y se seca con un evaporador rotatorio a vacío.

En el caso de los EV es muy común el desarrollo de métodos directos, es decir, que no siendo una matriz grasa, omiten esta etapa de extracción

lipídica, empezando directamente con la purificación (saponificación): Laakso (2005) para margarina, leche, yogur, zumo de naranja y quesos enriquecidos con EV; Santos et al. (2007) y Saraiva et al. (2011) para leche y yogur enriquecidos con EV; Clement et al. (2010) determinan EV totales en zumo, leche, yogur, pan, y cereales de maíz enriquecidos con EV. En el caso de POPs, es menos común pero hay autores que también lo hacen: Soupas et al. (2006) analizan leche en polvo con EV mediante un método utilizado para aceites sin extracción grasa (Lampi et al., 2002). Dionisi et al. (1998) comparan la eficacia del método directo con los métodos de extracción de la grasa, en leche en polvo (analizan COPs) obteniendo buena repetitividad y exactitud. En el caso del análisis en grasas vegetales para untar, hay autores que realizan una extracción previa de la grasa como: Johnsson y Dutta (2006) o Conchillo et al. (2005) y, otros autores que no la extraen (Rudzinska et al., 2014). En el **cuadro nº 7** se muestran distintos sistemas de extracción lipídica para la determinación de EV y POPs.

Cuadro n° 7: Determinación de EV y POPs. Extracción de la fracción lipídica.

Extracción Grasa	Análisis	Alimento	Referencia
Heptano:isopropanol (1:1)	EV/POPs	Harina de trigo	Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1992)
Adaptación de Hara y Radin, 1978:	POPs	Patatas fritas	Dutta y Appelqvist (1997)
1) Hexano:isopropanol (3:2), (3:4)*	POPs	Patatas fritas	Dutta (1997)
2) Homogenizado Ultra-Turax	EV/POPs	Papillas de cereales con leche*	Zunin et al. (1998)
3) Filtrado	POPs	Grasas vegetales para untar enriquecidas con EV	Johnson y Dutta (2006)
4) Na ₂ SO ₄ anhídrido	EV/POPs	Patatas fritas	Tabee et al. (2008a)
	EV	Leche desnatada de cabra enriquecida con EV	Maduko y Park (2007)
	EV/POPs	Patatas fritas	Tabee et al. (2009)
	POPs	Avellanas	Azadmard-Damirchi y Dutta (2009)
Diclorometano:metanol (2:1)	EV/POPs	Grasas vegetales para untar enriquecidas con EV	Grandgirard et al. (2004)
Adaptación de Folch et al. (1957)	EV/POPs	Grasas vegetales para untar enriquecidas y no enriquecidas con EV	Conchillo et al. (2005)
modificado Boselli et al. (2001)	EV/POPs	Productos de bollería	Cercaci et al. (2006)
1) Cloroformo:metanol (1:1)	EV/POPs	Papillas de cereales con leche	García-Llatas et al. (2008)
2) Cloroformo			
3) KCl IM			
Cloroformo:metanol (2:1)	EV/POPs	Pescado y carne picada fritos con aceite de colza	Derewiaka y Obiedzinski (2012)
Heptano	EV/POPs	Fideos y patatas fritas	Derewiaka y Obiedzinski (2012)
Método: Röse-Gottlieb	EV/POPs	Leche enriquecida con EV	Menéndez-Carreño et al. (2008)
Método oficial 920.74 (AOAC, 2002) Éter	EV/POPs	Chocolate negro enriquecido y no enriquecido con EV	Botelho et al. (2014)

EV: esteroides vegetales; POPs: óxidos de esteroides vegetales; KCl: cloruro de potasio. *especificaciones propias del método para el alimento marcado con el mismo símbolo.

En cereales, hay casos que se requiere de una hidrólisis ácida para asegurar la ruptura de los enlaces glucosídicos de los esteroides glicosilados (Lagarda et al., 2006), siendo adecuada una hidrólisis en caliente con HCl con una posterior extracción de la fase grasa con disolventes orgánicos (ej: HCL 6M a 80-85 °C/60 min) aplicado por Clement et al. (2010) y Piironen et al. (2002).

Actualmente, también se emplean otras técnicas más modernas para la extracción lipídica en alimentos, como es el caso de la extracción con fluidos súper críticos (SFE). Se basa en que todo fluido presenta un punto crítico característico definido por su presión y temperatura crítica. Un fluido no puede ser licuado por encima de su temperatura crítica, independientemente de la presión aplicada, pero pueden llegar a una densidad cercana al estado líquido, de este modo es un SFE cuando está por encima de su temperatura crítica y presión crítica. En el caso del CO₂ es supercrítico por encima de 31,1 °C y 7,38 MPa (Sahena et al., 2009). De este modo la utilización de CO₂ supercrítico resulta económico a la vez que ecológico y la FDA y la EFSA lo reconocen como seguro. Su utilización resulta muy interesante en la preparación de muestra, por su capacidad de poder trabajar a bajas temperaturas utilizando un medio no oxidante, que permite la extracción de compuestos térmicamente lábiles o fácilmente oxidables (Herrero et al., 2010). Sin embargo, aunque se ha utilizado en la determinación EV, no ha tenido mucha aceptación todavía en el análisis de POPs. Así, se ha empleado a nivel industrial para la extracción de carotenoides y EV de productos a base de tomate (Vági et al., 2007) aplicando SFE con CO₂ a 460 bares y 80 °C y Kawahito et al. (2008) en semillas de níspero aplicando CO₂ a 300 bares y 40 °C. A nivel analítico también se ha utilizado esta técnica, Huang et al. (2007) determinan β -sitosterol y estigmasterol en *A. roxburghii* para comparar la eficiencia de la extracción con el método Soxhlet y SFE,

obteniendo un mayor rendimiento y tiempos más cortos mediante SFE con CO₂ a 250 bar y 45 °C. También en alimentos, Lu et al. (2007) comparan la SFE con la extracción tradicional con hexano utilizando CO₂ a 450 bar y 55 °C en semillas de maíz, sésamo, cacahuete y avena, obteniendo mayor rendimiento con SFE.

3.2. Purificación

Después de la extracción, la fracción grasa, además de EV/POPs, también contiene TG, fosfolípidos y otros compuestos mayoritarios que han de ser eliminados (Guardiola et al., 2004; Lagarda et al., 2006). En la etapa de purificación durante la determinación de EV y POPs existen dos métodos ampliamente utilizados: saponificación y transesterificación.

3.2.1. Saponificación

Con la saponificación, o hidrólisis alcalina, los acilgliceroles son transformados en compuestos solubles en agua (jabones) y pueden ser eliminados en la fase acuosa. Los EV/POPs forman parte de la fracción insaponificable y pueden ser extraídos con disolventes orgánicos. De este modo la saponificación cumple dos funciones: eliminar los acilgliceroles predominantes del extracto de lípidos mediante su conversión a jabones e hidrolizar los ésteres de esteroides que puedan existir (Guardiola et al., 2004).

En el caso de los EV, tradicionalmente la saponificación se ha realizado calentando la muestra con una solución etanólica o metanólica de NaOH o KOH. Laakso (2005) en margarinas, leche, yogur y zumo de naranja enriquecidos con EV, utilizan saponificación en caliente con KOH en etanol, al igual que Santos et al. (2007) en leche y yogurt. Mientras que Clement et al. (2010) aplican una saponificación con NaOH en metanol a distintas matrices, pero a mayor temperatura. Posteriormente, la fracción

insaponificable se ha de extraer con disolventes orgánicos; la mayoría de los métodos utilizan múltiples extracciones con un disolvente orgánico (dietiléter (EE), éter de petróleo o heptano) con ayuda de embudo de decantación, seguido por evaporación del disolvente a sequedad (Lagarda et al., 2006).

En el caso de POPs, esta etapa es uno de los puntos más críticos en la preparación de la muestra, dado que la temperatura de saponificación y la concentración del álcali, han sido reconocidos como dos parámetros críticos en la formación de artefactos mediante la degradación de los POP, que de por sí son inestables (Busch y King, 2009). Busch y King (2009) han investigado la estabilidad del 7-cetocolesterol durante la saponificación a diferentes temperaturas, obteniendo que la recuperación disminuye con respecto al control (mantenido a 24 °C). Así, a 37 °C disminuye un 53% y a 45 °C un 49%, lo que sugiere una gran sensibilidad de los derivados 7-ceto a altas temperaturas. El mismo grupo también ha estudiado la estabilidad del 7-cetocolesterol en diferentes condiciones alcalinas (KOH 3,6M durante 3 h y KOH 1M durante 18 h, ambos a 24 °C). El tratamiento de la muestra con soluciones alcalinas más concentradas supone una reducción de la recuperación del 71% (Busch y King, 2010). Estas observaciones coinciden con un estudio anterior realizado por Park et al. (1996), donde se sugieren que los 7-ceto son sensibles a pequeños cambios en la temperatura, y a la concentración de los reactivos alcalinos utilizados en la saponificación. Por esta razón en el procedimiento para los POPs, se ha reemplazado la saponificación en caliente, por una saponificación fría, o a temperatura ambiente, con condiciones alcalinas suaves (1M) durante varias horas, habitualmente toda una noche. Además, se ha demostrado que en la saponificación a temperatura ambiente durante ese tiempo las pérdidas de

COPs son mínimas y prácticamente no se forman artefactos (Park y Addis, 1986; Tai et al., 1999; Dutta, 2002; Guardiola et al., 2004).

Como conclusión, se puede decir que para desarrollar un método analítico que incluya una etapa de saponificación, es necesario evaluar todos los factores de esta purificación, incluyendo, tiempo, concentración de álcali, temperatura y peso de muestra. El seguimiento de la generación de artefactos requiere una atención considerable, con el fin de garantizar resultados fiables (Georgiou et al., 2014). En el **cuadro n° 8** se muestran distintos protocolos de saponificación utilizados en la determinación de EV y POPs.

3.2.2. Transesterificación

La transesterificación es una alternativa a la saponificación fría, que algunos autores han utilizado para la determinación de POPs y no se ha utilizado para el análisis de EV. Durante la transesterificación, los ácidos grasos unidos a esteroides y TG se convierten en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), el reactivo es un alcohol o donante de grupos alquilo. Después de la transesterificación, la fracción grasa se compone principalmente de FAME, EV libres, POPs, y otros componentes menores (Guardiola et al., 2004).

Una de las ventajas de la transesterificación es que el álcali está en contacto con la muestra menos tiempo que en la saponificación en frío, a la vez que se elimina el proceso de lavado y se reduce el tiempo de preparación de la muestra (Schmarr et al., 1996). En el **cuadro n° 8** se muestran distintos protocolos de transesterificación utilizados en determinación de POPs.

Cuadro n° 8: Determinación de EV y POPs. Sistemas de purificación mediante saponificación y transesterificación.

Purificación	Análitos	Alimento	Referencia
Saponificación			
KOH/MeOH 1M agitación TA/18 h Extracción: EE Lavados: KOH 0,5N y ADD	EV/POPs	Harina de trigo	Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1992)
KOH/MeOH 2N agitación TA/18 h Extracción: EE Lavados: KOH 0,5N y ADD	EV/POPs	Papillas de cereales con leche	Zunin et al. (1998)
KOH/EtOH 2M agitación TA/18 h Extracción: DCM Lavados: ADD	POPs POPs	Patatas fritas Patatas fritas	Dutta y Appelqvist (1997) Dutta (1997)
EV: KOH/MeOH 1M agitación TA/18 h Extracción: EE Lavados ADD POPs: Transesterificación	EV/POPs EV/POPs EV/POPs	Aceites vegetales Aceites vegetales Margarinas	Rudzinska et al. (2001) Kmicik et al. (2009) Rudzinska et al. (2014)
EV: 0,5 mL KOH en agua a saturación y 8 mL EtOH 80 °C/30 min Extracción: Hx:EE (1:1); *EE:Heptano (1:1); **para muestras de ≤40% de grasa solo con Hx Lavados: ADD POPs: 0,5 mL KOH en agua a saturación y 9 mL EtOH Agitación TA/15 h Extracción: EE Lavados: KOH 0,5N y Na ₂ SO ₄ 0,235M ADD	EV/POPs EV/POPs EV/POPs EV/POPs POPs POPs EV/POPs EV/POPs	Aceites vegetales Aceites vegetales y tripalmitina Aceites vegetales y tripalmitina Aceite vegetal * Aceites vegetales Aceites vegetales Aceites vegetales, leche entera y leche entera en polvo enriquecida con EV ** Aceites vegetales y margarina líquida	Lampi et al. (2002) Soupas et al. (2004a) Soupas et al. (2005) D'Evoli et al. (2005) Zhang et al. (2005) Zhang et al. (2006) Soupas et al. (2006) Soupas et al. (2007)
KOH /EtOH 1M agitación 16h TA Extracción: DCM Lavados: ADD	POPs	Aceite vegetal	Lambelet et al. (2003)
KOH/EtOH 2M Agitación TA/18 h Extracción: EE Lavados: ADD	POPs	Aceites vegetales	Bortolomeazzi et al. (2003)
KOH/EtOH 2M 60 °C/1 h Extracción: Heptano	EV	Margarina, leche, yogur, zumo de naranja y quesos	Laakso (2005)

Cuadro n° 8 continuación: Determinación de EV y POPs. Sistemas de purificación mediante saponificación y transesterificación.

Purificación	Análitos	Alimento	Referencia
KOH/MeOH IN Agitación TA/18 h Extracción: EE Lavados: KOH 0,5N y Na ₂ SO ₄ 0,2M ADD *EV: adición de BHT antes saponificación. Método Kovacs 1979 (1mL 50% KOH y 4mL 95% EtOH T ^a (en caliente)/1 h).	EV/POPs	Grasas vegetales para untar enriquecidas y no enriquecidas con EV	Conchillo et al. (2005)
	EV/POPs	Productos de bollería	Cercaci et al. (2006)
	EV/POPs	Emulsiones de aceite vegetal	Cercaci et al. (2007)
	EV/POPs	Papilla con cereales y leche	García-Llatas et al. (2008)
	EV/POPs	Leche enriquecida con EV*	Menéndez-Carreño et al. (2008)
KOH/EtOH 2M 80 °C/45 min Extracción: Hx	EV	Leche enriquecida con EV	Santos et al. (2007)
	EV	Leche enriquecida con EV	Saraiva et al. (2011)
KOH/EtOH 2,5M 60 °C/90 min Extracción: Hx	EV	Yogur enriquecido con EV	Santos et al. (2007)
	EV	Yogur enriquecido con EV	Saraiva et al. (2011)
0,5 mL de KOH/agua en saturación 80 °C/30 min Extracción: Hx; Lavados: ADD	EV	Leche desnatada de cabra enriquecida con EV	Maduko y Park (2007)
EV: KOH/EtOH 2M 60 °C/65 min Extracción: Hx y ADD:Hx:EE1 (1:2:0.1) centrifugado	EV/POPs	Patatas fritas	Tabee et al. (2008a)
POPs: Transesterificación	EV/POPs	Aceites vegetales	Tabee et al. (2008b)
	EV/POPs	Patatas fritas	Tabee et al. (2009)
EV: KOH/EtOH 2M 60 °C/45 min Extracción: EE Lavados: KOH 0,5N y ADD	EV/POPs	Aceites vegetales	Azadmard-Damirchi y Dutta (2008)
POPs: Transesterificación			
NaOH/MeOH 2,3N 100 °C/15 min Extracción: Tolueno con NaCl saturada en ADD	EV	Pan, yogur, leche, zumo de naranja y de manzana enriquecidos con EV, aceite soja	Clement et al. (2010)
KOH/MeOH 2N TA/1-2 h, muestra redisuelta en Hx Sin extracción ni lavados, toman la fracción de Hx	EV/POPs	Pecado y carne picada fritos con aceite de colza, fideos y patatas fritas.	Derewiaka y Obiedzinski (2012)
EV: Laakso (2005)	EV/POPs	Chocolates negros enriquecidos y no enriquecidos con EV	Botelho et al. (2014)
POPs: KOH/MeOH 2M. Agitación TA/18 h Extracción: EE Lavados: KOH 0,5N y Na ₂ SO ₄ 0,2M ADD			

Cuadro n° 8 continuación: Determinación de EV y POPs. Sistemas de purificación mediante saponificación y transesterificación.

Transesterificación				
EV: Saponificación	POPs	Accites vegetales y grasas vegetales para untar enriquecidas con EV	Johnsson y Dutta (2006)	
POPs: Adaptación (Schmarr et al. 1996)				
MeONa/MeOH 10% + MTBE (4:6) TA/40 min	EV/POPs	Patatas fritas	Tabee et al. (2008a)	
Extracción: ADD y Cloroformo. Centrifugado. Ácido cítrico (neutralizar)	EV/POPs	Accites vegetales	Tabee et al. (2008b)	
	EV/POPs	Patatas fritas	Tabee et al. (2009)	
EV: Saponificación	EV/POPs	Accites vegetales	Rudzinska et al. (2001)	
POPs: Adaptación (Schmarr et al. 1996)	EV/POPs	Accites vegetales	Azadmard-Damirchi y Dutta (2008)	
MeONa/MeOH 10% + MTBE (4:6) TA/1 h			Azadmard-Damirchi y Dutta (2009)	
Extracción: ADD y Cloroformo. Centrifugado. Ácido cítrico (neutralizar)	POPs	Aceite y avellanas	Kmiecik et al. (2009)	
	EV/POPs	Accites vegetales	Rudzinska et al. (2014)	
	EV/POPs	Margarinas		

MeONa: metóxido de sodio; MTBE: metil-*tert*butil éter; DCM: Diclorometano; EE: Dietiléter; T^o: temperatura; TA: temperatura ambiente; ADD: agua destilada desionizada; EV: esterles vegetales; POPs: óxidos de esterles vegetales, BHT: Butilhidroxitolueno; MeOH: metanol; EtOH: etanol. * y **: especificaciones propias del método para el alimento marcado con el mismo símbolo.

3.3. Concentración

Los esteroides oxidados se hallan en muy bajas concentraciones en los alimentos. Es por ello que, la purificación de estos compuestos sea un paso esencial para mejorar la selectividad, sensibilidad y eficiencia en la separación por GC para su identificación y cuantificación (Dutta, 2002). Hay algunos aspectos importantes a tener en cuenta cómo es que, el colesterol no oxidado tiene un tiempo de retención en GC diferente a los COPs lo que hace que eluya mucho antes que la mayoría de estos. Esto hace que no sea necesario eliminar el colesterol no oxidado en los alimentos de origen animal. Por el contrario, en la determinación de POPs, los EV no oxidados, en alimentos de origen vegetal, o esteroides no oxidados (colesterol + EV) en alimentos de origen mixto, pueden interferir durante la separación en GC, debido a que los tiempos de retención son similares a algunos de los POPs (Azadmard-Damirchi y Dutta, 2009).

La concentración de los POPs puede hacerse por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) preparativa, cromatografía en capa fina (TLC) preparativa, o extracción en fase sólida (SPE) (Dutta, 2002). Los métodos de HPLC preparativos son bastante tediosos y consumen mucho tiempo. En el caso de la TLC preparativa (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1992) la muestra se encuentra expuesta durante mucho tiempo al aire, dando lugar a la formación de artefactos, además del tiempo empleado en su preparación. La técnica más frecuentemente utilizada es la SPE, que ha sustituido a las anteriores por ser más rápida, eficaz y sensible (Dutta y Appelqvist, 1997).

Se han desarrollado varios métodos de SPE para el aislamiento selectivo de POPs antes del análisis cromatográfico. Generalmente, la purificación con SPE se logra mediante los siguientes pasos: carga de la muestra y retención de los POPs en la fase estacionaria (por lo general polar); seguidamente se procede a la eliminación de los lípidos neutros

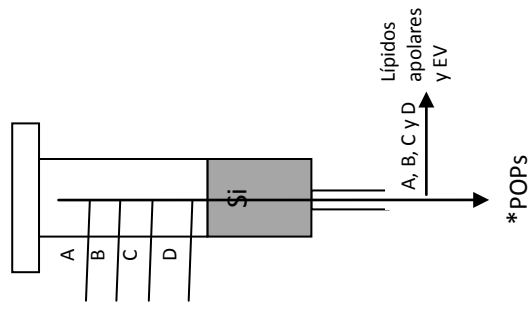
interferentes (EV y TG) mediante lavado de la columna con un sistema de disolventes apolar; progresivamente se aumenta la polaridad de los disolventes hasta la elución de los POPs. Los fosfolípidos, que son los compuestos más polares, permanecen fuertemente retenidos en la columna (Guardiola et al., 2004; Calderón-Santiago et al., 2012).

Los rellenos de cartucho de SPE más usados son los polares en fase normal de sílice (Si-) y aminopropilo (NH₂-) ya sea solo o combinado. Por otro lado, los sorbentes apolares como sílice modificado con octadecilo (ODS-), no han encontrado un uso generalizado por ser menos eficientes (Ulberth y Rossler, 1998; Dutta, 2002; Georgiou et al., 2014).

El paso por SPE es crítico para conseguir una buena separación entre los esteroides oxidados y sin oxidar, así como para una buena recuperación de los POPs con distinto grado de retención. Son varios los estudios donde se utilizan cartuchos de sílice y mezclas de hexano:EE de polaridad creciente, para eliminar los interferentes, y acetona y/o metanol para eluir los óxidos de esteroides. Guardiola et al. (1995) estudian la recuperación de patrones de COPs (7 β -OH, α -colestano, triol, 7-ceto y 25-hidroxi) y la presencia de colesterol no oxidado en la fracción de COPs en cartuchos de Si-SPE. Obtienen que los sistemas de elución menos polares, hacen que los COPs más polares (triol) se recuperen en menor cantidad, y concluyen que los mejores sistemas de elución son aquellos que aumentan su polaridad al final. Algunas de las condiciones de SPE aplicadas para la purificación en la determinación de POP se muestran en el **cuadro n° 9**.

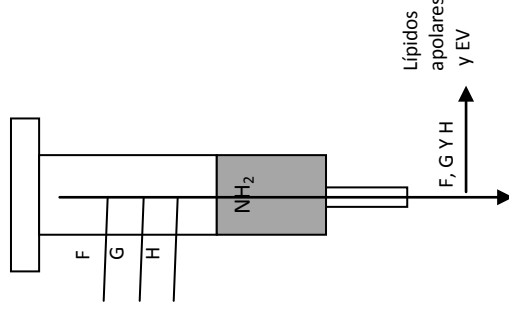
Cuadro n° 9: Determinación de EV y POPs. Sistemas de extracción en fase sólida aplicados para la concentración de POPs en alimentos.

Tipo de SPE	Orden elución	Alimento	Referencia
Si-	A Hx:EE (75:25) B Hx:EE(75:25) C Hx:EE(60:40) * Acetona	Patatas fritas Patatas fritas	Dutta y Appelqvist (1997) Dutta (1997)
Si-	A Hx:EE(60:40) * Acetona		
Si-	A Hx:EE(9:1) B Hx:EE(1:1) * Acetona	Aceites vegetales Aceites vegetales y tripalmitina Aceites vegetales y tripalmitina Aceite vegetal Aceites vegetales Aceites vegetales, leche entera y leche entera en polvo enriquecidas con EV Aceites vegetales Aceites vegetales y margarina líquida Aceites vegetales Aceites vegetales Aceite y avellanas Patatas fritas	Lampi et al. (2002) Soupas et al. (2004a) Soupas et al. (2005) D'Evoli et al. (2005) Zhang et al. (2005) Soupas et al. (2006) Zhang et al. (2006) Soupas et al. (2007) Azadmard-Damirchi y Dutta (2008) Tabee et al. (2008b) Azadmard-Damirchi y Dutta (2009) Tabee et al. (2009)
Si-	A Hx:MTBE (90:10) B Hx:MTBE (80:20) * Acetona	Aceite vegetal Grasas vegetales para untar enriquecidas con EV	Lambelet et al. (2003) Grandgirard et al. (2004)
Si-	A Hx: EE(1:1) * EE: MeOH(1:1)	Aceites vegetales	Bortolomeazzi et al. (2003)



Cuadro n° 9 continuación: Determinación de EV y POPs. Sistemas de extracción en fase sólida aplicados para la concentración de POPs en alimentos.

Tipo de SPE	Orden elución	Alimento	Referencia
Si-	A	Hx	Conchillo et al. (2005)
	B	Hx:EE(95:5)	
	C	Hx:EE(90:10)	
	D	Hx:EE(80:20)	
	*	Acetona	
NH ₂ -	F	Grasas vegetales para untar enriquecidas y no enriquecidas con EV	Cercaci et al. (2006)
	G	Productos de bollería	
	H	Emulsiones de aceite vegetal	
	*	Papilla de cereales con leche	
		Leche enriquecida con EV	
NH ₂ -	F	Chocolate negros enriquecidos y no enriquecidos con EV	Menéndez-Carreño et al. (2008)
	G	Aceites vegetales	
	H	Aceites vegetales	
	*	Patatas fritas	
		Margarinas	
NH ₂ -	F	Aceites vegetales y grasas vegetales para untar enriquecidas con EV	Johnsson y Dutta (2006)
	G	Aceites vegetales	
	*	Patatas fritas	
	F	Hx:MTBE (2:1)	
	G	Hx:MTBE (2:1)	
NH ₂ -	F	Hx:MTBE (2:1)	Rudzinska et al. (2001)
	G	Hx:MTBE (3:1)	
	*	Acetona	
	F	Hx:MTBE (2:1)	
	G	Hx:MTBE (2:1)	



* POPs

SPE: extracción en fase sólida; Si-: relleno de sílice; NH₂-: relleno de aminopropilo; Hx: hexano; EE: dietiléter; MTBE: metil-*tert*butil éter; MeOH: metanol; EV: esteroides vegetales; POPs: oxidos de esteroides vegetales; El orden de elución se indica con las letras establecidas.

3.4. Determinación: Separación e identificación

3.4.1. Cromatografía de gases

La cromatografía gaseosa es la técnica de elección para la determinación de EV en alimentos, por ser la más efectiva en resolución, identificación y cuantificación (Volin, 2001). Los EV son susceptibles de ser oxidados, tanto en la estructura del anillo como en la cadena lateral, dando lugar a numerosos POPs. Esto hace que la metodología aplicada tenga que ser muy eficiente y debe permitir el no solapamiento de compuestos. Por esta razón, la GC con columnas capilares, es la técnica más utilizada para el análisis también de POPs en alimentos (Guardiola et al., 2004; Márquez Ruíz y Dobarganes, 2007). Los detectores más utilizados son de ionización de llama (FID) y de espectroscopía de masas (MS) que resulta de utilidad para confirmar la identificación de los picos, así como su cuantificación (Santos et al., 2007).

❖ Derivatización

Debido a los altos puntos de ebullición de los EV y sus óxidos, es necesario aplicar temperaturas elevadas en los métodos de determinación por GC. Con el fin de evitar la degradación y formación de artefactos, los EV/POPs deben de ser derivatizados antes de su inyección, es decir, han de ser modificados químicamente para aumentar su volatilidad, estabilidad térmica y separación cromatográfica (Guardiola et al., 2004; Lagarda et al., 2006). La derivatización de los EV/POPs se realiza por sililación. Esta técnica, se basa en la sustitución de hidrógenos ácidos en los EV/POPs por grupos alquilsililo, dando lugar a trimetilsililéteres (TMSE) que presentan una mejor resolución, sensibilidad, y estabilidad a altas temperaturas (Lagarda et al., 2006). La separación de EV sin la derivatización también es

posible (Maduko y Park, 2007), pero la resolución de un esteroil y de su estanol correspondiente no es tan buena.

Las combinaciones de reactivos para la derivatización más utilizadas son: hexametildisilazano (HMDS) con trimetilclorosilano (TMCS) (Johnsson y Dutta, 2003; Conchillo et al., 2005; Johnsson y Dutta, 2006; Cercaci et al., 2006; García-Llatas et al., 2008; Tabee et al., 2009; Azadmard-Damirchi y Dutta, 2009) o N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) con TMCS (Lampi et al., 2002; Lambelet et al., 2003; Soupas et al., 2004a; Laakso, 2005; Santos et al., 2007; Soupas et al., 2007; Kmiecik et al., 2009; Clement et al., 2010; Saraiva et al., 2011; Derewiaka y Obiedzinski, 2012; Botelho et al., 2014 o Rudzinska et al., 2014). Algunos autores han utilizado otros reactivos como N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) (Zhang et al., 2005 y Zhang et al., 2006) o bis(trimetil)-trifluoroacetamida (BFT) y TMCS (Apprich y Ulberth, 2004). En todos los casos, dichos reactivos se disuelven en piridina que, además de disolvente, actúa como aceptor del ácido clorhídrico que se genera cuando se utiliza TMCS.

Los distintos reactivos tienen diferentes tiempos de sililación, de modo que esta etapa debe ser evaluada cuidadosamente para que la reacción sea correcta. Cabe destacar que es muy importante la ausencia de agua en esta reacción, ya que compite con los grupos hidroxilo de los EV/POPs por el grupo silil, provocando que la reacción no sea completa y que los derivados TMSE sean menos estables (Guardiola et al., 2004).

❖ Columnas

Las columnas utilizadas para el análisis de los EV/POPs son, generalmente, columnas capilares de sílice fundida con fase estacionaria apolar del tipo 100% dimetilpolisiloxano, o del tipo 5% fenil 95%

metilpolisiloxano, o 5% difenil 95% dimetilpolisiloxano, con unas dimensiones estándar de 0,10-0,32 mm de diámetro interno, 0,1-0,33 μm de espesor y 10-60 m de longitud.

En relación a los EV, la utilización en GC de una columna capilar con una fase móvil de polaridad media, permite una buena separación entre las parejas campesterol/campestanol y β -sitosterol/sitostanol, separación que no se alcanza con las fases estacionarias totalmente apolares (Laakso, 2005). En la **cuadro n° 10** se muestran las columnas utilizadas por diversos autores para la determinación de EV en alimentos.

En relación a los POPs, el orden de elución según la columna utilizada varía; así pues, Guardiola et al. (2002) establecen el orden de elución para COPs (como derivados TMSE) y, por consiguiente, para los distintos POPs, en los dos tipos de columna más frecuentemente utilizadas: a) para columnas 100% dimetilpolisiloxano el orden es: colesterol > 7α -hidroxicolesterol > 19-hidroxicolesterol > β -epoxicolesterol > α -epoxicolesterol > 7β -hidroxicolesterol > colestaneetriol > 7-cetocolesterol > 25-hidroxicolesterol y b) para columnas 5% fenil 95% metilpolisiloxano la elución es: 7α -hidroxicolesterol > colesterol > 19-hidroxicolesterol > 7β -hidroxicolesterol > β -epoxicolesterol > α -epoxicolesterol > colestaneetriol > 25-hidroxicolesterol > 7-cetocolesterol.

Hay que tener en cuenta que los POPs que pueden existir en los alimentos son muy variados. Además, algunas formas no oxidadas como brassicasterol, campesterol y estigmasterol, coeluyen con 7α -hidroxicampesterol, 7α -hidroxiestigmasterol, y 7α -hidroxisitosterol, respectivamente (Dutta, 2002). De ahí la importancia de la eliminación completa de los EV no oxidados, ya que su presencia dificulta la buena separación de los analitos y aun así, existen solapamientos de algunos

compuestos (Dutta, 2002; Apprich y Ulberth, 2004; Grandgirard et al., 2004; García-Llatas et al., 2008).

Algunos autores proponen distintas combinaciones de dos columnas de polaridades diferentes para mejorar la separación de picos. Los pioneros son Johnsson y Dutta (2005) con la columnas DB-5MS (5% fenil 95% metilpolisiloxano, no polar) y DB-35MS (35% fenil 65% metilpolisiloxano, polaridad media). A pesar de aumentar el tiempo de análisis (75 min) no se logra evitar el solapamiento de tres pares de picos: 24-hidroxisitosterol/ β -epoxicampesterol; β -epoxiestigmasterol/ α -epoxicampesterol; y α -epoxiestigmasterol/campestanotriol. Posteriormente, se han ensayado otras combinaciones de dos columnas (Johnsson y Dutta, 2006; Azadmard-Damirchi y Dutta, 2008; Tabee et al., 2008a; Tabee et al., 2009). En el **cuadro n° 10** se muestran las columnas utilizadas por diversos autores para la determinación de POPs en alimentos.

Sarojini et al. (2012) han estudiado la eficiencia y sobre todo, la reducción del tiempo de análisis, con 2 pares de columnas de diferente polaridad (no polar + polaridad media): sistema 1: DB-5MS y DB-17MS y sistema 2: DB-5MS y DB-35MS. Los tres tipos de columnas utilizadas son de 15 m o menos y, por tanto, los tiempos de análisis se reducen entre 40 y 45 min, aunque igualmente, se producen solapamientos de analitos. Los pares de POPs que coeluyen, o presentan una mala separación en el sistema “1” son: α -epoxibrassicasterol/brassicastanotriol; stigmastanotriol/ β -epoxisitosterol; y sitostanotriol/7-cetobrassicasterol. El sistema “2” presenta una mejor separación de la línea base pero también tiene pares de POPs que coeluyen: 7β -hidroxibrassicasterol/ 7α -hidroxisitosterol; 7β -hidroxisitosterol/ α -epoxibrassicasterol; y α -epoxicampesterol/ β -epoxiestigmasterol.

Cuadro n° 10. Determinación de EV y POPs. Separación e identificación por GC.

Columna capilar	Detector	Analitos	Alimento y patrón interno (PI)	Referencia
CP-Sil 5 CB (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	Cuantificación: FID Identificación: MS	POPs	Patatas fritas (PI: 5α-col)	Dutta y Appelqvist (1997) Dutta (1997)
EV: SPB-5 (30 m x 0,32 mm; 0,25 µm) POPs: HP-5MS (50 m x 0,20 mm; 0,32 µm)	Cuantificación EV: FID Cuantificación POPs MS (TIC)	EV/POPs	Patatas fritas (PI: 19-OHcol y 5α-col) Aceites vegetales (PI: EV 5α-col; POPs 19-OHcol)	Rudzinska et al. (2001)
HP-5MS (50 m x 0,20 mm; 0,32 µm)	FID	EV/POPs	Aceites vegetales (PI: EV 5α-col; POPs 19-OHcol)	Kimiecik et al. (2009)
EV: SPB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm) POPs: HP-5MS (50 m x 0,20 mm; 0,32 µm)	Cuantificación: FID Identificación: MS (trampa iónica)	EV/POPs	Margarinas (PI: EV 5α-col; POPs 19-OHcol)	Rudzinska et al. (2014)
Rtx-5 (60 m x 0,32 mm; 0,1 µm) (GC(FID)) Rtx-5MS (60 m x 0,25 mm; 0,1 µm) (GC-MS)	Cuantificación EV: FID *Cuantificación de los POPs por FID Cuantificación POPs: MS (SIM) Curvas de calibrado: FID	EV/POPs EV/POPs EV/POPs EV/POPs	Aceites vegetales* (PI: EV dihidrocol; POPs 19-OHcol) Aceites vegetales y tripalmitina (PI: EV dihidrocol; POPs 19-OHcol) Aceites vegetales y tripalmitina (PI: EV dihidrocol; POPs 19-OHcol) Aceites vegetales*, leche entera y leche entera en polvo enriquecida en EV (PI: EV dihidrocol; POPs 19-OHcol)	Lampi et al. (2002) Soupas et al. (2004a) Soupas et al. (2005) Soupas et al. (2006)
		EV/POPs	Aceite vegetal (PI: EV dihidrocol; POPs 19-OHcol)	D'Evoli et al. (2006)
		EV/POPs	Aceites vegetales y margarina líquida (PI: EV dihidrocol; POPs 19-OHcol)	Soupas et al. (2007)

Cuadro n° 10 continuación. Determinación de EV y POPs. Separación e identificación por GC.

GC Columna Capilar	Detector	Analitos	Alimento y patrón interno (PI)	Referencia
	Cuantificación: FID Identificación: MS	POPs	Aceite vegetal (PI: 5 α -col)	Lambelet et al. (2003)
DB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m)	Cuantificación EV: MS (TIC) Cuantificación POPs: MS (SIM)	EV/POPs	Pescado y carne picada fritos con aceite de colza, fideos y patatas fritas (PI: EV 5 α -col; POPs 19-OHcol)	Derewianka y Obiedzinski (2012)
SPB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m)	MS (trampa iónica)	POPs	Aceites vegetales (PI: 7-cetocol y 7 α -OHcol)	Bortolomeazzi et al. (2003)
	Cuantificación: MS (SIM)	POPs	Aceites vegetales (PI: 19-OHcol)	Zhang et al. (2005)
VF-5MS (60 m x 0,25 mm; 0,1 μ m)	Cuantificación: MS (TIC)	POPs	Aceites vegetales (PI: 19-OHcol)	Zhang et al. (2006)
			Grasas vegetales para untar enriquecidas y no enriquecidas con EV (PI: EV 5 α -col; POPs 19-OHcol)	Conchillo et al. (2005)
En GC(FID): CP-Sil 8 CB (50 m x 0,25 mm; 0,25 μ m)	Cuantificación: FID Identificación: MS	EV/POPs	Productos de bollería (PI: EV 5 α -col; POPs 19OHcol)	Cercaci et al. (2006)
En GC-MS: SPB-5 o HP-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m)		EV/POPs	Emulsiones de aceite vegetal* (PI: EV 5 α -col; POPs 19-OHcol)	Cercaci et al. (2007)
*En GC-MS misma columna que en FID		EV/POPs	Papilla de cereales con leche (PI: EV 5 α -col; POPs 19-OHcol)	García-Llatas et al. (2008)
Doble columna : DB-35MS + DB-5MS (ambas de 25 m x 0,2 mm; 0,33 μ m)	FID	POPs	Aceites vegetales y grasas vegetales para untar enriquecidas con EV (PI: 5 α -col)	Johnsson y Dutta (2006)
Rtx -5 (30 m x 0,32 mm; 0,25 μ m)	Cuantificación: FID Identificación: MS	EV	Margarina, leche, yogur, zumo de naranja y quesos (PI: epicoprostanol)	Laakso (2005)

Cuadro n° 10 continuación. Determinación de EV y POPs. Separación e identificación por GC.

Columna capilar	Detector	Analitos	Alimento y patrón interno (PI)	Referencia
HP-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	Cuantificación: (TIC)	EV MS	Leche y yogur enriquecidos con EV (PI: 5α-col) Leche y yogur enriquecidos con EV (PI: 5α-col)	Santos et al. (2007) Saraiva et al. (2011)
SAC-5 (30 m x 0,20 mm; 0,20 µm)	FID	EV	Leche desnatada de cabra enriquecida con EV (PI: 5β-col)	Maduko y Park (2007)
HP-1 (30 m x 0,25 mm; 0,1 µm) (GC(FID))	Cuantificación EV: FID	EV/POPs	Leche enriquecida con EV (PI: EV 5α-col; POPs 19OHcol)	Menéndez-Carreño et al. (2008)
VF-5MS (50 m x 0,25mm; 0,25 µm) (GC-MS)			Chocolates negros enriquecidos y no enriquecidos con EV (PI: EV epicoprostanol; POPs 19OHcol)	Botelho et al. (2014)
Rtx -5 (30 m x 0,32 mm; 0,25 µm) (GC(FID))	Cuantificación POPs: MS en modo SIM	EV/POPs	Aceites vegetales (PI: EV colesterol; POPs 5α-col)	Azadmard-Damirchi y Dutta (2008)
Rtx -5MS (10 m x 0,1 mm; 0,1 µm) (GC-MS)				
EV: Doble columna: DB-5MS (10 x 0,18 mm; 0,18 µm) + DB-17MS (10 m x 0,18 mm; 0,18 µm) la misma en FID y MS. POPs: Doble columna : DB-5MS (15 x 0,18 mm; 0,18 µm) + DB-35MS (10 m x 0,2 mm; 0,33 µm) la misma en FID y MS.	Cuantificación: FID Identificación: MS	EV/POPs	Patatas fritas (PI: EV y POPs 5α-col)	Tabee et al. (2008 a)
EV: DB-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,50 µm) POPs: Doble columna: DB-17MS + DB-5MS (ambas 10 m x 0,18 mm; 0,18 µm) la misma en FID y MS	Cuantificación: FID Identificación: MS (solo para POPs)	POPs	Aceite y avellanas (PI: EV y POPs 5α-col)	Azadmard-Damirchi y Dutta (2009)
EV: DB-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,50 µm) POPs: Doble columna: DB-5MS (15 x 0,18 mm; 0,18 µm) + DB-35MS (10 m x 0,2 mm; 0,33 µm) la misma en FID y MS	Cuantificación: FID Identificación: MS (solo para POPs)	EV/POPs	Aceites vegetales (PI: EV y POPs 5α-col)	Tabee et al. (2008b)
		EV/POPs	Patatas fritas (PI: EV y POPs 5α-col)	Tabee et al. (2009)

Cuadro n° 10 continuación. Determinación de EV y POPs. Separación e identificación por GC.

GC Columna Capilar	Detector	Analitos	Alimento y patrón Interno (PI)	Referencia
DB-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	FID	EV	Pan, yogur, leche, zumo de naranja y de manzana enriquecidos con EV, aceite soja (PI: epicoprostanol)	Clement et al. (2010)

Columnas: No polares: = HP-5MS = DB-5: 5% fenil 95%dimetilpolisiloxano; SPB5 = Rtx-5MS = VF-5MS= SAC-5= CP-Sil 8 CB (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano). DB-5MS: 5% fenil 95% dimetil arilen siloxano; CP-Sil 5 CB= HP-1: 100% dimetilpolisiloxano. Polaridad media: DB-17MS 50% fenil 50% dimetil arilen siloxano; DB-35MS 35%-fenil 65% dimetil arilen siloxano; Patrones internos(PI): 5 α -col (5 α -colestano); 5 β -col: (5 β -colestano); 19-OHcol (19-hidroxicolesterol); 7-cetocol (7-cetocolesterol) y 7 α -OHcol (7 α -hidroxicolesterol); dihidrocol (dihidrocolesterol). GC: cromatografía de gases; MS: espectrómetro de masas; FID: detector de ionización de llama; SIM: monitorización selectiva de iones; TIC: total ion current; EV: esteroides vegetales; POPs: óxidos de esteroides vegetales.

❖ Patrones internos.

La metodología utilizada en la identificación y cuantificación de los EV/POPs habitualmente incluye el uso de un patrón interno (PI).

Uno de los PI más comúnmente utilizados para el análisis de EV es el 5 α -colestano (Lambelet et al., 2003; Conchillo et al., 2005; Santos et al., 2007; Azadmard-Damirchi y Dutta, 2009), sin embargo, un PI debe de ser similar a los analitos, y el 5 α -colestano carece del grupo hidroxilo en posición 3 típico de los EV y, además, su respuesta en detector FID difiere de la de los EV (Laakso, 2005). El dihidrocolesterol, o colestanol (3 β -ol-hidroxi-5 α -colestano) es también un PI ampliamente utilizado (Lampi et al., 2002; Soupas et al., 2004a; Soupas et al., 2005; D'Evoli et al., 2006), este PI no podría utilizarse en muestras que tuvieran origen animal ya que el dihidrocolesterol es el producto de hidrogenación del colesterol. Para la mayoría de las matrices se ha observado que el epicoprostanol (5 β -colestano-3 α -ol) (Laakso, 2005; Clement et al., 2010; Botelho et al., 2014) es adecuado ya que su estructura se asemeja mucho a la de los EV, está ausente en muestras de análisis y su respuesta en el detector FID es similar a la de los EV (Lagarda et al., 2006).

En el caso de los POPs, el 19-hidroxicolesterol es el más comúnmente utilizado ya que puede adicionarse tras la extracción grasa. Otro patrón utilizado es el α -colestano; no obstante, este es menos polar que los POPs lo que hace que no pueda ser adicionado hasta después de la etapa de purificación. Bortolomeazzi et al. (2003) utilizan como PI los mismos patrones de COPs para cada POP a analizar (7-cetocolesterol y 7 α -hidroxicolesterol). En el **cuadro n° 10** se muestran los distintos PI utilizados en el análisis de EV y POPs.

❖ Detectores.

El más comúnmente utilizado para EV/POPs es el de FID ya que aporta una alta especificidad y sensibilidad, permitiendo una detección a niveles de ng (Dutta et al., 2006). El acoplamiento de un MS da mayor valor al análisis y resulta necesario para la confirmación de la identificación de los distintos compuestos en el caso de los POPs, dada la no existencia de patrones comercializados (salvo 7-cetoestigmaterol). Se han publicado numerosos estudios que aportan datos sobre la fragmentación molecular y espectros de masas de los distintos TMSE derivados de los POPs (Dutta, 2002; Johnsson y Dutta, 2003; Johnsson et al., 2003; Lambelet et al., 2003; Grandgirard, 2004a; Conchillo et al., 2005). También se ha utilizado la espectroscopía de masas en modo SIM (monitorización selectiva de iones) se identifica un ion selectivo para cada compuesto, que se utiliza para la cuantificación en base a su abundancia y especificidad. Esto permite la cuantificación de compuestos que coeluyen en la columna cromatográfica. (Guardiola et al., 2002; Soupas et al., 2004a; Soupas et al., 2004b; Zhang et al., 2005; Menéndez-Carreño et al., 2008; Botelho et al., 2014). En el **cuadro nº 10** se muestran los distintos detectores utilizados en el análisis de EV y POPs.

❖ Cuantificación

El método utilizado generalmente para la cuantificación de los EV es mediante el desarrollo de curvas de calibrado, dada la existencia de patrones comerciales de EV, bien para todos los EV a analizar (Saraiva et al., 2011) o bien para uno solo y el resto se cuantifican por extrapolación en la misma curva (Santos et al., 2007). También se han desarrollado métodos mediante factor respuesta (FR) con el PI utilizado (Laakso, 2005), estos autores concluyen que, utilizando epicoprostanol como PI no se requiere de factores de corrección dada la similitud de la respuesta entre el PI y los EV, de modo

que el FR sería = 1. Clements et al. (2010) utilizan, en FID, otro tipo de factores de corrección en la cuantificación, los factores de corrección teóricos (TFC) consistente en el cálculo teórico, basado en la suma del peso molecular de todos los C activos (los que dan respuesta en FID, excepto los de grupos carbonilo) del analito a estudio y el TFC del PI.

Los métodos utilizados para la cuantificación de los POPs son:

a) mediante el FR. Se considera = 1 (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1992; Dutta y Appelqvist, 1997; Dutta, 1997; Conchillo et al., 2005; Cercaci et al., 2006; Johnsson y Dutta, 2006; Cercaci et al., 2007; García-Llatas et al., 2008; Tabee et al., 2008a; Tabee et al., 2008b; Azadmard-Damirchi y Dutta, 2008; Azadmard-Damirchi y Dutta, 2009; Tabee et al., 2009; Derewianka y Obiedzinski, 2012). En otros trabajos se calcula el FR a partir de patrones de COPs debido a su similitud estructural (Lampi et al., 2002; Apprich y Ulberth, 2004). O se calcula a partir de patrones de POPs sintetizados (Bortolomeazzi et al., 2003; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2006).

b) Mediante el desarrollo de curvas de calibrado. Con patrones de COPs para la cuantificación de los distintos POPs (Menéndez-Carreño et al., 2008; Botelho et al., 2014). Soupas et al., (2004b), desarrollan curvas de calibrado de forma indirecta en GC-MS y GC(FID), utilizando patrones de POPs sintetizados del sitostanol. Las curvas de calibrado para cada óxido se realizan mediante la respuesta en GC-MS (SIM) frente a la cantidad calculada en GC(FID) considerando FR=1.

3.4.2. Cromatografía líquida

En comparación con GC, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ofrece la ventaja de operar a temperaturas más suaves, y bajo condiciones de detección no destructivas. Por consiguiente, parece adecuado

para el análisis de compuestos térmicamente inestables, tales como EV. Sin embargo, la elevada lipofilia de los EV puede hacer que el procesado de la muestra y la cromatografía sea difícil. En el análisis de muestras lipídicas y esteroides se han utilizado tanto fases normales como reversas (Lagarda et al., 2006). En cuanto a los detectores, se han utilizado detectores de ultravioleta (UV) (200-210 nm), “diode-array detector” (DAD) (Zunin et al., 1998), índice de refracción (“refraction index”, RI), dispersión de luz evaporativo (“evaporating light scattering detector”, ELSD), resonancia magnética nuclear (RMN) y MS (Lagarda et al., 2006). También se ha utilizado el análisis mediante ionización química a presión atmosférica (“atmospheric-pressure chemical ionization”, APCI) con espectrometría de masas acoplado a HPLC, en el caso de zumos de frutas y también en margarinas (Mezine et al., 2003).

Para el estudio de POPs en alimentos se ha utilizado en muy pocos casos. Zunin et al. (1998) evalúan la oxidación de colesterol y EV en alimentos infantiles a base de leche y leche con cereales, mediante la determinación de 7-cetocolesterol y 7-cetositosterol por HPLC con detector DAD.

La principal ventaja que ofrece el HPLC, en comparación con GC, es que opera a temperatura ambiente, siendo así adecuado para la detección de moléculas termolábiles, tales como productos de oxidación primarios (hidroperóxidos) (Kemmo et al., 2007). En este sentido, Säynäjoki et al. (2003) determinan por HPCL en fase normal, hidroperóxidos de estigmasterol originados por fotooxidación. Utilizan dos tipos de detectores: UV, y fluorescencia (FL) previa derivatización post-columna de los hidroperóxidos con DPPP (1,3-bis (difenilfosfina) propano o difosfina). Ya que reacciona con los hidroperóxidos generando óxidos que presentan una fuerte fluorescencia. Este método resulta rápido y sensible cuando se

presentan óxidos de un único esteroide. Posteriormente, Kemmo et al. (2005) aplican este método (HPLC-UV-FL) a la determinación tanto de hidroperóxidos como de productos de oxidación secundarios de estigmasterol. La cuantificación de los POPs de estigmasterol se hace por detección al UV (206 nm), por un método de patrón externo, utilizando patrones de COPs. Los autores observan una baja absorción en UV para los α/β -epoxi derivados de estigmasterol, debido a que contienen solamente un doble enlace en la cadena lateral, mientras que otros productos de oxidación de estigmasterol contienen un doble enlace en la estructura del anillo y uno en la cadena lateral.

No obstante, los métodos de detección en cromatografía líquida con los detectores comúnmente aplicados no destructivos, requieren la separación previa de los distintos óxidos de EV, y esto restringe la determinación de los diferentes óxidos en el mismo análisis. Sin embargo, en los alimentos y en los ingredientes de EV utilizados en alimentos, están presentes diferentes EV y por lo tanto, su oxidación conduce a mezclas complejas de productos de oxidación (Kemmo et al., 2008).

Kemmo et al. (2007) desarrollan un método HPLC-MS para la determinación de óxidos de estigmasterol y colesterol, así como sus hidroperóxidos. El espectrómetro de masas utilizado es un cuadrupolo de trampa iónica y aplican APCI, siendo este método mucho más sensible que el HPLC-UV-FL. Posteriormente Kemmo et al. (2008) aplican este mismo método (HPLC-APCI-MS) para la determinación de óxidos de β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y brassicasterol.

Señalar que en HPLC, la fase estacionaria utilizada es sílice, debido a su capacidad para separar los isómeros posicionales y epiméricos, cosa que, no es posible para las columnas de fase inversa (específicas para tamaño y grupo alquilo) (Kemmo et al., 2005). La fase móvil más utilizada es n-

heptano-isopropanol (Säynäjoki et al., 2003; Kemmo et al., 2005; Kemmo et al., 2007 y Kemmo et al., 2008).

La utilización de HPLC en el análisis de óxidos de EV se orienta, en los últimos años, hacia la identificación y determinación de productos de oxidación menos polares, polímeros o productos de mayor peso molecular. Los productos de oxidación derivados de hidroperóxidos predominan a temperaturas moderadas (≤ 100 °C), pero a temperaturas cercanas a 200 °C, los hidroperóxidos se descomponen al instante y las reacciones térmicas, tales como, deshidratación y condensación, se vuelven más importantes, formándose dímeros o polímeros de estos compuestos. (Lercker y Rodríguez-Estrada, 2002). Para el estudio de productos de oxidación terciarios (dímeros y polímeros) se han utilizado otras técnicas cromatográficas. Lampi et al. (2009) utilizan la cromatografía de alta resolución de exclusión molecular “High Pressure Size Exclusion Chromatography” (HPSEC) con detector de RI para el estudio de dímeros, polímeros y monómeros (POPs) de estigmasterol termo-oxidado. Los compuestos formados se separan previamente por SPE (de menor a mayor polaridad). Menéndez-Carreño et al. (2010) aplican el método de Lampi et al. (2009) para el estudio de óxidos de estigmasterol monoméricos, no polares o de polaridad media, mediante SPE separan estas fracciones, y con HPSEC separan los óxidos diméricos y poliméricos. La identificación y cuantificación de estos compuestos se realiza mediante GC-MS y GC(FID) respectivamente.

Struijs et al. (2010) estudian la formación de compuestos diméricos de estigmasterol durante la termo-oxidación, mediante la obtención previa de las distintas fracciones con SPE, utilizando la técnica de HPSEC con detector RI y separación con HPLC en fase reversa con detectores UV y ELSD. La identificación se lleva a cabo con distintos sistemas para evaluar

la masa molecular. Rudzinska et al. (2010) aplican el mismo método para la determinación de oligómeros (dímeros, trímeros y monómeros) de β -sitosterol durante la termo-oxidación, separan las fracciones por cromatografía de exclusión molecular “Size Exclusion Chromatography” (SEC) con detector ELSD e identifican los polímeros con HPLC-APCI-MS.

Para el estudio de la estructura química de los dímeros no polares de β -sitosterol formados durante la termo-oxidación, Sosinska et al. (2013) obtienen las distintas fracciones con HPSEC previa obtención de la fracción no polar en columna de gel de sílice. Utilizan distintos detectores: NMR, IR, Raman y APCI-MS. Posteriormente, el mismo grupo (Sosinska et al., 2014) estudian todos los dímeros de β -sitosterol formados durante la termo-oxidación; primero, en columna de gel de sílice, separan las fracciones no polares, de polaridad media y polares. Seguidamente, con HPSEC, aíslan en estas fracciones los dímeros a estudio. El análisis de los distintos dímeros lo realizan por HPLC en fase reversa y se identifican con MS, verificando las estructuras mediante NMR y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.

En la **figura n° 9** y **10** se detallan el esquema del diseño experimental realizado en la presente tesis doctoral y la difusión de resultados.

Figura nº 9 Esquema del diseño experimental.

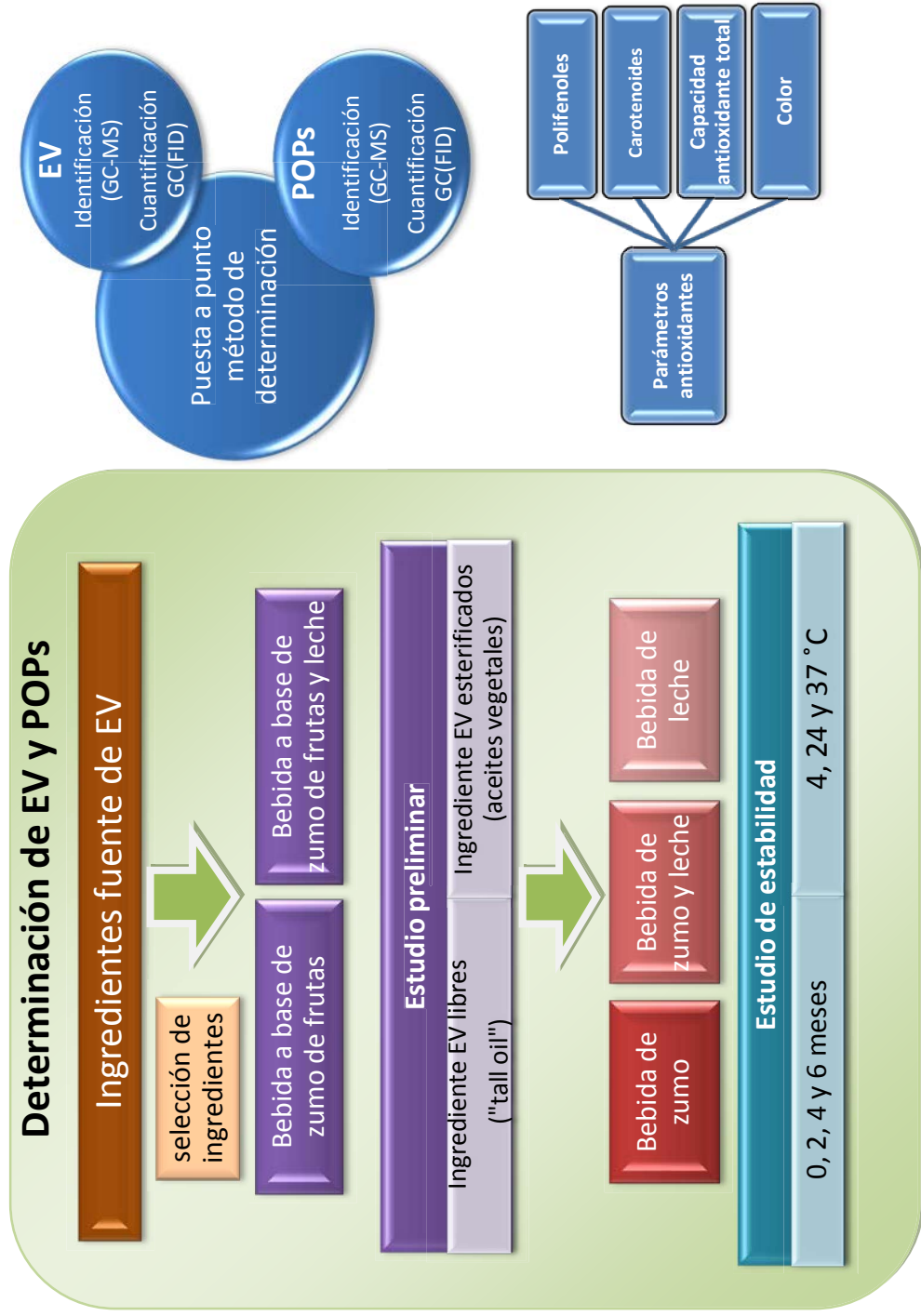
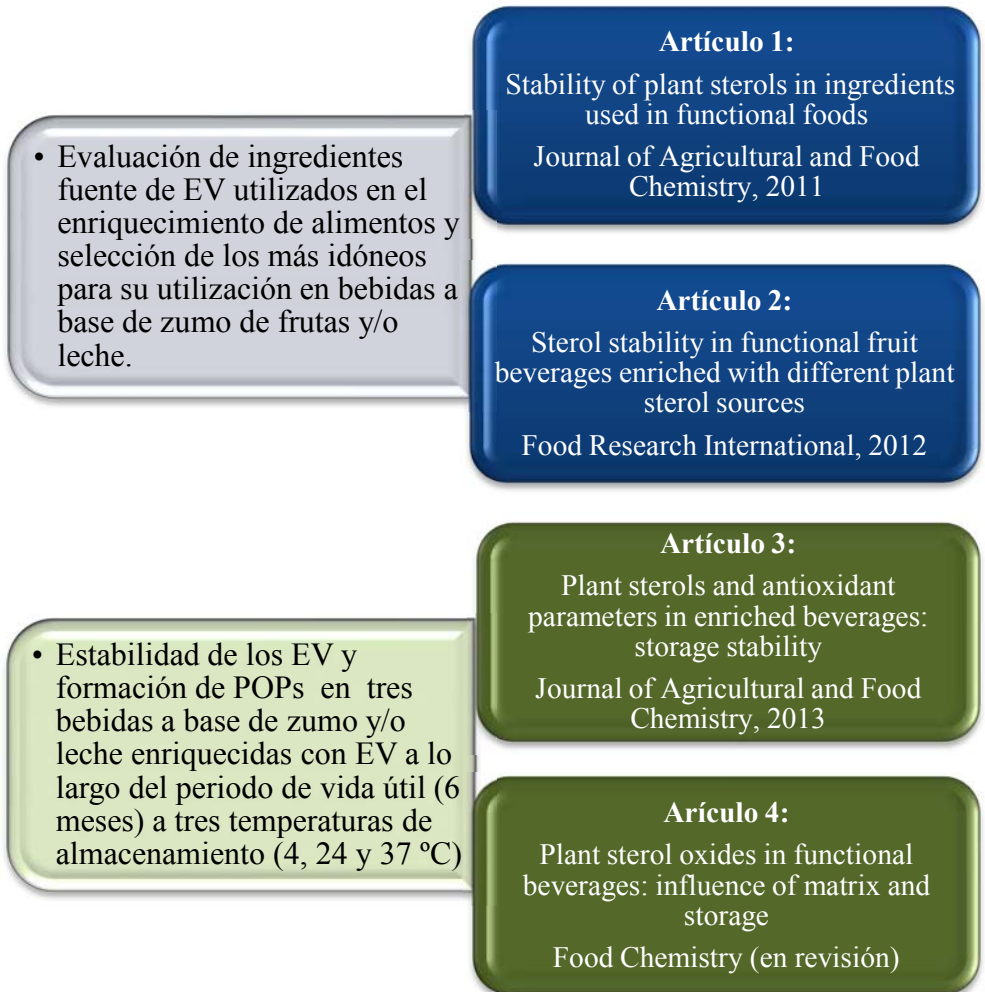



Figura nº 10. Difusión de resultados.



RESULTADOS



**Stability of Plant Sterols in
Ingredients Used in Functional
Foods**

Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011,
59, 3624–3631

Correction to Stability of Plant Sterols in Ingredients Used in
Functional Foods:

Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011,
59, 13365–13365

Stability of Plant Sterols in Ingredients Used in Functional Foods

Marina González-Larena,[†] Guadalupe García-Llatas,[†] M. Carmen Vidal,[†] Luis Manuel Sanchez-Siles,[‡] Reyes Barbera,[†] and María Jesus Lagarda*,[†]

[†]Nutrition and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain

[‡]Research & Development Department, Hero Institute for Nutrition, (Alcantarilla) Murcia, Spain

ABSTRACT

The content of plant sterol (PS) and their oxidation products (POPs) in eight ingredients used to enrich functional foods was studied. A gas chromatographic (GC) technique with mass-spectrometric detection was used for identification, while GC with a flame ionization detector (GC-FID) was used for quantification. β -Sitosterol was the most abundant phytosterol, and the main POPs found were derived from this compound (7R/ β -hydroxysitosterol, 7-ketositosterol, and sitostanetriol). The total amount of POPs found in the ingredients ranged from 29.03 to 110.02 $\mu\text{g}/100$ g PS. The β -sitosterol oxidation rates ranged from 10 to 50 μg β -sitosterol oxides/ 100 g of β -sitosterol. In view of this low rate of oxidation in the ingredients tested, it can be concluded that the PS remain stable in these ingredients. Significant correlations ($p < 0.01$) were found between total oxysitosterols versus β -sitosterol contents ($R^2 = 86.5\%$) and between total POPs and total PS ($R^2 = 81.6\%$).

KEYWORDS: *Plant sterol oxidation products, POPs, phytosterol stability, gas chromatography mass spectrometry, functional ingredients*

INTRODUCTION

Plant sterols (PS: phytosterols/-stanols) are natural constituents of plants and have many essential functions in plant cells, in a way similar to cholesterol (cholest-5-en-3 β -ol) in animal cells. Structurally, they are very similar to cholesterol but have a much lower intestinal absorption rate in humans. PS consumption (2 g/day) results in an approximately 9% reduction in LDL-cholesterol. PS also have beneficial effects upon other

lipid parameters (1). In the European Union, the use of PS and their esters in different food matrices is regulated by different Commission Decisions (2, 3). Recently, the European Commission authorized as a health claim that “plant sterols and plant stanol esters have been shown to lower/reduce blood cholesterol. High cholesterol is a risk factor in the development of coronary heart disease”(4).

A variety of commercial foods have been enriched with free or esterified PS, spreads being the first (and still the most common) commercial application of PS-enriched food. Like all unsaturated lipids, PS are liable to oxidation, giving rise to plant sterol oxidation products (POPs). To date, data on the biological effects of POPs are still scarce and sometimes contradictory. In some studies, no deleterious biological effects have been observed, with no reported POP genotoxicity. In other cases, however, POPs have been suggested to have cytotoxic effects, these being less severe than in the case of cholesterol oxidation products (COPs) (5).

The major sources of PS for current functional foods and dietary supplements are tall oil and vegetable oil deodorizer distillate. Tall oil is a byproduct of the Kraft pulping of wood to make paper and contains a mixture of PS. The latter are extracted from tall oil soap, a residue from the paper pulping process, or from tall oil pitch. Vegetable oil processing involves refining, one of the stages of which is deodorization. The lower molecular weight compounds are eliminated in the deodorizer distillate by-product fraction. Free sterols are a major component (15-30%) of the contents of the deodorizer distillate fraction (6).

Obtainment of the deodorizer distillate by conventional or physical refining involves high temperatures (180-220 and 240-250 °C,

respectively) (7), and separation of the sterol fraction from the distillate involves different processes that can reach temperatures ranging from 150 to 240 °C (8). Both conditions are favorable for POPs formation (9). POPs have been quantified in byproduct fractions from chemical refining and by-product distillate fractions from physical refining of edible fats and oils (limit of quantification 0.01 mg/100 g), for their use in animal feed formulations (10). However, industrial processing (chemical refining and deodorization) caused no increase in POPs of β -sitosterol ((24R)-ethylcholest-5-en-3 β -ol) in soybean oil at a detection level of 0.2 ppm (11), and no POPs (from β -sitosterol and campesterol [(24R)-methylcholest-5-en-3 β -ol]) were detected in rapeseed oil at a detection level of 1 μ g/g oil (12).

Contents of POPs in different crude and refined vegetable oils have been reported (9, 13-17). Once the PS are extracted, they are processed to be later incorporated into different food matrices. Therefore, PS storage, processing, and storage once PS are incorporated in different food matrices are stages susceptible for POPs formation. For this reason, PS ingredients manufacturers usually use a wide variety of delivery systems for the protection of the PS from degradation during processing and storage (18). Emulsion-based technologies and spray drying are currently the most common approaches employed for microencapsulation and delivery of functional lipophilic components into food (19).

To our knowledge, only one study has been published on the evaluation of the oxidation of PS in different vegetable oils added as microcrystalline PS suspensions prepared from wood-based fractions (16).

Because of the scant information available on POPs formation and contents in PS sources used for the enrichment of foods, and considering that different ingredients can be used as sources of PS, we designed the present study to identify and quantify the PS and their oxidation products in eight ingredients currently used for the enrichment of foods with PS.

MATERIALS AND METHODS

Samples: Eight commercially available ingredients containing PS were used for this study. They were presented as esterified or free plant sterols from different sources (pine, soybean, rapeseed, soybean, corn, and sunflower oils), and in different physical states (powder, oil paste, and liquid emulsion). A description of their composition and other characteristics is provided in **Table 1**.

Table 1. Ingredients Analyzed: Physical States, Composition, and characteristics Indicated by the Manufacturer

Ingredient	Source	Sterols purity (manufacturer)	Other compounds	Physical state
1	Soy (free sterols)	Min 25%	Malt dextrin, inulin, citric acid, preservatives	Liquid
2	Pine tree (tall-oil) (free sterols)	Min 25%	Malt dextrin, inulin, citric acid, preservatives	Liquid
3	Pine tree (tall-oil) (free sterols)	68-75%	Malt dextrin, inulin, sucrose ester	Powder
4	Soy (free sterols)	68-75%	Malt dextrin, inulin sucrose ester	Powder
5	Soybean, rapeseed, sunflower, corn oil (sterol esters)	43.9%	glucose syrup, sodium caseinate, tocopherol-rich extracts, ascorbyl palmitate, sodium ascorbate	Spray dry powder
6	Soybean, rapeseed, sunflower, corn oil (sterol esters)	86-92%	skimmed milk powder	Spray dry powder
7	Sunflower, tall-oils (free sterols)	12%	Emulsifier, stabilizer, preservatives	Soft, spreadable
8	Sunflower, tall-oils (free sterols)	30%	Antioxidants	Soft, spreadable

Chemicals: For the standards of PS, 5β -cholestan-3R-ol (epicoprostanol) (purity 95%) was used as internal standard (IS) in phytosterol determination, (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol (stigmasterol) (purity 95%), (24R)-ethylcholest-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) (purity 95%), and 24 α -ethyl-5 α -cholestan-3 β -ol (stigmastanol) (purity 97.4%) were from Sigma Chemical Co. [St. Louis, MO]. (24S)-Methylcholest-5,22-dien-3 β -ol (brassicasterol) (purity 98.6%) and (24R)-

methylcholest-5-en-3 β -ol (campesterol) (purity 98.6%) were purchased from Steraloids [Newport, RI], and (24R)-ethylcholest-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) (purity 60% β -sitosterol and 30% campesterol) was from Fluka [Buchs, Switzerland].

5 α -Cholest-5-en-3 β ,19-diol (19-hydroxycholesterol) (purity 95%) from Sigma Chemical Co. was used as IS in POPs determination. Cholest-5-ene-3 β ,7 α -diol (7 α -hydroxycholesterol) (purity 98.6%), cholest-5-ene-3 β ,7 β -diol (7 β -hydroxycholesterol) (purity 95%), 5 α ,6 α -epoxycholestan-3 β -ol (α -epoxycholesterol) (purity 80%), 5 β ,6 β -epoxycholestan-3 β -ol (β -epoxycholesterol) (purity 98%), and cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (cholestanetriol) (no purity information) from Sigma Chemical Co. were used as standards of COPs. (24S)-Ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-7-one (7-ketostigmasterol) (purity 98.6%) was from Steraloids.

All reagents were analytical grade. Chloroform, diethyl ether, methanol, anhydrous sodium sulfate, acetone, 2-propanol, and anhydrous pyridine were purchased from Merck & Co., Inc. [Whitehouse Station, NJ]. Potassium hydroxide was purchased from Poch, S.A. [Sowinskiego, Poland], potassium chloride was from Panreac [Barcelona, Spain], and n-hexane was from J.T. Baker [Deventer, The Netherlands]. The silylating reagents hexamethyldisilazane (HMDS) and trimethylchlorosilane (TMCS) were purchased from Fluka and Carlo Erba [Rodano, Italy], respectively. Ultrapure water was obtained by means of a Millipore Q water purification system [Milford, MA]. The Si-SPE (silica solid-phase extraction) cartridges (3 mL/500 mg) were purchased from Supelco [Bellefonte, PA]. Silica-gel thin-layer chromatography (TLC) plates (20

cm x 20 cm x 0.25 mm film thickness) were purchased from Merck & Co., Inc.

Determination of Plant Sterols: A weight of ingredient that yields approximately 30 mg of PS was taken. Saponification was performed according to the method described by Piironen et al. (20), with slight modifications. Briefly, IS was added (2000 μg of epicoprostanol) to the ingredient, and hot saponification (3 mL of 1NKOH in methanol 65 °C during 1 h) was performed. The nonsaponifiable material was extracted with diethyl ether. 1/10 of the unsaponifiable material was subjected to derivatization with HMDS/TMCS in anhydrous pyridine (2:1:5) for 20 min at 40 °C. The trimethylsilyl ether (TMSE) derivatives obtained were dissolved in n-hexane, filtrated using a Millipore [Milford, MA] syringe-driven Millex-FH (1 mL, 0.45 μm) filter unit, and evaporated with nitrogen. The TMSE derivatives were dissolved in 250 μL of n-hexane for chromatographic analysis. For quantification, 1 μL was injected in a GC-FID (AutoSystem XL, Perkin-Elmer [Nortwalk CT]) equipped with a CP-Sil 8 low bleed/MS (50 m x 0.25 mm x 0.25 μm film thickness) capillary column (Chrompack- Varian [Middelburg, The Netherlands]). The oven temperature was initially held at 280 °C for 20 min, raised to 290 at 0.7 °C/min, and held for 5 min, then raised to 320 °C at rate of 30 °C/min and held for 45 min. The carrier gas was hydrogen (0.7 mL/min). The temperature of both the injector port and the detector was 325 °C. A split ratio of 1:10 was applied. For PS identification, 1 μL was injected into a GC mass spectrometer (MS) (Trace GC-Ultra ITQ ion trap 900, Thermo Scientific [Waltham, MA]). Analysis was performed on a capillary TR-5 ms SGC capillary column (30 m x 0.25 mm id x 0.25 μm)

(Thermo Scientific), using hydrogen as the carrier gas (1 mL/min). The oven temperature was initially held at 250 °C for 1 min, raised to 280 at 0.8 °C/min, and raised to 310 at 5 °C/min and held for 5 min. The programmable temperature vaporization (PTV) injector was set at ballistic heating from 50 to 260 °C at a 1:10 split ratio. The filament emission current was 70 eV, the ion source temperature was 250 °C, and the scan range was 50-650 m/z.

For quantification, calibration curves of brassicasterol (9.86-59.16 µg), campesterol (98-553 µg), stigmasterol (9.5-99.75 µg), and β-sitosterol (703-2394 µg) containing 200 µg of IS (epicoprostanol) were performed.

Quantification of phytosterols was performed using the response factor calculated for stigmastanol versus epicoprostanol (IS).

Analytical Parameters: Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for phytosterol determination were calculated. The LOD was calculated as 3 times the standard deviation of the noise, and the LOQ as 10 times the standard deviation of the noise, expressed in quantity, by running five blanks subjected to the same derivatization procedure as the study samples.

The accuracy of the method was evaluated by recovery assays. The PS content of three aliquots of one ingredient and another three aliquots added with 59.16 µg of brassicasterol, 19.95 µg of stigmasterol, and 1596 µg of β-sitosterol standards (contents similar to those found in the ingredient) was determined. Recovery was calculated as:

$$\% \text{recovery} = \frac{\mu\text{g PS in spiked ingredients} - \mu\text{g PS in not spiked ingredients}}{\mu\text{g spiked PS}} \times 100$$

Precision was calculated as the relative standard deviation of three replicates of one ingredient.

Determination of Phytosterol Oxides: *POPs Obtained by Thermo-oxidation.* As standards of POPs are not commercially available, except for 7-ketostigmasterol, they were obtained by thermooxidation using the method described by Conchillo et al. (21) to identify POPs in the eight ingredients and to optimize the GC methods. Standard solutions: 1 mg/mL of β -sitosterol (purity 60%); 0.8 mg/mL campesterol; 1 mg/mL stigmasterol were prepared, and each of them was placed in a different Petri dish. After the solvent was evaporated with nitrogen, they were heated at 150 °C for 2 h in an oven.

POPs derived from thermooxidation of β -sitosterol were separated by silica gel (TLC) according to their degree of oxidation and compared to a mixture of commercial standards of COPs (21). The corresponding bands from different β -sitosterol oxides were extracted three times with chloroform.

The POPs obtained by thermooxidation from campesterol and stigmasterol were purified by SPE according to the method described by Guardiola et al. (22) Briefly, a 0.5 g silica cartridge was activated by 5 mL of n-hexane. The POPs obtained were dissolved in 100 μ L of n-hexane: diethyl ether (95:5 v/v) and loaded onto the column. Nonoxidized phytosterols were eluted with different mixtures of n-hexane:ether, and finally the POPs were eluted out of the cartridge with acetone.

The different TLC POP fractions from β -sitosterol, as well as the purified solutions from campesterol and stigmasterol, were subjected to silylation according to the same procedure applied to PS. The TMSE derivatives obtained were dissolved in 50 μ L of n-hexane, and 1 μ L was injected into a GC-FID using the same instrumental conditions as for PS, except that the last holding time at 320 $^{\circ}$ C was lengthened by 20 min.

One microliter was also injected into the GC-MS. Identification of the POPs obtained from the TLC fractions from β -sitosterol, as well as the SPE purified solutions from campesterol and stigmasterol, was performed on the basis of the resulting fragmentation patterns and retention times used in previous studies (23) consulted in the literature (13, 15, 24, 25), as well as from the TLC elution pattern of POPs according to Conchillo et al. (21) The relative retention times, precursor and product ions, and optimized energy collision of the POPs identified by GC-MS are summarized in **Table 2**.

Application to Ingredients: The procedure for POPs analysis was adapted from the method proposed by García-Llatas et al. (23), with minor modifications. A weight of ingredient that provides approximately 30 mg of PS was taken. IS (9.82 μ g of 19-hydroxycholesterol) was added to the sample. Cold saponification at room temperature, in darkness, and under continuous agitation in an orbital shaker (IKA KS26, Stauffen, Germany) at 150 rpm was performed (10 mL of 1 N KOH in methanol for 18-20 h). The unsaponifiable material was extracted with diethyl ether, and 1/2 of the unsaponifiable material was subjected to purification by silica SPE according to ref (22). POPs were eluted with acetone. The purified fraction was then subjected to silylation. The TMSE derivatives obtained were dissolved in 40 μ L of n-hexane, and 1 μ L was injected into

the GC-MS for identification and the GC-FID for quantification purposes. Identification of different oxides was performed as described before.

Table 2. Identification of Plant Sterol Oxides by GC-MS: Relative Retention Time (RRT), Precursor and Product Ions, and Optimized Collision Energy (CE)

Plant sterol oxides	RRT ^a	Precursor ion	CE	Product ions
β-Sitosterol				
7 α -hydroxy	1.168	484	2.9	470, 469, 379, 233
7 β -hydroxy	1.45	484	2.9	470, 469, 379, 233
α -epoxy	1.52	396	2	381, 367, 255, 213
β -epoxy	1.56	396	2	381, 367, 255, 213
triol	1.79	431	2.3	343, 341, 301
7-keto	1.95	500	3.2	483, 410, 395
Campesterol				
7 α -hydroxy	1.14	470	2.9	456, 455, 442
7 β -hydroxy	1.27	470	2.9	456, 455, 442
7-keto	1.73	486	3.3	485, 471, 470, 469, 381
Stigmasterol				
7 α -hydroxy	0.89	482	2.9	468, 467, 439, 327
7 β -hydroxyl	1.09	482	2.9	468, 467, 439, 327
α -epoxy	1.21	500	2.5	4381, 486, 485, 481, 456, 410
β -epoxy	1.23	500	2.5	485, 471, 457, 443, 410, 395, 410
7-keto	1.57	498	3	482, 409, 408, 394, 393

^a with respect to 19-hydroxycholesterol (IS), 19.7 min

Quantification of POPs was performed using the response factors calculated for their analogue COPs: 7 β -hydroxycholesterol for hydroxyphytosterols, α -epoxycholesterol for epoxyphytosterols, cholestanetriol for triol-derivatives, and 7-ketocholesterol for ketophytosterols. The response factor for 7-ketoestigmasterol was

calculated and compared to that calculated for 7-ketocholesterol, to confirm the response factors of COPs and POPs.

Analytical Parameters: The LOD and LOQ for phytosterol oxides were calculated.

The LOD was calculated as 3 times the standard deviation of the noise, and the LOQ as 10 times the standard deviation of the noise, expressed in quantity, by running five blanks subjected to the same derivatization procedure as the study samples.

The accuracy of the method was evaluated by recovery assays. Three aliquots of an ingredient were spiked with 2.08 μg of 7 β -hydroxycholesterol, 0.92 μg of α -epoxycholesterol, and 4.58 μg of 7-ketocholesterol standards (contents similar to those respective POPs found in the ingredient) were determined. Recovery was calculated as:

$$\% \text{Recovery} = \frac{\mu\text{g COPs in spiked ingredients}}{\mu\text{g spiked COPs}} \times 100$$

Precision was calculated as the relative standard deviation of three replicates.

Statistics: An ANOVA test ($p < 0.05$) was applied to total PS and individual PS contents among ingredients. The same evaluation was applied to total POPs and individual oxysterol contents among ingredients. When significant differences existed, a Tukey test was performed.

Regression analyses were made to evaluate the total POPs contents in ingredients versus total PS and total oxysterols versus β -sitosterol contents.

The Statgraphics Plus version 5.1 [Rockville, MD] statistical package was used throughout.

RESULTS AND DISCUSSION

Plant Sterols. *Quantification and Analytical Parameters.* Calibration curves and linear regression coefficients obtained for the different phytosterols, the response factors for phytosterols, and the analytical parameter results are reported in **Table 3**.

Accuracy, estimated by recovery assays and expressed in percentage as the mean \pm standard deviation of three replicates, was 125.41 ± 3.20 for brassicasterol, 114.82 ± 12.65 for stigmasterol, and 105.18 ± 19.34 for β -sitosterol.

The analytical parameters obtained showed that the method was useful for PS determination in the ingredients studied.

The PS contents from the ingredients analyzed are summarized in **Table 4**. The PS totals ranged from 13.06 to 86.4 g/100 g of ingredient. Significant differences ($p < 0.05$) were found in total PS contents among all ingredients (see **Table 4**). Phytosterol contents were detected at amounts always lower than the respective phytosterols. The content of total phytosterols matched that declared in the information provided by the manufacturer. All ingredients (see **Table 4**) complied with current legislation regarding PS percentages: $<80\%$ β -sitosterol, $<40\%$

campesterol, <30% stigmasterol, <3% brassicasterol, <15% sitostanol, <5% campestanol, <3% other sterols/stanols (2).

Table 3. Plant Sterols and Plant Sterol Oxides Determination: Quantification Method and Analytical Parameters^a

		Quantification ^a	LOD (ng in assay)	LOQ (ng in assay)	Precision ^b
Plant sterols	brassicasterol	y = 1.28x + 0.003 R ² = 0.9961	0.34	1.12	1.23
	campesterol	y = 1.313x + 0.002 R ² = 0.9993	0.45	1.51	1.36
	stigmasterol	y = 0.999x + 0.007 R ² = 0.9978	0.81	2.68	1.72
	β-sitosterol	y = 0.94x - 0.478 R ² = 0.9848	0.73	2.43	2.09
	sitostanol	1.12	0.59	1.97	1.79
	stigmastanol	1.12	0.81	2.68	1.84
	campestanol	1.12	1.83	6.09	1.15
Plant sterols oxides	7α-OH-S	1.14	4.99	16.62	9.19
	7β-OH-S	1.14	6.17	20.55	3.67
	Triol-S	2.58	0.81	2.68	2.48
	7-K-S	1.15	2.33	7.76	3.00
	7-K-C	1.15	3.12	10.40	24.60

7α-OH-S: 7α-hydroxysitosterol; 7β-OH-S: 7β-hydroxysitosterol; Triol-S: sitostanetriol; 7-K-S: 7-ketositosterol; 7-K-C: 7-ketocampesterol. ^a y = analyte area/IS area, x = analyte content (μg), R² = correlation coefficient². LOD= limit of detection. LOQ= limit of quantification. ^bExpressed as relative standard deviation of three replicates. ^cCorrespond to COPs.

Table 4. Plant Sterol Contents (g/100 g of Ingredient)^a

Ingredients	Brassicasterol	Campesterol	Campestanol	Stigmasterol	Stigmastanol	β-sitosterol	Sitostanol	Total PS
1	0.23±0.022 (1.02±0.007) ^a	5.91±0.561 (26.43±0.175) ^a	0.15±0.013 (0.65±0.008) ^a	6.61±0.621 (29.55±0.222) ^a	0.17±0.015 (0.75±0.007)	8.99±0.920 (40.19±0.035) ^a	0.32±0.118 (1.41±0.384) ^a	22.37±2.271
2	0.01±0.001 (0.06±0.002) ^b	1.88±0.200 (8.98±0.136) ^b	0.26±0.043 (1.22±0.145) ^b	0.16±0.014 (0.74±0.033) ^b	ND	15.97±1.746 (76.25±1.545) ^b	2.68±0.457 (12.75±1.513) ^b	20.94±2.263
3	0.03±0.001 (0.04±0.001) ^{b,c}	5.06±0.329 (7.13±0.007) ^c	0.85±0.067 (1.20±0.024) ^b	0.58±0.046 (0.82±0.023) ^b	ND	55.94±3.663 (78.86±0.120) ^c	8.48±0.583 (11.95±0.072) ^{b,c}	70.93±4.684
4	0.58±0.012 (0.85±0.008) ^d	17.02±0.373 (25.03±0.056) ^d	0.51±0.006 (0.76±0.014) ^a	17.86±0.361 (26.26±0.081) ^c	0.47±0.009 (0.69±0.012)	29.95±0.673 (44.03±0.169) ^d	1.63±0.029 (2.39±0.013) ^a	68.02±1.440
5	1.08±0.129 (2.41±0.071) ^e	7.71±0.998 (17.19±0.302) ^e	0.40±0.053 (0.89±0.013) ^c	0.61±0.040 (1.37±0.108) ^d	ND	31.17±4.732 (69.31±0.554) ^e	3.97±0.542 (8.83±0.068) ^d	44.93±6.491
6	1.73±0.026 (2.00±0.038) ^f	10.87±0.181 (12.58±0.117) ^f	0.90±0.020 (1.04±0.005) ^d	0.93±0.020 (1.08±0.008) ^e	ND	63.51±1.627 (73.50±0.171) ^f	8.47±0.175 (9.81±0.077) ^d	86.40±2.017
7	ND	0.95±0.131 (7.28±0.245) ^c	0.15±0.023 (1.15±0.038) ^b	0.11±0.012 (0.86±0.096) ^b	ND	10.42±1.954 (79.66±1.092) ^c	1.43±0.147 (11.04±0.761) ^c	13.06±2.261
8	0.01±0.001 (0.04±0.001) ^{b,c}	2.34±0.114 (7.30±0.086) ^c	0.37±0.016 (1.15±0.021) ^b	0.27±0.005 (0.85±0.050) ^b	ND	25.40±1.608 (79.25±0.182) ^c	3.66±0.214 (11.42±0.032) ^c	32.05±1.953

^a Values in parentheses are expressed as g/100 g of plant sterols. Values are expressed as mean ± standard deviation of three replicates. ND: not detected. Different letters, in the same column, indicate significant differences (p < 0.05).

The total content and profile of the PS ingredients differed according to the sample considered. When each PS was considered individually, significant differences ($p < 0.05$) were found among ingredients (see **Table 4**). β -Sitosterol was the most abundant phytosterol, followed by campesterol and stigmasterol. The highest contents (over 10-fold higher than other ingredients) of stigmasterol in ingredients 1 and 4 may be attributed to their origin: soybean oil (the only oil in their composition) (see **Table 1**). It has been indicated that the stigmasterol content in soybean oil is greater than that in other edible plant or vegetable oils (26, 27), although the content varies according to the soybean genotype involved (26).

Brassicasterol was the least abundant sterol in the analyzed ingredients. It has been suggested that in rapeseed oil (*Brassica* species) the content is higher than in other types of oils (26-28). This explains the high brassicasterol contents in ingredients 5 and 6 that have rapeseed oil in their composition.

It has been reported that on comparing tall oils versus vegetable oils, the former have higher sitostanol levels and lower stigmasterol and brassicasterol levels (29). This coincides with the ranges found in our ingredients: ingredients 2 and 3 (see **Table 1**), which entirely come from tall oil, and ingredients 7 and 8, which have tall oil in their composition, generally presented the lowest contents of brassicasterol and stigmasterol, and higher contents of sitostanol (see **Table 4**).

Phytosterol Oxides. *Quantification and Analytical Parameters.* The COPs response factors, together with the analytical parameters of POPs, are reported in **Table 3**. As expected, the response factor of 7-ketostigmasterol ($R_f = 1.12$) was similar to that of 7-ketocholesterol ($R_f = 1.15$).

The LOD and LOQ obtained allowed the quantification of POPs found in the ingredients, and they were lower than those obtained by other authors (in the order of 0.05 μg) (13, 30).

Accuracy, estimated by recovery assays and expressed in percentage as the mean \pm standard deviation of five replicates, was 116.27 ± 12.57 for 7 β -hydroxycholesterol, 114.26 ± 19.85 for α -epoxycholesterol, and 111.02 ± 2.49 for 7-ketocholesterol.

The identification of POPs was performed by GC-MS. 7 α -Hydroxysitosterol ((24R)-ethylcholest-5-ene-3 β ,7 α -diol), 7 β -hydroxysitosterol ((24R)-ethylcholest-5-ene-3 β ,7 β -diol), sitostanetriol ((24R)-ethylcholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol), and 7-ketositosterol ((24R)-ethylcholest-5-en-3 β -ol-7-one), among others, were identified in all ingredients. These POPs were also clearly separated by GC-FID in all ingredients, as shown in **Figure 1** (the peaks observed at 22.8 and 30.9 min correspond to silica compounds from the SPE step, as was confirmed by the corresponding blanks). In addition, 7-ketocampesterol ((24R)-methylcholest-5-en-3 β -ol-7-one) was identified only in ingredient 4, which was, besides ingredient 1, the ingredients with the highest campesterol content. The differences in the presence or not of 7-ketocampesterol between ingredients 1 and 4 could be attributed to the different efficacy of the delivery system (microencapsulated liquid emulsion in ingredient 1 vs microencapsulated powder in ingredient 4).

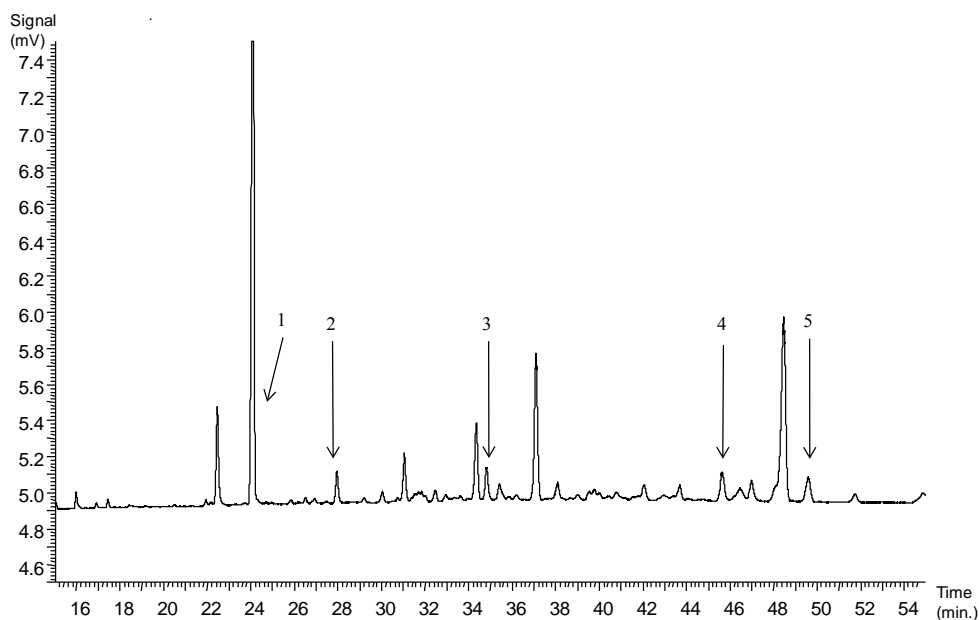


Figure 1. GC-FID chromatogram of POPs from ingredient number 3. The following POPs are identified: (1) 19-hydroxycholesterol (5α -cholest-5-en- 3β ,19-diol) (IS), (2) 7α -hydroxysitosterol ((24R)-ethylcholest-5-ene- 3β , 7α -diol), (3) 7β -hydroxysitosterol ((24R)-ethylcholest-5-ene- 3β , 7β -diol), (4) 6α -hydroxysitostanol ((24R)-ethylcholestane- 3β , 6α -diol), (5) sitostanetriol ((24R)-ethylcholestane- 3β , 5α , 6β -triol), and (6) 7-ketositosterol ((24R)-ethylcholest-5-en- 3β -ol-7-one).

In all of the ingredients, the following POPs were also identified: 6-hydroxysitosterol (retention time (RT) = 32.3 min); 25-hydroxysitosterol ((24R)-ethylcholest-5-ene- 3β ,25-diol) (RT = 35.5 min), 6α -hydroxysitostanol ((24R)-ethylcholestane- 3β , 6α -diol) (RT = 37 min), α/β epoxycampesterol ((24R)- $5\alpha/\beta$, $6\alpha/\beta$ -epoxy-24-methylcholestan- 3β -ol) (RT = 39.2 min), and α/β epoxysitosterol ((24R)- $5\alpha/\beta$, $6\alpha/\beta$ -epoxy-24-ethylcholestan- 3β -ol) (RT = 43.7 min). It should be noted that brassicasterol and stigmasterol oxides were not found in any ingredient.

POPs contents from the ingredients analyzed are shown in **Table 5**. The total amount of POPs found ranged from 1.70 to 27.12 mg/100 g of

ingredient or from 7.61 to 31.39 mg/100 g of PS. Regarding the total β -sitosterol oxide contents, significant differences ($p < 0.05$) were found among all ingredients, as indicated in **Table 5**.

Among the eight ingredients tested, the percentage of oxidized relative to total β -sitosterol was $< 0.046\%$. These oxidation percentages are of the same order as those reported by other authors (0-0.3% of oxidized β -sitosterol) when assaying a triplamitin matrix or rapeseed oil spiked with β -sitosterol free, esterified, or sitostanol standard. (14, 31) However, percentages are much lower than those published by Zhang et al. (15) in sunflower oil (2% of β -sitosterol oxidized), or those obtained by Grandgirard et al. (32), with 0.08% POPs in PS-enriched spread.

The identification and quantification of oxides of β -sitosterol (7 α/β hydroxy, α/β epoxy, and 7-keto) in microcrystalline phytosterol (from wood-based fractions) suspension in different fats/oils, stored at 4 °C during 12 months, have been evaluated by Soupas et al. (16), the recorded oxidation rates of β -sitosterol ranging between 0.01% and 0.05%. Thus, the formation of POPs did not seem to be a limiting factor for the manufacture and subsequent storage of these products.

From the results obtained (low rate of oxidation) in the ingredients tested, we can conclude that the PS remain stable in these ingredients.

When each oxysitosterol was considered individually and expressed as mg/100 g PS, significant differences ($p < 0.05$) were found among ingredients (**Table 5**).

Table 5. Phytosterol Oxidation Products (mg/100 g Ingredient)^a

Ingredients	7 α -hydroxystosterol	7 β -hydroxystosterol	7-ketocampesterol	Sitostanetriol	7-ketostosterol	Total POPs
1	0.87 \pm 0.153 (3.87 \pm 0.683) ^{ab}	0.09 \pm 0.045 (0.42 \pm 0.201) ^a	ND	0.35 \pm 0.057 (1.56 \pm 0.255) ^a	0.40 \pm 0.071 (1.77 \pm 0.317) ^a	1.70 \pm 0.164 (7.61 \pm 0.734) ^a
2	0.59 \pm 0.055 (2.81 \pm 0.258) ^{ac}	0.72 \pm 0.034 (3.41 \pm 0.161) ^b	ND	0.61 \pm 0.021 (2.87 \pm 0.099) ^b	0.96 \pm 0.142 (4.56 \pm 0.672) ^b	2.89 \pm 0.238 (13.66 \pm 1.128) ^b
3	1.22 \pm 0.140 (1.72 \pm 0.197) ^d	1.30 \pm 0.048 (1.83 \pm 0.067) ^c	ND	3.74 \pm 0.093 (5.27 \pm 0.131) ^c	1.58 \pm 0.160 (2.23 \pm 0.226) ^{ac}	7.84 \pm 0.404 (11.05 \pm 0.570) ^b
4	2.76 \pm 0.379 (4.06 \pm 0.558) ^{be}	1.73 \pm 0.341 (2.54 \pm 0.501) ^d	1.787 \pm 0.440 (2.628 \pm 0.646)	2.99 \pm 0.517 (4.39 \pm 0.760) ^d	6.39 \pm 1.298 (9.40 \pm 1.908) ^d	15.66 \pm 2.848 (23.02 \pm 4.187) ^c
5	0.96 \pm 0.115 (2.14 \pm 0.255) ^{cd}	0.58 \pm 0.052 (1.20 \pm 0.115) ^c	ND	1.90 \pm 0.136 (4.22 \pm 0.304) ^d	1.42 \pm 0.175 (3.16 \pm 0.389) ^c	4.86 \pm 0.070 (10.82 \pm 0.155) ^b
6	6.59 \pm 0.657 (7.63 \pm 0.760) ^f	5.78 \pm 0.262 (6.69 \pm 0.303) ^e	ND	4.63 \pm 0.396 (5.36 \pm 0.458) ^e	10.12 \pm 0.304 (11.71 \pm 0.352) ^e	27.12 \pm 0.644 (31.39 \pm 0.745) ^d
7	0.67 \pm 0.073 (5.10 \pm 0.556) ^e	0.61 \pm 0.103 (4.65 \pm 0.789) ^f	ND	0.58 \pm 0.044 (4.41 \pm 0.335) ^d	1.01 \pm 0.046 (7.69 \pm 0.352) ^f	2.86 \pm 0.210 (21.85 \pm 1.609) ^c
8	1.53 \pm 0.345 (4.77 \pm 1.078) ^{be}	1.59 \pm 0.079 (4.95 \pm 0.247) ^f	ND	1.41 \pm 0.068 (4.39 \pm 0.213) ^d	2.56 \pm 0.155 (8.00 \pm 0.485) ^f	7.08 \pm 0.505 (22.10 \pm 1.575) ^c

^a Values in parentheses are expressed as mg/100 g plant sterols. Values are expressed as mean \pm standard deviation of three replicates. ND: not detected. Different letters, in the same column, indicate significant differences ($p < 0.05$).

The large differences in total POPs contents and in the different oxide profiles found among the ingredients can be explained in terms of different obtainment processes, compositions, and physical states of the ingredients (powder, liquid) and the PS encapsulant materials, concentration, and chemical form (free or esterified to fatty acid). Because, these ingredients were acquired from different manufacturers, it is likely there were differences in the production processes used. In addition, we do not know whether they underwent storage before or after refining, or what the conditions of storage may have been. However, antioxidant presence does not seem to be related to lesser PS oxidation, because ingredients 5 and 8 present a high difference among them in POPs contents, ingredient 8 being one of the most oxidized samples (**Table 5**).

The main POPs found in the ingredients analyzed were derived from β -sitosterol ($7\alpha/\beta$ -hydroxysitosterol, 7-ketositosterol, and sitostanetriol). The presence of oxides originating only from β -sitosterol is attributed to the fact that it is the predominant sterol in all of the ingredients analyzed. Higher amounts of oxysitosterols have been detected in the refining of oils fractions, yielding greater amounts of β -sitosterol in comparison with the quantities of other sterols present (10).

A significant correlation ($p < 0.01$) was found between total oxysitosterols versus β -sitosterol contents according to a double inverse model: total POPs = $1/(7.36825 + 4118.44/\beta\text{-sitosterol})$, with correlation coefficient (R^2) = 86.5%. When total POPs and total PS are considered, significant correlation was also obtained ($p < 0.01$), the best adjustment corresponding to the exponential model ($R^2 = 81.6\%$): total POPs = $\exp(-6.40025 + 0.029054 \times \text{PS})$.

7-Keto and 7-hydroxy derivatives were present in higher amounts than triol derivatives from β -sitosterol. This oxidative behavior agrees with the observations of previous studies of vegetable oils (12). It has been suggested that in vegetable oils 7 α -hydroxy, 7 β -hydroxy, and 7-ketositosterol are the main oxides in the first stage of oxidation and start to decrease when other oxides are formed (17). This suggests that the eight ingredients tested are all in the first oxidation stage. Additional studies in different food matrices would be useful for studying the oxidation behavior of each ingredient.

Sitostanetriol was found to be present in similar amounts in ingredients 3-8, while in ingredients 1 and 2 it was less abundant. These contents do not seem to be related to the source of PS. Triol derivatives have been detected in by-product obtained from chemical or physical refining of edible fats and oils (10).

In ingredients 1 and 4 composed entirely of soy, 7 α -hydroxy, 7-keto, and triol were the main POPs, followed by 7 β -hydroxy. In the ingredients 5-8 that contain sunflower oil, 7-keto was the main POP, followed by 7 β -hydroxy and 7 α -hydroxy in similar amounts, except for ingredient 5, where the 7-hydroxy and 7-keto contents were lower and sitostanetriol was the most abundant. These profiles fall in the ranges found for sunflower oils (13, 15, 17, 24). A significant correlation ($p < 0.01$) between β -sitosterol and sitostanetriol contents was found according to a logarithmic model: $\text{Sitostanetriol} = -0.440782 + 1.40817 \times \ln(\beta\text{-sitosterol})$, with $R^2 = 59.8\%$.

All of the ingredients analyzed in our study had undergone a refining process. It has been shown that during the process of bleaching, 7-ketositosterol is generated from 7-hydroxysitosterol (24). The

deodorization does not appear to affect the total POP contents (33). In this same sense, Rudzinska et al. (34) reported that in degumming, neutralization and bleaching of rapeseed oil increase the POP contents, the predominant representatives being the 7β -hydroxy derivatives and α -epoxy derivatives. Subsequent storage of the refined oil appears to have less of an effect upon POPs content. Bortolomeazzi et al. (13) studied the influence of steps of the refining process on the stability of POPs contents from crude sunflower oil rich in POPs: in bleaching, the 7-keto derivative proved to be the most stable, whereas the $7\alpha/\beta$ -hydroxy derivatives were more stable on the deodorization step.

We have not detected epoxy derivatives in the ingredients analyzed. In sunflower oil, epoxy derivatives from β -sitosterol and campesterol were quantified by Dutta (24); however, Zhang et al. (17) did not observe any epoxy and triol derivatives in sunflower, soybean, and rapeseed oils. In tripalmitin spiked with 1% β -sitosterol, only epoxy derivatives were detected when free β -sitosterol was added (14).

Enrichment of foods with PS (saturated or unsaturated) is difficult, because PS are insoluble in water and only poorly soluble in dietary fats. Esterification of PS with fatty acids increases their lipid solubility in the fat phase of foods (16). In our samples, only ingredient 5 contains esterified PS and constitutes one of the samples with the lowest oxidation rate (10.8 mg POPs/100 g PS) (**Table 5**). Ingredients 5 and 6, which come from the same PS source, have the same physical state but differ in PS esterification (**Table 1**); they have very different oxidation levels, oxidation being lower for esterified PS (ingredient 5). In this same sense, Soupas et al. (14) found a lower proportion of POPs in esterified

phytosterols added to tripalmitin matrix than when free phytosterols are used for tripalmitin enrichment.

In conclusion, in view of the low content of POPs in the analyzed ingredients, we see that the PS remain stable in the samples. It should be noted that the PS source ingredients for food enrichment can have different origins, with different obtainment methods and storage conditions. These variables are not always known; as a result, we consider it of interest to evaluate the oxidation state of PS present in the ingredients used by the food industry as a source of PS for food enrichment.

ABBREVIATIONS USED

ANOVA, analysis of variance; COPs, cholesterol oxidation products; EU, European Union; GC, gas chromatographic; GC-FID, gas chromatography flame ionization detector; GC-MS, gas chromatography mass spectrum detector; HMDS, hexamethyldisilazane; IS, internal standard; LDL-cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol; LOD, limits of detection; LOQ, limits of quantification; POPs, plant sterol oxidation products; PS, plant sterols; PTV injector, programmable temperature vaporization injector; R^2 , correlation coefficient²; Rf, response factor; RT, retention time; Si-SPE, silica solidphase extraction; TLC, thin-layer chromatography; TMCS, trimethylchlorosilane; TMSE, trimethylsilyl ether.

REFERENCES

1. Hernández-Mijares, A.; Bañuls, C.; Rocha, M.; Morillas, C.; Martínez-Triguero, M. L.; Víctor, V.M.; Lacomba, R.; Alegría, A.; Barberá, R.; Farré, R.; Lagarda, M.J. Effects of phytosterol ester-enriched low-fat milk on serum lipoprotein profile in mildly hypercholesterolaemic patients are not related to dietary cholesterol or saturated fat intake. *Brit. J. Nutr.* **2010**, *11*, 1-8.
2. Commission Decision of 31 March **2004** authorizing the placing on the market of yellow fat spreads, milk based fruit drinks, yoghurt type products and cheese type products with added phytosterols/phytostanols as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the *European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Communities* L105 49 - 51, (14.04.2004) Decision 2004/336/EC.
3. Commission Regulation (EU) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. *Official Journal of the European Communities* L 43, 1–7.
4. Commission Regulation (EU) No 384/2010 of 5 May 2010 on the authorisation and refusal of authorisation of certain health claims made on foods and referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. *Official Journal of the European Communities* L113, 6-10.

5. Ryan, E.; McCarthy, F.O.; Maguire, A.R.; O'Brien, N. M. Phytosterol oxidation products: Their formation, occurrence, and biological effects. *Food Rev. Int.* **2009**, *25*, 157–174.
6. Moreau, R. A. Plant Sterols in Functional Food. In *Phytosterols As Functional Food Components and Nutraceuticals*; Dutta, C.; Marcel Dekker Inc.: New York, NY, 2004; 317-345.
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization joint expert consultation. Processing and refining edible oils. In *Fats and oils in human nutrition*. Rome, *FAO Food and Nutrition Papers*. **1994**, *53*, 202-205.
8. Sumner, C.E.; Bernicki, S.D.; Dolfi, M.D. Process of the production of sterol and tocopherol concentrates. **1995**. US Patent 5424457A.
9. Soupas, L.; Juntunen, L.; Lampi, A.-M.; Piironen, V. Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. *J. Agr. Food Chem.* **2004**, *52*, 6485-6491.
10. Ubhayasekera, S. J. K. A.; Dutta, P.C. Sterols and oxidized sterols in feed ingredients obtained from chemical and physical refining processes of fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, *86*, 595-604.
11. Nourooz-Zadeh, J.; Appelqvist, L.A. Isolation and quantitative determination of sterol oxides in plant-based foods: soybean oil and wheat flour. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 288–293.

12. Lampi, A.-M.; Juntunen, L.; Toivo, J.; Piironen, V. Determination of thermo-oxidation products of plant sterols. *J. Chromatogr. B.* **2002**, *777*, 83-92.
13. Bortolomeazzi, R.; Cordaro, F.; Pizzale, L.; Conte, L. S. Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining. *J. Agr. Food Chem.* **2003**, *51*, 2394-2401.
14. Soupas, L.; Huikko, L.; Lampi, A.-M.; Piironen, V. Esterification affects phytosterol oxidation. *J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, *107*, 107-118.
15. Zhang, X.; Julien-David, D.; Miesch, M.; Geoffroy, P.; Raul, F.; Roussi, S.; Aoudé-Werner, D.; Marchioni, E. Identification and quantitative analysis of β -sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids.* **2005**, *70*, 896–906.
16. Soupas, L.; Huikko, L.; Lampi, A.-M.; Piironen, V. Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *222*, 266-273.
17. Zhang, X.; Julien-David, D.; Miesch, M., Raul, F.; Geoffroy, P.; Aoude-Werner, D.; Ennahar, S.; Marchioni, E. Quantitative analysis of β -sitosterol oxides induced in vegetable oils by natural sunlight; artificially generated light; and irradiation. *J. Agr. Food Chem.* **2006**, *54*, 5410–5415.
18. McClements, D.J.; Decker, E.A; Weiss, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components, *J. Food Sci.* **2007**, *72*, 109-124.

19. Sanguansri L.; Augustin MA. Microencapsulation in functional food development. In: *Functional Food Product Development*; Smith J, Charter E. Inc.: Wiley-Blackwell Publishing. 2010; 1-23.
20. Piironen, V.; Toivo, J.; Lampi, AM. Natural sources of dietary plant sterols. *J. Food Compos. Anal.* **2000**, *13*, 619-624.
21. Conchillo, A.; Cercaci, L.; Ansorena, D.; Rodríguez-Estrada, M.T.; Lercker, G.; Astiasarán, I. Levels of phytosterol oxides in enriched and nonenriched spreads: Application of a thin-layer chromatography-gas chromatography methodology. *J. Agr. Food Chem.* **2005**, *53*, 7844-7850.
22. Guardiola, F.; Codony, R.; Rafecas, M.; Boatella, J. Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *J. Chromatogr. A.* **1995**, *705*, 289-304.
23. García-Llatas, G.; Cercaci, L.; Rodríguez-Estrada, M.T.; Lagarda, M.J.; Farré, R.; Lercker, G. Sterol oxidation in ready-to-eat infant foods during storage. *J. Agr. Food Chem.* **2008**, *56*, 469-475.
24. Dutta, P. C. Studies on phytosterol oxides. II: Content in some vegetable oils and in French fries prepared in these oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 659-666.
25. Soupas, L.; Juntunen, L.; Säynäjoki, S.; Lampi, A.-M.; Piironen, V. GC-MS method for characterization and quantification of sitostanol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2004**, *81*, 135-141.

26. Phillips, K M.; Ruggio, D. M; Toivo, J. I.; Swank, M.A.; Simpkins A. H. Free and Esterified sterol composition of edible oils and fats. *J. Food Compos. Anal.* **2002**, *15*, 123-142.
27. Piironen, V.; Lindsay, D.G.; Miettinen, T.A.; Toivo, J.; Lampi, A.-M. Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 939-966.
28. Schwartz, H.; Ollilainen, V.; Piironen, V.; Lampi, A-M. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21*, 152-161.
29. Cantrill R.; Kawamura Y. Phytosterols, phytostanols and their esters. Chemical and technical assessment (CTA) for the 69th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). **2008**
30. Johnsson, L.; Dutta, P.C. Determination of phytosterol oxides in some food products by using an optimized transesterification method. *Food Chem.* **2006**, *97*, 606–613.
31. Soupas, L.; Huikko, L.; Lampi, A.-M.; Piironen, V. Pan-frying may induce phytosterol oxidation. *Food Chem.* **2007**, *101*, 287-297.
32. Grandgirard, A.; Martine, L.; Joffre, C.; Juaneda, P.; Berdeaux, O. Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxycholesterol derivatives -application to a phytosterol-enriched food. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1040*, 239–250.
33. Lambelet, P.; Grandgirard, A.; Gregoire, S.; Juaneda, P.; Sebedio, G.L.; Bertoli, C. *Formation of modified fatty acids and oxyphytosterols*

during refining of low erucic acid rapeseed oil. *J. Agr. Food Chem.* **2003**, *51*, 4284-4290.

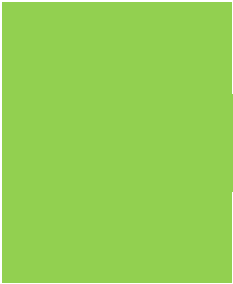
34. Rudzińska, M.; Uchman, W.; Wasowicz, E. Plant sterols in food technology. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2005**, *4*, 147-156.

Funding Sources

This study was financed by AGL2008-02591-C02-01 (CICYTFEDER) and was partially supported by Consolider Ingenio 2010, CSD2007-00063 (Fun-C-Food).

ACKNOWLEDGMENT

We thank Hero España S.A. for providing the samples. M.G.-L. is holder of a grant from Instituto Danone.



**Sterol stability in functional fruit
beverages enriched with different
plantsterol sources**

Food Research International 48 (2012) 265–270

Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources

Laia Alemany-Costa^{a†}, Marina González-Larena^{a†}, Guadalupe García-Llatas^{a*}, Amparo Alegría^a, Reyes Barberá^a, Luis Manuel Sánchez-Siles^b,
María Jesús Lagarda^a

^a Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Burjassot, Spain

^b Research and Development Department, Hero Institute for Nutrition, Alcantarilla, Murcia, Spain

†Both authors have contributed equally to the study, and thus may be regarded as first author.

ABSTRACT

Two different plant sterol (PS) sources (free PS from tall oil and esterified PS from vegetable oils) were used for manufacturing two types of functional beverages (fruit and milk-based fruit beverages), and their PS and phytosterol oxidation product (POP) contents were determined. Gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) was used for identification and gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) for quantitation purposes. Brassicasterol, campesterol, campestanol, stigmasterol, β -sitosterol and sitostanol were the quantified PS, conforming a profile in order with current legislation. The relative percentages of PS differed according to the enrichment source involved, though the enrichment levels (g/100 g beverage) were of the same order (1.77 from tall oil and 1.84 from vegetable oils). Only POPs from β -sitosterol (the prevalent PS in the analyzed beverages) were detected - the predominant representative being 7 β -hydroxysitosterol (39-58.5% of total POPs content). The following POPs were quantified: 7 α -hydroxy, β -epoxy, α -epoxy, and 7-ketositosterol, yielding a total POPs content ranging between 42.9-57.4 mg/100 g of PS. No statistically significant differences ($p > 0.05$) in total and individual POPs content according to the source of PS were found. The mean β -sitosterol oxidation percentage was $< 0.07\%$, which reflected a low PS oxidation extent, though manufacture was on a laboratory scale regardless of the PS source used in enrichment of the functional beverages. These functional drinks therefore can be regarded as healthy food products and as an adequate PS vehicle as well.

KEYWORDS: *Plant sterols; phytosterol oxidation products, gas chromatography, phytosterol stability, sterol oxidation; functional foods.*

INTRODUCTION

Consumption of foods enriched with plant sterols (PS) (including phytosterols and phytostanols) may help reduce low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels. PS consumption (2 g/day) results in a cholesterol reduction of approximately 9%, exerts beneficial effects upon other lipid variables and, in addition, PS have been described as anti-inflammatory and anti-cancer compounds (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011; Hernández-Mijares, Bañuls, Rocha, Morillas, Martínez-Triguero, Víctor, Lacomba, Alegría, Barberá, Farré, & Lagarda, 2010; Marangoni & Poli, 2010).

Plant sterols intake with the diet ranges from 150-440 mg/day, and can reach 1 g/day in vegans (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). Since the diet alone is unable to offer the effective intake required to deliver the health benefits of PS, a large variety of commercial foods have been enriched with free or esterified PS, including spreads, which were the first commercial applications of PS-enriched foods. Since the approval of spreads in the European Union (EU), several more approvals have been issued for the addition of phytosterol to other food categories such as milk-based fruit beverages (European Food Safety Authority, 2008). This kind of enrichment is a convenient and alternative way for consumers to obtain the daily recommended amount of PS for subjects with moderate hypercholesterolemia. In effect, these products can be regarded as healthy staple foods, since skimmed milk can be used for their formulation – thereby replacing milk fat with unsaturated fatty acids

used in PS esterification. Furthermore, fruit juices can provide vitamins and antioxidants as well (Normen & Frohlich, 2004).

The main sources of PS for current functional foods and dietary supplements are tall oil, a by-product of the wood pulp industry, and vegetable oil deodorizer distillate. Tall oil contains a mixture of free and esterified PS in a proportion of less than 15%, whereas free sterols are a major component (15-30%) of the deodorizer distillate fraction obtained from refining plant or vegetable oils (Fernandes & Cabral, 2007; Moreau, 2004).

Like all unsaturated lipids, phytosterols are liable to oxidation, giving rise to a family of compounds termed oxyphytosterols or phytosterol oxidation products (POPs), which are structurally similar to cholesterol oxidation products (COPs) (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). While the negative biological effects of COPs have been extensively studied, and these compounds are now known to be implicated in the initiation and progression of major chronic diseases (atherosclerosis, neurodegenerative processes, diabetes, among others), the biological effects of POPs are still unclear and contradictory (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011; Hovenkamp, et al., 2008; Otaegui-Arrazola, Menéndez-Carreño, Ansorena, & Astiasarán, 2010; Ryan, McCarthy, Maguire, & O'Brien, 2009). As has been recently reported, the presence of POPs in enriched foods may come from the PS source used for enrichment (González-Larena, García-Llatas, Vidal, Sánchez-Siles, Barberá, & Lagarda, 2011). Accordingly, several factors may contribute to their formation: the high temperatures involved in obtaining PS (Moreau, 2004), the different food characteristics (Ryan, et al., 2009), and the processing conditions employed after the addition of these

functional ingredients to different food matrices (Menéndez-Carreño, Ansorena, & Astiasarán, 2008; Soupas, Huikko, & Lampi, 2006).

Plant sterol content has been determined in several milk beverages enriched with free or esterified PS (Laakso, 2005; Menéndez-Carreño, et al., 2008; Saraiva, Castilho, Martins, Noronha da Silveira, & Ramos, 2011; Soupas et al., 2006), and in orange juices fortified with sterol esters (Mezine, Zhang, Macku, & Lijana, 2003) and with a sterol concentrate (Clement, Hansen, Costin, & Perri, 2010). However, few studies to date have identified and quantified POPs in other foods, and the existing publications mostly focus on high lipid content matrixes (Bortolomeazzi, Cordano, Pizzale, & Conte, 2003; Dutta, 2002; Soupas, Huikko, Lampi, & Piironen 2007). In the case of dairy matrixes, 7-ketosterol contents have been determined as an indicator of phytosterol oxidation in milk-based infant foods (Zunin, Calcagno, & Evangelisti, 1998), and several POPs have been quantified in milk- and cereal-based infant foods (García-Llatas et al., 2008). Plant sterol stability in enriched dairy products was determined for the first time by Soupas et al. (2006), who reported POP contents in skimmed milk enriched with free or esterified PS. More recently, phytosterol oxides have been analyzed in commercial low-fat milk enriched with esterified phytosterols (Menéndez-Carreño et al., 2008).

To the best of our knowledge, no studies have been made to identify and quantify POPs in milk-based fruit beverages and fruit beverages, and since the biological effects of POPs are still unclear, the present study was designed to identify and quantify PS and POPs in such functional beverages enriched with free or esterified PS of different

origins, with a view to confirming that these beverages are adequate PS vehicles.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents

Standards: 5 β -Cholestan-3 α -ol (epicoprostanol) (purity: \geq 95%) used as internal standard (IS) in PS determination, (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3-ol (stigmasterol) (purity: 95%), (24R)-ethylcholest-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) (purity: 95%), 24 α -ethyl-5 α -cholestan-3 β -ol (stigmastanol) (purity: 97.4%), cholest-5-ene-3 β ,7 β -diol (7 β -hydroxycholesterol) (purity: 95%), 5 β ,6 β -epoxycholestan-3 β -ol (β -epoxycholesterol) (purity: 98%) and cholest-5-en-3 β -ol-7-one (7-ketcholesterol) (purity: 90%), were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Cholest-5-ene-3 β ,19-diol (19-hydroxycholesterol) (purity: 95%) used as IS in POPs determination, cholest-5-ene-3 β ,7 α -diol (7 α -hydroxycholesterol) (purity: 98.6%), (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-7-one (7-ketostigmasterol) (purity: 98.6%) and (24R)-methylcholest-5-en-3-ol (campesterol) (purity: 98.6%) were purchased from Steraloids (Newport, RI, USA). (24R)-ethylcholest-5-en-3 β -ol (β -sitosterol, for POPs obtention by thermo-oxidation) (purity: 78.7% β -sitosterol, with campesterol and sitostanol traces) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland).

Chloroform, diethyl ether, methanol, anhydrous sodium sulfate, acetone, 2-propanol, and anhydrous pyridine were purchased from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA). Potassium hydroxide (KOH) was from Poch, S.A. (Sowinskiego, Poland), potassium chloride (KCl) from Panreac (Barcelona, Spain), butylhydroxytoluene (BHT) from

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), and hexane from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Silylating reagents: hexamethyldisilazane (HMDS) was from Fluka (Buchs, Switzerland), and trimethylchlorosilane (TMCS) from Carlo Erba (Rodano, Italy). All reagents were analytical grade. Ultrapure water was obtained by means of a Millipore Q water purification system (Milford, MA, USA).

Table 1. Fruit beverages: nutritional information and physicochemical characteristics per 100 mL.

	FbA	FbMA	FbB	FbMB
Energetic valor (KJ/Kcal)	340/80	304/72	354/83	311/73
Proteins (g)	0.3	2.7	0.3	2.7
Carbohydrates (g)	19.5	14.3	20.3	14.7
Lipids (g)	0.1	0.4	0.1	0.4
° Brix (20 °C)	21.0	18.2	21.9	18.7
Ascor	30.0	30.0	30.0	30.0
Citric acid (g)	1.3	1.2	1.3	1.2
PS source	Free PS from tall oil		Esterified PS from soybean, rapeseed, sunflower and corn oil	

2.2. Samples

Two fruit beverages (Fb) and twomilk-based fruit beverages (MFb) were enriched with similar PS concentrations (1.7 g PS/100 g of beverage), using two different ingredients as source of PS (A: free PS from tall oil, and B: esterified PS from soybean, rapeseed, sunflower and corn oils). Since PS are insoluble in water, both ingredients were presented in microencapsulated powder form suitable for use in lowfat beverages. Due to the different matrix characteristics, the products were

made by two distinct processes in the Pilot Plant of the Hero Global Technology Center located in Alcantarilla (Murcia, Spain), at laboratory scale. Briefly, Fb were made by mixing the microencapsulated PS with the fruit juices using high-speed mixing equipment at 27,000 rpm (Polytron PT2000, Kinematica AC, Switzerland), two-step homogenization (GEA Niro Soavi S.p.A, Italy) at 150 bars (100+50), pasteurization at 90 °C during 30 s and hot filling (at 80 °C) in 100 mL plastic bottles. These samples contained concentrated tangerine juice, water, banana puree, grape concentrate and banana flavor. MFb were manufactured in a way similar to Fb, except that the milk was previously acidified with part of the fruit juices and stabilized with a high-methoxyl pectin in order to prevent protein flocculation. MFb contained reconstituted skimmed milk, concentrated tangerine juice, stabilizer (pectin) and aromas. The total PS concentrations were 1.773 g PS/100 g beverage and 1.842 g PS/100 g beverage for samples enriched with sources A and B, respectively. The nutritional information and physicochemical characteristics of the samples are detailed in **Table 1**.

2.3. Determination of plant sterols

Lipids were extracted according to the procedure of Boselli, Velazco, Caboni, & Lercker (2001). A weight of sample providing approximately 60 mg of PS was taken. Lipids were extracted with 40 mL of a chloroform: methanol (1:1, v/v) mixture containing 0.05% of BHT (as antioxidant to avoid POPs artifact formation during saponification) and homogenized with a Polytron homogenizer (PT 2000, Kinematica AC, Switzerland) during 3 min at 250 W. After adding 20 mL of chloroform and mixing again with the Polytron, the sample was filtered

(Whatman no. 1, 90 mm, Maidstone, England) through a Buchner funnel. To the filtrate, 10 mL of 1M KCl solution was added and refrigerated overnight. Then, after phase separation, the chloroform phase was concentrated in a rotary evaporator and dried with nitrogen.

The lipid fraction obtained (75 mg approximately) was processed by the method described by González-Larena et al. (2011). Briefly, IS (2 mg of epicoprostanol) was added to the lipid fraction and hot saponification (3 mL of 1N KOH in methanol at 65 °C during 1 h) was performed. The unsaponifiable material was then extracted with diethyl ether. A fraction of the unsaponifiable material (1/10) was subjected to derivatization with HMDS/TMCS in anhydrous pyridine (2:1:5). The trimethylsilyl ether (TMSE) derivatives obtained were dissolved in hexane, filtrated (syringe-driven Millex-FH filter unit, 1 mL, 0.45 µm Millipore, Milford, MA, USA), and evaporated with nitrogen. The TMSE derivatives, dissolved in 250 µL of n-hexane, were analyzed by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) for identification and quantification purposes. One 1 µL was injected in a GC-FID (AutoSystem XL, Perkin-Elmer, Nortwalk, CT, USA) equipped with a CP-Sil 8 low bleed/MS (50 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness) capillary column (Chrompack-Varian, Middelburg, The Netherlands). The oven was initially programmed at 280°C maintained during 20 min, heated to 290 °C at a rate of 0.7 °C/min, and kept during 5 min, then raised to 320 °C at rate of 30 °C/min. Finally, this temperature was maintained during 45 min. The carrier gas was hydrogen (0.7 mL/min). The temperature of both the injector port and the detector was 325 °C, and a split ratio of 1:10 was applied. PS were identified by comparing their retention times with those of the standards derivatized by the same

procedure as the samples. For quantification, phytosterol calibration curves of brassicasterol (9.9 - 59.2 μg), campesterol (98.6 - 550.2 μg), stigmasterol (9.5 - 99.8 μg) and β -sitosterol (700.6 - 2398.8 μg) containing 200 μg of IS (epicoprostanol) were performed. The linear determination coefficients (R^2) obtained for the different phytosterols were > 0.989 . Quantification of phytostanols (campestanol and sitostanol) was performed using the response factor ($R_f = 0.879$) calculated for stigmasterol standard (the only commercially available phytostanol) versus epicoprostanol (IS).

2.4. Determination of phytosterol oxidation products

Standards of POPs are not commercially available, except for 7-ketostigmasterol. Therefore, for the identification of POPs in beverages, mixtures of β -sitosterol, campesterol and stigmasterol oxides were thermo-oxidized and identified by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) (González-Larena et al., 2011). Their collision energies were optimized and the identifying parameters for each phytosterol oxide were obtained as reported elsewhere.

For POPs determination in the samples, lipids were extracted with the same procedure as for PS (see section 2.3). With the lipid fraction obtained, we applied the method of González-Larena et al. (2011). Briefly, IS (9.82 μg of 19-hydroxycholesterol) was added to the extracted lipids. Cold saponification was performed at room temperature with 10 mL of methanolic 1N KOH, in darkness and under continuous agitation in an orbital shaker (IKA KS26, Stauffen, Germany) at 150 rpm during 18-20 h. The unsaponifiable material was extracted with diethyl ether. A fraction (1/2) of the unsaponifiable material was purified by SPE. The

acetone fraction obtained was then subjected to derivatization by silylation, using the method described for PS (see section 2.3). The TMSE derivatives obtained were dissolved in 40 μL of hexane, and 1 μL was injected into GC-MS/MS for identification and GC-FID for quantification purposes. The GC-FID instrumental conditions were the same as for PS, except that the last holding time at 320 $^{\circ}\text{C}$ was lengthened by 20 min.

Quantification of POPs was performed by comparing the peak areas of the IS (19-hydroxycholesterol) and their analog COPs, with calculation of the Rf: 7 β -hydroxycholesterol (Rf = 1.14) for hydroxyphytosterols, β -epoxycholesterol (Rf = 0.72) for epoxyphytosterols, and 7-ketocholesterol (Rf = 1.15) for ketophytosterols. The Rf for 7-ketostigmasterol (1.12) was calculated and compared with that calculated for 7-ketocholesterol, to confirm the Rf values of the COPs with respect to the POPs.

3. STATISTICAL ANALYSIS

An ANOVA test ($p < 0.05$) was applied to total PS or POPs and individual PS or POPs contents to evaluate possible differences according to the PS enrichment source and type of sample involved. The Statgraphics Plus version 5.1 (Rockville, MD, USA) statistical package was used throughout.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Determination of plant sterols

In the beverages subjected to study, the phytosterols campesterol, stigmasterol and β -sitosterol, and the phytosterols campestanol and sitostanol, were identified and quantified. In the MFbB and FbB samples (enriched with the source of esterified sterols), brassicasterol was also detected. As an example, **Fig. 1** shows a GC-FID chromatogram of the PS in the MFbB sample.

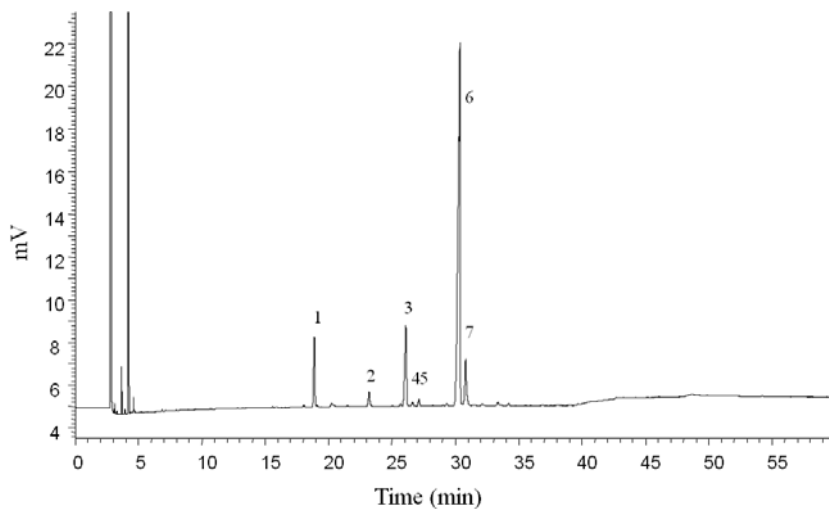


Fig. 1. Plant sterol determination by GC-FID in milk-based fruit beverage (MFbB). 1: epicoprostanol (IS), 2: brassicasterol, 3: campesterol, 4: campestanol, 5: stigmasterol, 6: β -sitosterol, and 7: sitostanol.

The PS contents of the analyzed beverages are summarized in **Table 2**. The PS totals ranged from 1.28-1.93 g/100 g of sample. The total PS contents of the beverages enriched with free PS (MFbA and FbA) were of the same order (1.34 g/100 g of sample) and 21.4% and 27.7% lower than the theoretical formulation (1.77 g PS/100 g beverage), respectively. The PS content of the MFbB and FbB samples (1.68 g/100 g sample) was higher than in A samples and more similar to the

theoretical formulation specifications (1.84 g PS/100 g), though in the fruit beverage (FbB) the PS content obtained was 22.6% lower. These observations could be attributed to several factors related to the processing conditions used at laboratory scale (such as speed of mixing, homogenization pressure and steps, time and temperature), or/and the stability/biocompatibility of the delivery system of each ingredient with food matrices used in this study. As an example, rupture of the encapsulated material due to one of the above mentioned factors may release the PS into the food matrix, and since PS are not water soluble, higher proportions of PS may be found on the surface. Thus, non-homogeneous dispersion of the PS may cause sampling error and would justify the presence of statistically significant differences ($p < 0.05$) in total PS contents and in individual contents of β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, campestanol and β -sitostanol, according to the source of PS used for enrichment, as well as, when considering the type of sample factor.

Table 2 Phytosterol and phytostanol contents (values are expressed as mean \pm standard deviation of three replicates).

	MFbA	MFbB	FbA	FbB
	Total PS (g/100 g beverage)			
	1.393 \pm 0.032 ^a	1.930 \pm 0.322 ^b	1.281 \pm 0.023 ^a	1.425 \pm 0.098 ^a
	Relative percentages (g/100 g PS)			
Brassicasterol	ND	1.81 \pm 0.10 ^a	ND	1.90 \pm 0.04 ^a
Campesterol	5.69 \pm 0.17 ^a	12.71 \pm 0.40 ^b	5.64 \pm 0.07 ^a	12.78 \pm 0.11 ^b
Stigmasterol	1.49 \pm 0.16 ^a	1.71 \pm 0.07 ^{ab}	1.54 \pm 0.23 ^a	1.98 \pm 0.00 ^b
β -Sitosterol	79.10 \pm 0.22 ^a	75.50 \pm 1.40 ^b	79.30 \pm 0.13 ^a	70.63 \pm 0.77 ^c
Campestanol	1.26 \pm 0.11 ^a	2.88 \pm 0.39 ^b	1.35 \pm 0.22 ^a	4.58 \pm 0.24 ^c
Sitostanol	12.47 \pm 0.22 ^a	5.37 \pm 0.68 ^b	12.18 \pm 0.38 ^a	8.13 \pm 0.38 ^c

PS: plant sterols; ND: not detectable; FbA and FbB: Fruit beverage enriched with plant sterol source A (tall oil) or B (vegetable oils), respectively; MFbA and MFbB: milk-based fruit beverage enriched with plant sterol source A or B, respectively.

In all the samples, β -sitosterol was the most abundant phytosterol (>70%), followed by campesterol and stigmasterol (see **Table 2**). In the samples in which brassicasterol was detected (MFbB and FbB), the concentrations of the latter were similar to those of stigmasterol. The presence of brassicasterol in samples enriched with B source (vegetable oils) may be due to the fact that the PS source composition includes rapeseed oil, which is rich in this phytosterol (Phillips, Ruggio, Toivo, Swank, & Simpkins, 2002; Piironen, Toivo, & Lampi, 2000). Low or undetectable brassicasterol contents and lesser contents of campesterol in tall oil versus vegetable oils have been described by Cantrill & Kawamura (2008). These observations coincide with our own results, with 2.2- and 3.7-fold higher campesterol and campestanol contents,

respectively, in the samples containing sterol source B (vegetable oils) than in those containing sterol source A (tall oil).

Phytostanol contents were detected at amounts always lower than the respective phytosterols. Sitostanol was more abundant than campestanol, with a 1.5- to 2.3-fold higher concentration in the samples containing sterol source A (tall oil) versus the samples containing sterol source B (vegetable oils). This coincides with the observations of Cantrill & Kawamura (2008), who reported higher phytostanol contents in oils from tall oil than from vegetable oils. In this sense, in samples enriched with A source (free sterols from tall oil), the PS profile obtained (β -sitosterol > sitostanol > campesterol > campestanol) (**Table 2**) also agrees with those reported by Maki et al. (2003) and Jones, Vanstone, Raeini-Sarjaz, & St-Onge (2003) in beverages enriched with ingredients of tall oil origin, although no campesterol in the beverages of Jones et al. (2003) was reported.

The differences found in the sterol profile in PS-enriched foodstuffs in the literature in comparison with our own samples could be attributed to the origin of the sterols used in enrichment, as recently confirmed by Gonzalez-Larena, et al. (2011) in several PS ingredients. In two studies with orange juices, samples enriched with esterified PS (Mezine, et al., 2003) (PS origin not specified) and PS from vegetable oils (Devaraj, Jialal, & Vega-López, 2004), a PS profile in which the predominant representative was β -sitosterol (40-50%) in a proportion lower than that found in our study (see **Table 2**) was reported. The percentage ranges in turn obtained for stigmasterol and campesterol were 20-23% and 25-27%, respectively, which were far higher than the levels recorded in our samples.

It should be noted that in the European Union, PS enrichment of milk-based fruit beverages is allowed, though addition to fruit beverages has not yet been approved. In contrast, in other countries such as Canada, the United States and New Zealand, the enrichment of fruit beverages is permitted. As can be seen in **Table 2**, the beverages comply with PS profiles specified by the European Commission (European Commission Decision 2004/336) for milk-based fruit beverages, since the PS contents are lower than the maximum authorized level (3 g of PS per container or daily serving), and the relative percentages of each phytosterol abide with the legal specifications: <80% β -sitosterol, <40% campesterol, <30% stigmasterol, <3% brassicasterol, <15% sitostanol, <5% campestanol, <3% other sterols/stanols.

4.2. Determination of phytosterol oxidation products

A GC-FID chromatogram of the POPs identified in MFbB is shown in **Figure 2**. Only POPs corresponding to β -sitosterol were detected (7 α -hydroxysitosterol, 7 β -hydroxysitosterol, α - and β -epoxysitosterol and 7-ketositosterol), which would agree with the fact that it is the predominant sterol in the analyzed beverages (see **Table 2**). Regardless of the sterol source used in enrichment, the same oxides were detected in all the samples.

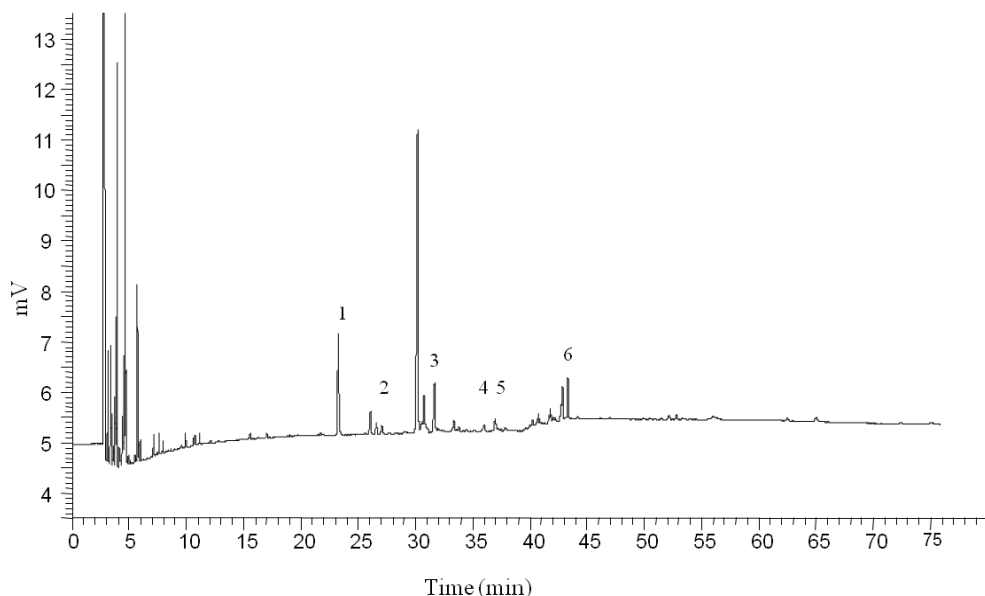


Fig. 2. Phytosterol oxidation product determination by GC-FID in milk-based fruit beverage (MFbB). 1: 19-hydroxycholesterol (IS), 2: 7 α -hydroxysitosterol, 3: 7 β -hydroxysitosterol, 4: β -epoxysitosterol, 5: α -epoxysitosterol, and 6: 7-ketositosterol.

The POPs contents are shown in **Table 3**. The prevalent oxide was 7 β -hydroxysitosterol (39-58.5% of total POPs), followed by 7-ketositosterol (13.6-23.7%) - except in MFbA, where the second most abundant oxide . as β -epoxysitosterol (24.6%), with a percentage similar to that of 7-ketositosterol. In the samples containing milk (MFbA and MFbB), the β -epoxysitosterol content was greater than that of 7 α -hydroxysitosterol, while in the samples without milk (FbA and FbB) this order was seen to be inverted. The total amount of POPs found ranged between 42.9 mg/100 g of PS in sample MFbB and 57.4 mg/100 g of PS in MFbA (or between 0.58 and 0.83 mg/100g beverage). There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) in total POP contents or in the different oxides according to the sterol source used for enrichment (free (A) or esterified (B)).

Table 3. Contents of phytosterol oxidation products (POPs) (mg/100 g of PS) (values are expressed as mean \pm standard deviation of three replicates). Different superscript letters denote significant differences ($p < 0.05$) between samples.

	MFbA		MFbB		FbA		FbB	
	mg/100g PS	relative % ¹	mg/100g PS	relative %	mg/100g PS	relative %	mg/100g PS	relative %
7 α -hydroxysitosterol	4.619 \pm 0.845 ^{ab}	8.05	2.566 \pm 0.448 ^b	5.98	7.123 \pm 3.279 ^a	13.72	6.004 \pm 0.927 ^a	10.78
7 β -hydroxysitosterol	22.350 \pm 1.785 ^a	38.94	22.372 \pm 4.183 ^a	52.20	28.305 \pm 7.504 ^{ab}	54.49	32.605 \pm 4.612 ^b	58.52
β -epoxysitosterol	14.116 \pm 1.127 ^a	24.59	6.530 \pm 0.444 ^b	15.23	2.467 \pm 0.170 ^c	4.75	5.346 \pm 3.051 ^b	9.59
α -epoxysitosterol	2.737 \pm 0.136 ^a	4.77	3.136 \pm 0.873 ^a	7.32	4.989 \pm 2.289 ^a	9.61	4.204 \pm 2.210 ^a	7.54
7-ketositosterol	13.574 \pm 1.913 ^a	23.65	8.262 \pm 0.963 ^a	19.27	9.051 \pm 2.507 ^a	17.43	7.553 \pm 1.808 ^a	13.57
Total POPs	57.396 \pm 4.821 ^a		42.866 \pm 2.504 ^b		51.935 \pm 8.454 ^{ab}		55.712 \pm 2.941 ^{ab}	

¹ Calculated with respect to total POP content; PS: plant sterols; FbA and FbB: fruit beverage enriched with plant sterol source A (tall oil) or B (vegetable oils), respectively; MFbA and MFbB: milk-based fruit beverage enriched with plant sterol source A or B, respectively.

In a tripalmitin matrix (Soupas, Huikko, Lampi, & Piironen, 2005), it was reported that at low temperatures (≤ 100 °C) and times under 24 h, free β -sitosterol and campesterol oxidize to a lesser proportion than the esterified forms. At a temperature of 180 °C, free PS oxidized slightly more than esterified PS. Moreover, the lowest proportion of POPs corresponded to sitostanol, independently of the temperature and of whether this PS was free or esterified.

We know of no other studies identifying and/or quantifying POPs in food matrixes similar to those analyzed in the present study. As both MFbA and MFbB contain milk, the discussion of results can be made between the POP contents of our samples and the scant information available in the literature involving dairy matrixes. In milks enriched with phytosterols (free or esterified), Soupas et al. (2006) identified β -sitosterol oxides (hydroxide, epoxy and 7-keto derivatives), though only the 7-hydroxy and 7-ketoderivatives were quantified. The total content, which was considered low, was 218 μg POPs/100 g of milk in the samples enriched with free phytosterols, and 203 μg POPs/100 g of milk in the samples enriched with esterified phytosterols – such contents being lower than those recorded in our study. The lesser enrichment in phytosterols (0.5%) versus that used in our study (1.77-1.84%) would justify the observed differences in POPs contents. Accordingly, Menéndez-Carreño et al. (2008) detected total POP contents of 180 $\mu\text{g}/100$ g in an enriched milk with phytosterol esters (0.3%), which is similar to the observations of Soupas, et al. (2006). Regarding individual POP abundance, 7 β -hydroxysitosterol was the main POP, followed by 7-ketositosterol Menéndez-Carreño et al. (2008). However, and regardless of the chemical PS form (free or esterified), the prevalent POP in

our beverages was 7 β -hydroxysitosterol. Hydroxy-, epoxy-, triol- and keto-derivatives of β -sitosterol, campesterol and stigmasterol have been identified and quantified in phytosterol-enriched milk (Menéndez-Carreño et al., 2008), β -epoxy derivatives of β -sitosterol being more abundant than α -epoxy. This was also the case in our milk-containing samples (see **Table 3**).

In milk based infant foods not enriched with PS, Zunin, et al. (1998) reported 7-ketositosterol contents as a marker of phytosterol oxidation ranging between 5.8 – 115.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of dried sample. In another study by our group, POP contents from β -sitosterol, stigmasterol and campesterol were determined in milk and cereal based infant foods (García-Llatas, et al. 2008), resulting in 7-ketoderivatives of β -sitosterol > stigmasterol > campesterol. The total POP contents were low (0.9-16.1 μg of POPs/100 g of sample), though these foodstuffs were not enriched with PS. Unlike in the present study, the predominant oxide was 7-ketositosterol, followed by α -epoxysitosterol.

The mean oxidation percentages of β -sitosterol obtained from our samples, according to the source of PS used in enrichment, were low (0.069 g POPs/100 g β -sitosterol for samples enriched with free PS (FbA and MFbA) and 0.068 g POPs/100 g β -sitosterol (for the source B samples (FbB and MFbB)). Thus, no difference in the β -sitosterol oxidation percentage is considered when free or esterified PS are used as enrichment source in these functional beverages prepared at laboratory scale. In the same way as in skimmed milk enriched with PS, similar oxidized β -sitosterol was reported with esterified phytosterols enrichment as with free phytosterols (0.09% versus 0.08%, respectively) (Soupas, et al., 2006). In a milk enriched with esterified phytosterols, (Menéndez-Carreño et al., 2008) a lower β -sitosterol

oxidation percentage (0.04%) was obtained. However, the oxidation percentages obtained both in our samples and in the mentioned studies involving milk matrixes can be considered low, independently of the PS source used for enrichment. Consequently, PS-enriched fruit and milk-based fruit beverages can be regarded as suitable PS vehicles.

5. CONCLUSIONS

Two different PS ingredients used for food enrichment were employed for manufacturing two types of functional beverages (milk-based fruit and fruit beverages). The PS profile and contents in the analyzed samples were concordant with current legislation, and reflected differences previously reported among diverse commercially available ingredients used for PS enrichment. The order of PS abundance was β -sitosterol > campesterol > stigmaterol \approx brassicasterol. The PS oxidation stage in the samples, while slightly higher than others found in the literature referred to dairy products, was low regardless of the PS source used in enrichment – a fact that must be taken into account due to the existing inconclusive information on the biological effects of POPs. Only β -sitosterol oxides were detected, which is logical, since this is the predominant PS in the samples. The β -sitosterol oxidation percentage was around 0.07%, which reflects the limited extent of PS oxidation in the beverages, though laboratory scale conditions were used for producing them. In summary, the present paper for the first time offers information on the PS and POP contents in PS-enriched milk-based fruit beverages and fruit beverages, regarded as functional foods. Further studies are needed to evaluate PS stability and POP contents in enriched foods, and

their relation to the enrichment source used, as well as the physiological effects that may result from their consumption.

ABBREVIATIONS

BHT: butylhydroxytoluene; COPs: cholesterol oxidation products; EU: European Union; Fb: fruit beverages; GC-FID: gas chromatography-flame ionization detection; GC-MS/MS: gas chromatography-tandem mass spectrometry; HMDS: hexamethyldisilazane; IS: internal standard; KCl: potassium chloride; KOH: potassium hydroxide; LDL: low-density lipoprotein; MFb: milk-based fruit beverages; POPs: phytosterol oxidation products; PS: plant sterols; Rf: response factor; SPE: solid-phase extraction; TMCS: trimethylchlorosilane; TMSE: trimethylsilyl ether.

REFERENCES

Bortolomeazzi, R., Cordano, F., Pizzale, L., & Conte, L.S. (2003). Presence of phytosterol oxides in crude vegetables oils and their fate during refining. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2394-2401.

Boselli, E., Velazco, V., Caboni, M.F., & Lercker, G. (2001). Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *Journal of Chromatography A*, 917, 239-244.

Cantrill, R., & Kawamura, Y. (2008). Phytosterols, phytostanols and their esters. Chemical and Technical Assessment for the 69th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

<http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/69/Phytosterols.pdf> (Accessed March 2012).

Clement, L.M., Hansen, S.L., Costin, C.D., & Perri, G.L. (2010). Quantitation of sterols and steryl esters in fortified foods and beverages by GC/FID. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 973-980.

Devaraj, S., Jialal, I., Vega-López, S. (2004). Plant sterol-fortified orange juice effectively lowers cholesterol levels in mildly hypercholesterolemic healthy individuals. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 24, 25-28.

Dutta, P.C. (2002). Determination of phytosterol oxidation products in foods and biological samples. In F. Guardiola, P.C. Dutta, R. Codony, & G.P. Savage (Eds.), *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects* (pp. 335-374). Champaign: AOCS Press.

European Commission Decision 2004/336/EC of 31 March 2004 authorising the placing on the market of yellow fat spreads, milk based fruit drinks, yoghurt type products and cheese type products with added phytosterols/phytostanols as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L105, 49-51.

European Food Safety Authority (EFSA) (2008). A report from the data collection and exposure unit in response to a request from the European Commission: Consumption of food and beverages with added plant sterols in the European Union. *European Food Safety Authority Journal*, 133, 1-21.

Fernandes, P., & Cabral, J.M.S. (2007). Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, *98*, 2335–2350.

García-Llatas, G., & Rodríguez-Estrada, M.T. (2011). Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, *164*, 607-624.

García-Llatas, G., Cercaci, L., Rodríguez-Estrada, M.T., Lagarda, M.J., Farré, R., & Lercker, G. (2008). Sterol oxidation in ready-to-eat infant foods during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 469-475.

González-Larena, M., García-Llatas, G., Vidal, M.C., Sánchez-Siles, L.M., Barberá, R., & Lagarda, M.J. (2011). Stability of plant sterols in ingredients used in functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 3624–3631.

Hernández-Mijares, A., Bañuls, C., Rocha, M., Morillas, C., Martínez-Triguero, M.L., Víctor, V.M., Lacomba, R., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R. & Lagarda, M.J. (2010). Effects of phytosterol ester-enriched low-fat milk on serum lipoprotein profile in mildly hypercholesterolaemic patients are not related to dietary cholesterol or saturated fat intake. *British Journal of Nutrition*, *11*, 1-8.

Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lütjohann, D., Mensink, R.P., & Trautwein, E.A. (2008). Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research*, *47*, 37-49.

Jones, P.J.H., Vanstone, C.A., Raeini-Sarjaz, M., & St-Onge, M.P. (2003). Phytosterols in low- and nonfat beverages as part of a controlled diet fail to lower plasma lipid levels. *Journal of Lipid Research*, *44*, 1713-1719.

Laakso, P. (2005). Analysis of sterols from various food matrices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *107*, 402–410.

Maki, K. C., Shinnick, F., Seeley, M. A., Veith, P. E., Quinn, L. C., Hallissey, P. J., Temer, A., & Davidson, M.H. (2003). Food products containing free tall oil-based phytosterols and oat beta-glucan lower serum total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic adults. *Journal of Nutrition*, *133*, 808-813.

Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, *61*, 193–199.

Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2008). Stability of sterols in phytosterol-enriched milk under different heating conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 9997-10002.

Mezine, I., Zhang, H., Macku, C., & Lijana, R. (2003). Analysis of plant sterol and stanol esters in cholesterol-lowering spreads and beverages using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 5639-5646.

Moreau, R.A. (2004). Plant sterols in functional foods. In P.C. Dutta (Ed.), *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals* (pp. 317-345). New York: Marcel Dekker Inc.

Normen, L., & Frohlich, J. (2004). Role of plant sterols in cholesterol lowering. In P.C. Dutta (Ed.), *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals* (pp. 243-315). New York: Marcel Dekker Inc.

Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., 2010. Oxysterols: a world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 3289–3303.

Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Toivo, J.I., Swank, M.A., & Simpkins, A.H. (2002). Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, *15*, 123-142.

Piironen, V., Toivo, J., & Lampi, A.M. (2000). Natural sources of dietary plant sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*, *13*, 619-624.

Ryan, E., McCarthy, F.O., Maguire, A.R., & O'Brien, N.M. (2009). Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence, and biological effects. *Food Reviews International*, *25*, 257-174.

Saraiva, D., Castilho, M.C., Martins, M.R., Noronha da Silveira, M.I., & Ramos, F. (2011). Evaluation of phytosterols in milk and yogurts used as functional foods in Portugal. *Food Analytical Methods*, *4*, 28-34.

Soupas, L., Huikko, L., & Lampi, A.M. (2006). Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *European Food Research and Technology*, *222*, 266-273.

Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M., & Piironen, V. (2005). Esterification affects phytosterol oxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *107*, 107-118.

Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M., & Piironen, V. (2007). Pan-frying may induce phytosterol oxidation. *Food Chemistry*, *101*, 286–297.

Zunin, P., Calcagno, C., & Evangelisti, F. (1998) Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. *Journal of Dairy Research*, *65*, 591-598.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Hero España, S.A. for providing the samples. This study was financed by AGL2008-02591-C02-01 (CICYT-FEDER) and partially funded by Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063. Thanks are also due to the *Generalitat Valenciana* (Spain) for financial support (GVACOMP2011-195) of the Bionutest group, and to R. López-Cermeño for her technical assistance in the Pilot Plant. Marina González-Larena holds a Danone grant from the *Instituto Danone* (Spain), and Laia Alemany-Costa holds a grant from the *Generalitat Valenciana* (Spain).



Plant Sterols and Antioxidant
Parameters in Enriched Beverages:
Storage Stability

Journal of Agricultural and Food Chemistry

2012, 60, 4725–4734

Plant Sterols and Antioxidant Parameters in Enriched Beverages: Storage Stability

Marina González-Larena, Antonio Cilla, Guadalupe García-Llatas, Reyes Barberá, and María Jesús Lagarda*

Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100-Burjassot, Valencia, Spain.

ABSTRACT

Plant sterols (PS) stability, antioxidant parameters, and color were studied during 6 months of storage at 4, 24, and 37 °C in three PS-enriched functional beverages. Beverages were skimmed milk with fruit juice and PS (MFJPS), fruit juice and PS (FJPS), and skimmed milk with PS (MPS). No loss in total PS content occurred during storage observing the same values at any given storage time point. Total carotenoids decreased 36% with storage at two months and then remained stable. Total polyphenols showed fluctuations throughout the storage, remaining stable at 6 months and reaching initial values. The antioxidant capacity (TEAC method) increased 18% at 6 months, and there was an increase in color over time and temperature, probably due to Maillard reaction compound formation. The increase in total antioxidant capacity might have helped PS maintenance throughout storage, these beverages being a good PS source even after 6 months of storage.

KEYWORDS: *sterol-enriched beverage, functional foods, phytosterols, antioxidants, storage stability*

INTRODUCTION

Plant sterols (PS) are currently used as functional food ingredients due to their protective effects, especially β -sitosterol, against colon, prostate and breast cancer, and their well-known total and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol lowering activity (1). Indeed, controlled clinical trials have demonstrated that PS consumption (2 g/d) results in a cholesterol reduction of approximately 10% (2).

The first (and still the most common) PS-enriched commercial formulations were high fat food products (1). However, the enrichment of spreads or high-fat foodstuffs with PS is contrary to dietary recommendations aimed at decreasing the risk of cardiovascular diseases. Hence, low-fat and nonfat alternatives need to be developed. In this sense, there are some examples of low-fat drinking foodstuffs enriched with PS, such as nonfat or low-fat milks and yogurts (3–7) and different beverages (8–10) including PS fortified orange juice-based beverages (11, 12).

Prevention of lipid oxidation during processing and storage is essential to maintain the quality and safety of PS-enriched foods since PS are susceptible to oxidation like all unsaturated lipids, and a decrease in initial PS content could occur as a result. The oxidative process of the lipid fraction in foods during long-term storage can be influenced by the packaging materials, storage temperature, oxygen availability, exposure to light, as well as by the antioxidant and pro-oxidant contents. In this context, one way of improving the oxidative stability of PS enrichment in a food would be their inclusion in a matrix with natural antioxidant compounds. In this sense, fruit-skimmed milk beverages, where PS

enrichment is allowed (13), appear as a suitable way to fulfill this requirement because they are appropriate for complying with health recommendations (restrictions of simple carbohydrates and saturated fatty acids (milk fat) and consumption of unsaturated fatty acids (used in the formation of PS esters)) and are good sources of other bioactive compounds such as polyphenols and vitamins, which also possess antioxidant activity (14).

Although the PS profiles of several dairy products and juice beverages have been reported in the literature (7, 15, 16), there are few studies regarding PS stability during storage in enriched beverages. Evaluations have been made of phytosterol-enriched whole milk powder stored at room temperature and at 38 °C for 12 months, milk enriched with free and esterified phytosterols and phytostanyl esters stored in the dark at room temperature and at 4 °C for 6 months (5), and phytosterolenriched milk subjected to Schaal oven conditions (24 h/65 °C, equivalent to one month of storage at room temperature) (6). However, as far as we are aware, no studies have evaluated PS stability in fruit–milk beverages, though it would be of special interest to check whether PS content is maintained stable during product shelf life to safeguard its potential bioactive properties. In addition, the relationship between PS stability and antioxidant parameters during storage is a relevant aspect that has not been addressed in food matrixes in literature so far. Besides, the stability of antioxidant parameters may be affected by processing and storage conditions (time and temperature) during the product shelf life.

The aim of the present study was to determine the effect of storage at 4, 24, and 37 °C during 6 months on PS stability (phytosterols/-stanols

content) in three PS-enriched beverages. Furthermore, the evolution of antioxidant parameters (total carotenoids, total polyphenols, and total antioxidant capacity) and color measurements were determined complementarily to ascertain their protective role on PS stability in these functional beverages. These results will improve the knowledge on PS stability during storage and the food matrix effect upon bioactive compounds (PS and antioxidants), which could be of interest for both consumers and food scientists and the industry.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. For plant sterol determination, standards used were 5 β -cholestan-3 α -ol (epicoprostanol) (purity \geq 95%) used as internal standard (IS), (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3-ol (stigmasterol) (purity 95%), (24R)-ethylcholest-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) (purity 95%), and 24 α -ethyl-5 α -cholestan-3 β -ol (stigmastanol) (purity 97.4%) from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and (24R)-methylcholest-5-en-3-ol (campesterol) (purity 98.6%) purchased from Steraloids (Newport, RI, USA). Chloroform, diethyl ether, methanol, anhydrous sodium sulfate, acetone, 2-propanol, and anhydrous pyridine were purchased from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA). KOH was from Poch, S.A. (Sowinskiego, Poland), KCl from Panreac (Barcelona, Spain), hexane from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), and butylated hydroxytoluene (BHT) was from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Silylating reagents: hexamethyldisilazane (HMDS) from Fluka (Buchs, Switzerland) and trimethylchlorosilane (TMCS) from Carlo Erba (Rodano, Italy). All reagents were of analytical grade.

For antioxidant parameters determination, the reagents used were dipotassium peroxodisulfate, absolute ethanol, methanol, acetone, sodium hydrogen carbonate from Merck (Barcelona, Spain), hexane from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)($\geq 99\%$ purity), and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (97% purity) from Sigma Chemical Co. (Steinheim, Germany). Except for ABTS and Trolox, all the chemicals and reagents used in these experiments were of analytical grade. Millipore-Milli-Q distilled–deionized water (Millipore Ibérica, S.A., Barcelona, Spain) was used throughout the experiments.

Samples. Three beverages enriched with free microcrystalline PS from tall oil (0.8 g PS/100 mL beverage) as a source of PS were manufactured in a pilot plant by HERO Spain, S.A.: skimmed milk with fruit juice and PS (MFJPS), composed of reconstituted acidified skimmed milk, tangerine fruit juice from concentrate, banana puree, grape juice from concentrate, and PS; fruit juice and PS (FJPS), composed of tangerine fruit juice from concentrate, banana puree, grape juice from concentrate, PS, and water to substitute skimmed milk; and skimmed milk with PS (MPS), composed of reconstituted acidified skimmed milk, PS, and water to substitute fruit juices. The nutritional composition of samples is shown in **Table 1**. Fruit beverages were heat treated at 100–115 °C for 15–30 s to obtain microbiologically stable foodstuff, and were packed under aseptic conditions into sterile 100 mL polypropylene plastic containers. Samples were analyzed just after manufacture (time 0) and were then stored at 4, 24, or 37 °C and analyzed at regular time intervals of 2 months until 6 months. The

storage time of 6 months was chosen because the manufacturer of PS-enriched beverages indicated that within this period the organoleptic properties in samples are preserved. In addition, this is the common and usual turnover period of this kind of products in sales points, where products are stored no longer than 6 months.

Table 1: Nutritional Composition of Plant Sterol-Enriched Beverages (Values Presented as per 100 g of Beverage)

	MFJPS	FJPS	MPS
Kcal	72	30	48
Proteins	2.7	0.5	1.6
Carbohydrates	14.3	6.1	2.5
Fat	0.4	0.2	0.2

Plant Sterols Determination. Lipids were extracted according to the procedure of Boselli et al. (17) A weight of sample (15 g) providing approximately 120 mg of PS was taken. Lipids were extracted with 80 mL of chloroform/methanol (1:1, v/v) containing 0.05% of BHT (which was added as antioxidant to avoid PS oxide artifact formation during saponification) and homogenized with a Polytron homogenizer (PT 2000, Kinematica AC, Switzerland) during 3 min at 250 W. After adding 40 mL of chloroform and homogenizing again, the sample was filtered (Whatman n° 1 90 mm, Maidstone, England) with a Buchner funnel. To the filtrate, 20 mL of 1 M KCl solution was added and refrigerated overnight. Then, the chloroform phase was concentrated in a rotary evaporator and dried with nitrogen. The lipid fraction was then reconstituted with hexane/2-propanol (4:1, v/v), dividing the sample into four aliquots for saponification. From here onward, the methodology employed and the chromatographic conditions used have been described

previously by González-Larena et al. (18) For quantification, phytosterol calibration curves of campesterol (98.6–550.2 µg), stigmasterol (9.5–99.8 µg), and β-sitosterol (700.6–2398.8 µg) containing 200 µg of IS (epicoprostanol) were performed, with obtained linear regression coefficients of $r^2 > 0.985$ for all analytes. Quantification of phytostanols (campestanol and sitostanol) was performed using the response factor (Rf = 1.12) calculated for stigmasterol standard versus epicoprostanol (IS). The accuracy of the method was investigated by analyzing MFJPS, FJPS, and MPS after the addition of 90 µg of campesterol, 60 µg of stigmasterol, 900 µg of β-sitosterol, and 190 µg of sitostanol standards before the saponification step and calculating the recoveries under consideration of the PS content of the unspiked sample (18). Accuracy, estimated by recovery assays and expressed as percentages as the mean ± standard deviation of three replicates, ranged for main plant sterols (β-sitosterol, β-sitostanol, and campesterol) between 100 and 105% for MPS and MFJPS samples, and between 79.3 and 82.7% for FJPS. In the case of stigmasterol, recovery percentages ranged between 126.4 and 75.9% for all samples studied.

Total Carotenoid Determination. For total carotenoid content determination, we used the colorimetric method described by Lee et al. (19) Briefly, 2.5 mL aliquots of beverages were mixed with 5 mL of the extracting solvent (hexane/acetone/ethanol, 50:25:25, v/v/v) and shaken vigorously during 1 min. Then, the mixture was centrifuged for 5 min at 4000 rpm at 5 °C. The top layer of hexane containing the color was recovered and transferred to glass tubes protected from light and homogenized with a Pasteur pipet. After that, 1 mL of this supernatant was transferred to a 25 mL volumetric flask, and the volume was

completed with hexane. Total carotenoid was determined by measuring the absorbance at 450 nm in a UV–vis spectrophotometer (Lambda 2, Perkin-Elmer, Ueberlingen, Germany). Total carotenoid content was calculated as mg of β -carotene/100 mL of beverage using an extinction coefficient of β -carotene, $E^{1\%} = 2505$.

Total Polyphenol Determination. Total polyphenolic compounds were determined spectrophotometrically with Folin–Ciocalteu reagent according to the method of Cilla et al. (20), with slight modifications. Dilutions of 1:10 for fruit beverages with deionized water were used, followed by centrifugation at 11000 rpm for 5 min at 4 °C. For the colorimetric assay, to 100 μ L of supernatant we added 3 mL of Na_2CO_3 solution (2% w/v) and 100 μ L of Folin–Ciocalteu’s phenols reagent (50% v/v). After incubation for 1 h in darkness at room temperature, absorbance detection was carried out at 765 nm using a UV–vis spectrophotometer. Results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per liter. To remove possible interferences of milk in the Folin–Ciocalteu method, the value obtained for the MPS sample (with the same milk content as the MFJPS sample) was subtracted from that of the MFJPS sample.

Total Antioxidant Capacity (TAC) Determination. The TAC of the beverages was measured by using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) method for hydrophilic (as described by Cilla et al. (20)) and lipophilic (as described by Garcíá-Alonso et al. (21)) extracts. Briefly, a stable stock solution of $\text{ABTS}^{+\cdot}$ was generated by reacting 7 mM ABTS with 140 mM potassium persulfate and allowing it to stand for 12–16 h in the dark at room temperature. The $\text{ABTS}^{+\cdot}$ working

solution was prepared by diluting the stock solution with ethanol to attain an absorbance of 0.700 ± 0.020 at 734 nm, measured at 30 °C. Afterward, 2 mL of this solution was pipetted in a spectrophotometric cell, and the absorbance was read at this initial point of reaction (A^0) in a thermostated UV–vis spectrophotometer (Lambda 2). Samples were diluted with distilled–deionized water to obtain a percentage inhibition of absorbance of approximately 50%. Then, 100 μ L of hydrophilic, lipophilic, or the Trolox standard solutions (ethanolic solutions between 0 and 250 μ M) was added, and the absorbance was measured at the end time of 3 min (A^f). Percentages of absorbance inhibition were calculated as follows: $(1 - A^f/A^0) \times 100$. Results for TAC (sum of hydrophilic plus lipophilic antioxidant capacity) were expressed as μ M Trolox. To obtain the hydrophilic extract, beverages were diluted 1:10 with deionized water and centrifuged at 11000 rpm for 5 min at 4 °C. The supernatant was tested for TAC. The lipophilic extracts, in turn, were obtained by homogenizing 1 mL of beverage with 9 mL of the hexane/acetone/methanol mixture (2:1:1, v/v/v) for 30 min protected from light. Then, 7.5 mL of water was added, and the mixture was centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The top layer containing the lipophilic fraction was transferred into a 10 mL volumetric flask and the volume completed with hexane. Finally, a 1 mL aliquot of the lipophilic fraction was dried under a nitrogen stream and then reconstituted in 0.5 mL of 2-propanol before being analyzed for TAC.

Color Determination. Color was measured using a Hunter Labscan II Colorimeter (Hunter Associates Laboratory, Inc.). Results were expressed according to the CIELAB system with reference to illuminant D65 and a visual angle of 10°. The parameters determined

were L^* (luminosity or brightness: $L^* = 0$ black and $L^* = 100$ white), a^* (red-green component: $-a^* =$ greenness and $+a^* =$ redness), and b^* (yellow-blue component: $-b^* =$ blueness and $+b^* =$ yellowness). The difference in color between two samples (ΔE) was given by the expression: $\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ (22). To evaluate color changes, ΔE^* was calculated, where L^* , a^* , and b^* values at the considered storage time were taken with respect to those obtained in just manufactured samples (time zero).

Statistical Analysis. The sample determinations were conducted in triplicate, with values reported as means \pm standard deviation. Three-way (sample, temperature, and storage time) analysis of variance (ANOVA) was applied to the results obtained, followed by Tukey's posthoc test. A significance level of $p < 0.05$ was adopted for all comparisons. Statgraphics Plus, version 5.1 (Rockville, Maryland, USA), was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Plant Sterols. The phytosterol and phytostanol contents in the beverages analyzed are reported in **Table 2**. Because of the fact that all matrixes were enriched with the same source of PS (tall oil), they showed the same PS profile. Likewise, an example of the PS profile of one of the samples analyzed is shown in **Figure 1**.

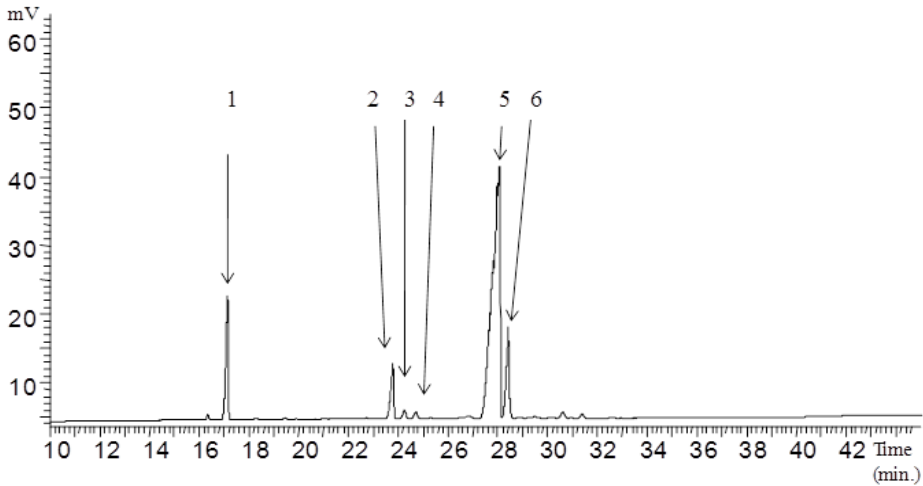


Figure 1. Plant sterol determination by GC-FID in skimmed milk with tangerine fruit juice and plant sterols (MFJPS). 1, epicoprostanol (IS); 2, campesterol; 3, campestanol; 4, stigmasterol; 5, β -sitosterol; 6, sitostanol.

Total PS contents ranged from 0.61 to 0.74 g/100 g sample, and β -sitosterol (mean value of 0.524 g/100 g sample) was the most abundant phytosterol, followed by campesterol (0.038 g/ 100 g) and stigmasterol (0.010 g/100 g). In addition, two phytostanols were detected: sitostanol (0.082 g/100 g) and, to a lesser extent, campestanol (0.008 g/100 g); however, no brassicasterol was detected. The PS profile obtained agrees with that of the tall oil ingredient used as a source of PS in the enrichment of the beverages, previously characterized by our group (18). This profile also agrees with the observations of previous studies in relation to tall oil enriched beverages.

Table 2. Plant Sterol Contents (g/100 g of Sample) in PS-Enriched beverages Just after Manufacture and after Storage^a.

	month	temperature	MFJPS	FJPS	MPS	
Campesterol	0		0.034 ± 0.001	0.040 ± 0.002	0.037 ± 0.004	
	2	4 °C	0.037 ± 0.002	0.036 ± 0.001	0.037 ± 0.001	
		24 °C	0.035 ± 0.003	0.039 ± 0.002	0.039 ± 0.002	
		37 °C	0.038 ± 0.004	0.041 ± 0.002	0.037 ± 0.001	
	4	4 °C	0.036 ± 0.002	0.040 ± 0.002	0.036 ± 0.002	
		24 °C	0.037 ± 0.001	0.038 ± 0.001	0.042 ± 0.001	
		37 °C	0.038 ± 0.001	0.037 ± 0.001	0.034 ± 0.002	
	6	4 °C	0.037 ± 0.005	0.040 ± 0.001	0.038 ± 0.001	
		24 °C	0.036 ± 0.001	0.038 ± 0.003	0.034 ± 0.001	
		37 °C	0.038 ± 0.001	0.041 ± 0.001	0.038 ± 0.001	
	Stigmasterol	0		0.010 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.010 ± 0.001
		2	4 °C	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001
24 °C			0.010 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.001	
37 °C			0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.010 ± 0.001	
4		4 °C	0.010 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.010 ± 0.001	
		24 °C	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.011 ± 0.001	
		37 °C	0.011 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.009 ± 0.001	
6		4 °C	0.010 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.010 ± 0.001	
		24 °C	0.010 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.009 ± 0.001	
		37 °C	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.010 ± 0.001	
β-Sitosterol		0		0.486 ± 0.014	0.556 ± 0.036	0.514 ± 0.054
		2	4 °C	0.509 ± 0.02	0.505 ± 0.029	0.517 ± 0.015
	24 °C		0.495 ± 0.039	0.538 ± 0.036	0.551 ± 0.038	
	37 °C		0.548 ± 0.064	0.561 ± 0.021	0.519 ± 0.021	
	4	4 °C	0.496 ± 0.049	0.558 ± 0.031	0.507 ± 0.028	
		24 °C	0.509 ± 0.013	0.520 ± 0.004	0.589 ± 0.008	
		37 °C	0.503 ± 0.021	0.511 ± 0.017	0.492 ± 0.026	
	6	4 °C	0.518 ± 0.071	0.566 ± 0.012	0.536 ± 0.026	
		24 °C	0.496 ± 0.009	0.534 ± 0.039	0.477 ± 0.040	
		37 °C	0.540 ± 0.020	0.569 ± 0.010	0.522 ± 0.009	
	Campestanol	0		0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.001
		2	4 °C	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001
24 °C			0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	
37 °C			0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.001	
4		4 °C	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.001	
		24 °C	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	
		37 °C	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	
6		4 °C	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	
		24 °C	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.001	
		37 °C	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.001	
Sitostanol		0		0.077 ± 0.002	0.088 ± 0.005	0.082 ± 0.008
		2	4 °C	0.079 ± 0.004	0.079 ± 0.004	0.081 ± 0.002
	24 °C		0.077 ± 0.006	0.083 ± 0.006	0.086 ± 0.006	
	37 °C		0.085 ± 0.011	0.085 ± 0.002	0.081 ± 0.004	
	4	4 °C	0.077 ± 0.008	0.086 ± 0.005	0.079 ± 0.005	
		24 °C	0.080 ± 0.002	0.080 ± 0.002	0.090 ± 0.001	
		37 °C	0.078 ± 0.003	0.080 ± 0.003	0.077 ± 0.004	
	6	4 °C	0.080 ± 0.010	0.087 ± 0.002	0.083 ± 0.004	
		24 °C	0.077 ± 0.001	0.083 ± 0.006	0.074 ± 0.001	
		37 °C	0.084 ± 0.003	0.087 ± 0.001	0.081 ± 0.001	

^aValues expressed as the mean ± standard deviation (n = 3). MFJPS = skimmed milk with fruit juice; FJPS = fruit juice; MPS = skimmed milk.

In this sense, the PS profile reported by Maki et al. (8) was β -sitosterol (44%) > sitostanol (25%) > campesterol (12%) > campestanol (6%), and Jones et al. (9) found β -sitosterol to be the most abundant PS, followed by sitostanol and campestanol. However, no campesterol in the beverages of Jones et al. (9) and no stigmasterol in both studies were detected. Furthermore, the percentage of the different PS obtained in our samples complied with current legislation: < 80% β -sitosterol, < 40% campesterol, < 30% stigmasterol, < 3% brassicasterol, < 15% sitostanol, < 5% campestanol, and < 3% other sterols/stanols (13).

A three-way ANOVA (sample, temperature, and time of storage) was applied to total PS and individual PS contents in the three PS-enriched beverages. There were no significant differences considering time and temperature factors for total PS and individual PS. Therefore, no loss in initial total PS content had occurred during 6 months of storage, with values being the same at any given storage time point (see **Table 2**). Considering the sample factor, FJPS beverages showed higher values ($p < 0.05$) than the MFJPS samples for total PS content, with MPS samples not differing with both of them (**Figure 2**). Likewise, when each PS was considered individually, significant differences were found among samples. FJPS beverages showed a higher content ($p < 0.05$) than MFJPS samples for all individual PS studied. In addition, FJPS showed a greater content ($p < 0.05$) than MPS for all phytosterols (campesterol, stigmasterol, and β -sitosterol), but not for phytostanols (campestanol and sitostanol). Taking into account that PS were added with the same amount to the beverages, it seems that a probable matrix effect could explain the differences found among samples though these differences can be considered without physiological relevance.

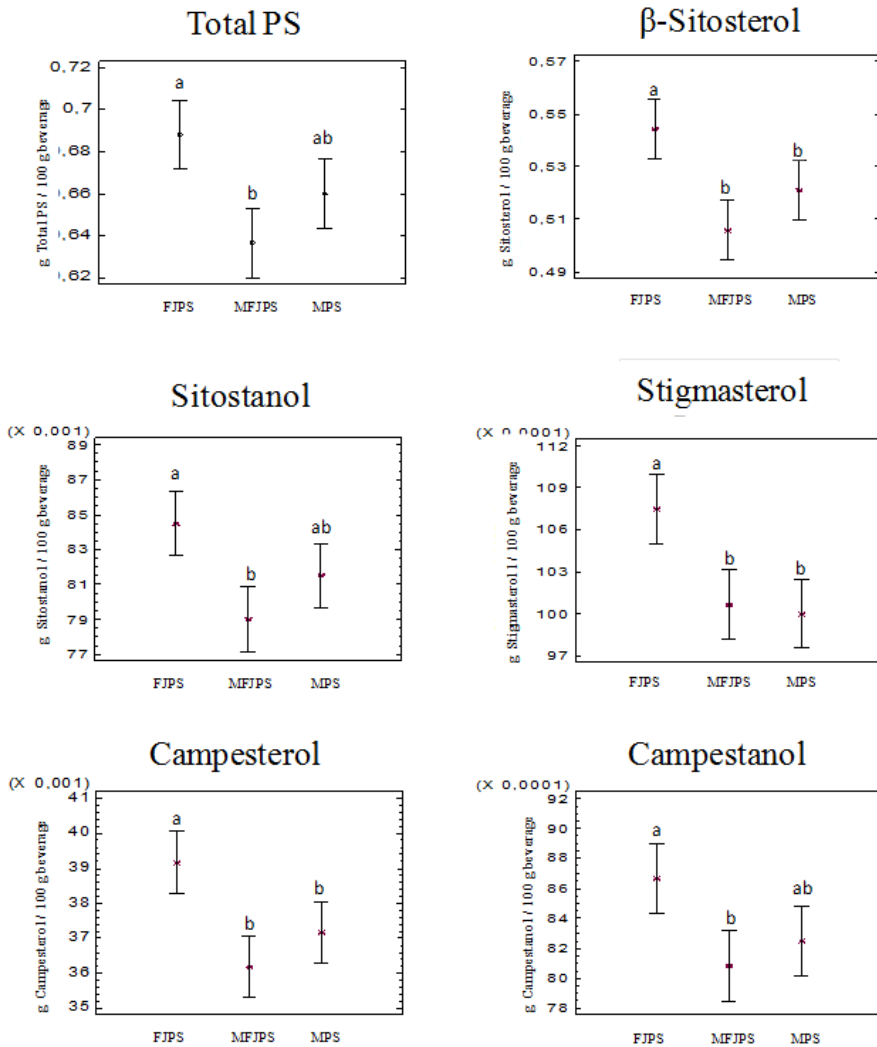


Figure 2. Total and individual PS contents (g/100 g beverage). Tukey's test: intervals for the means (sample factor). Noncoincidences of letters in each plot indicate statistically significant differences. MFJPS: skimmed milk with fruit juice and plant sterols. FJPS: fruit juice with plant sterols. MPS: skimmed milk with plant sterols.

Therefore, the samples studied (MFJPS, FJPS, and MPS) were stable under the assayed conditions. Some nonsignificant decreases in PS contents of FJPS and MPS samples at 24 °C were detected, with variations no greater than 9%. These slight decreases in PS content during storage were of the same order as those reported by other authors. A study with a commercial milk enriched with phytosterols treated under Schaal oven conditions (65 °C/24 h, equivalent to one month of storage at room temperature) reported values only 4% lower than the control, due to the antioxidants (such as vitamin E) included in the formulation, in contrast to the greater decrease (60%) observed with a drastic heating treatment (90 °C/15 min); in both cases, there were statistically significant differences among treatments and with the control (6). Moreover, a study addressing the oxidative stability of PS in phytosterol-enriched heat-treated milk stored during 6 months at room temperature (20 °C) and in a refrigerator (4 °C) (5) showed rather similar changes at both temperatures, with PS decreases between 1.3% and 10%. In both studies, the authors found low levels of several phytosterol oxidation products, but this fact did not imply an apparent drop in phytosterols amount; in this sense, their results were in agreement with the fact that PS stability was well guaranteed during the shelf life of the product.

Antioxidant Parameters. Total carotenoids of beverages only containing fruit juice (MFJPS and FJPS) (since carotenoids content in MPS is negligible) enriched with PS during storage at 4, 24, and 37 °C over a 6 month period are presented in **Table 3**.

The mean total carotenoid contents of the samples analyzed in the present study comprised between 0.054 and 0.265 mg/ 100 mL, these

being values that fall within the range of 0.009 to 26.1 mg/100 mL previously described for different juice–milk beverages containing fruits of citrus origin in their formulation and marketed in Spain (23).

Table 3. Total Carotenoids (mg β -Carotene/100 mL Beverage) and Total Polyphenols (mg GAE/100 mL Beverage) in PSEnriched Beverages Just after Manufacture and after Storage^a

Sample	0 months		2 months	4 months	6 months
<i>Total carotenoids</i>					
MFJPS	0.112 ± 0.011	4 °C	0.097 ± 0.013	0.131 ± 0.021	0.136 ± 0.007
		24 °C	0.084 ± 0.004	0.082 ± 0.009	0.095 ± 0.008
		37 °C	0.067 ± 0.002	0.054 ± 0.006	0.059 ± 0.009
FJPS	0.265 ± 0.043	4 °C	0.167 ± 0.004	0.178 ± 0.012	0.192 ± 0.013
		24 °C	0.165 ± 0.008	0.137 ± 0.030	0.167 ± 0.010
		37 °C	0.148 ± 0.006	0.156 ± 0.014	0.164 ± 0.008
<i>Total polyphenols</i>					
MFJPS	705.86 ± 9.44	4 °C	601.16 ± 24.06	554.56 ± 29.40	579.42 ± 15.94
		24 °C	631.10 ± 26.28	630.67 ± 14.13	630.47 ± 23.39
		37 °C	613.63 ± 12.96	671.45 ± 38.54	603.67 ± 4.42
FJPS	618.37 ± 40.33	4 °C	509.12 ± 30.24	542.60 ± 12.46	623.58 ± 15.94
		24 °C	540.30 ± 26.46	529.01 ± 33.95	674.63 ± 15.32
		37 °C	613.88 ± 36.91	640.46 ± 26.22	666.97 ± 13.26

^aValues are expressed as the mean ± standard deviation (n = 3). MFJPS: skimmed milk with fruit juice and plant sterols. FJPS: fruit juice with plant sterols.

An ANOVA with three factors (sample, temperature, and time of storage) was applied to the results obtained (**Figure 3**). Considering the sample factor, FJPS beverages showed a total carotenoid content greater ($p < 0.05$) than that of MFJPS samples. In addition, the values decreased 36% ($p < 0.05$) with storage time at two months and then remained stable

until the end of the storage period (6 months), the degradation of carotenoids being greater ($p < 0.05$) at 24 and 37 °C than at 4 °C. The greatest reduction in total carotenoids (52%) (see **Table 3**) was observed in MFJPS stored for 4 months at 37 °C. This result is similar to that reported for a pasteurized orange juice–milk beverage stored for 42 days at 4 °C, with a 38% decrease in total carotenoids (24). However, Plaza et al. (25) reported small losses of total carotenoids ($< 11\%$) in a pasteurized orange juice during 40 days of refrigerated storage at 4 °C. These authors relate the stability of carotenoids to the protection which ascorbic acid offers them against oxidation. In this sense, Choi et al. (26) reported that orange juice fortified with ascorbic acid (30 mg/100 mL) showed lower losses of total carotenoid content than the control juice (2.8% and 6.6%, respectively) after 7 weeks of storage at 4.5 °C. Nevertheless, in our study, the ascorbic acid contents were under 6 mg/100 mL in all just manufactured samples because ascorbic acid was not added to the beverages, and samples were thermally treated for pasteurization, these being facts that would explain a lesser protection from total carotenoids degradation, hence the differences found with the above-mentioned study.

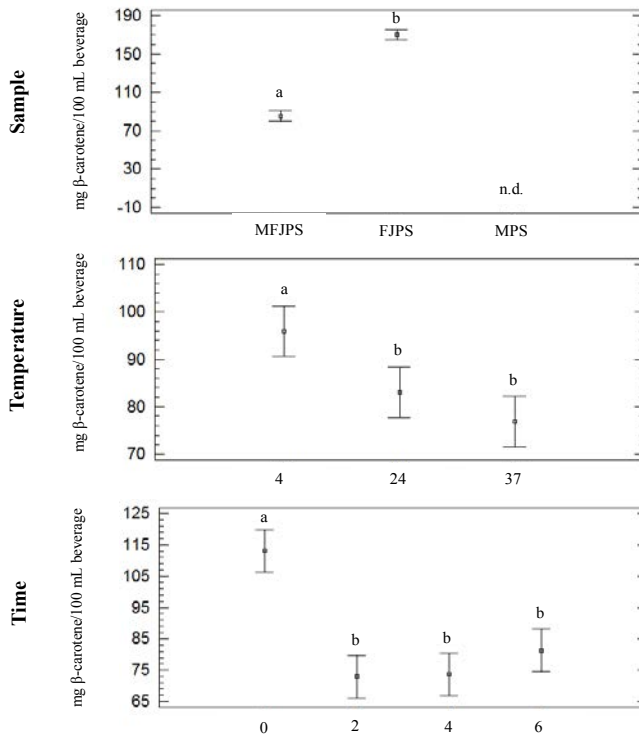


Figure 3. Total carotenoids (mg β-carotene/100 mL beverage). Tukey's test: intervals of the means (sample, temperature, and time factor). Noncoincidences of letters in each plot indicate statistically significant differences. MFJPS: skimmed milk with fruit juice and plant sterols. FJPS: fruit juice with plant sterols. MPS: skimmed milk with plant sterols.

Results concerning the changes in total polyphenols of beverages only containing fruit juice (MFJPS and FJPS) (since in MPS are negligible) enriched with PS during storage at 4, 24, and 37 °C over a 6 month period are presented in **Table 3**.

The mean total polyphenols of the PS-enriched beverages ranged between 509 and 706 mg GAE/L, in agreement with values reported for orange juices stored at 18, 28, and 38 °C during 6 months (507 to 684 mg CAE/L) (27) and for different juice–milk beverages containing fruits of citrus origin in their formulation (265 to 999 mg GAE/L) (23). According to the statistical analysis (three-way ANOVA) (**Figure 4**), MFJPS beverages had a higher ($p < 0.05$) total polyphenol content than their counterpart sample without milk.

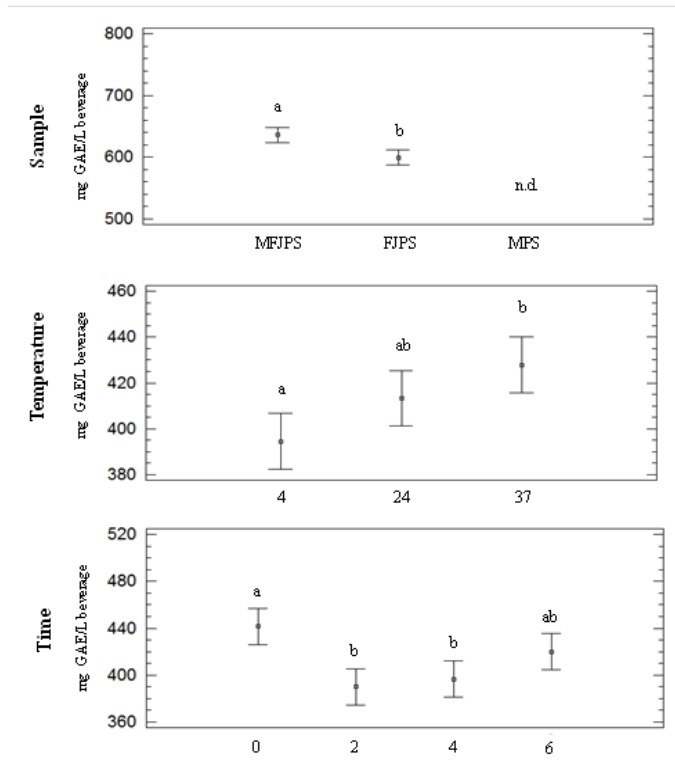


Figure 4. Total polyphenols (mg GAE/L). Tukey's test: intervals of the means (sample, temperature, and time factor). Noncoincidences of letters in each plot indicate statistically significant differences. MFJPS: skimmed milk with fruit juice and plant sterols. FJPS: fruit juice with plant sterols. MPS: skimmed milk with plant sterols.

However, considering the temperature factor, total polyphenols were surprisingly higher ($p < 0.05$) at 37 °C versus 4 °C. This same behavior has been reported for commercial tomato juices, whose total phenolic and flavonoid contents were found to be higher at 37 °C than at 8 and 22 °C after 8 months of storage (21). These authors attribute this observation to the hypothetical formation of the Maillard reaction products via nonenzymatic browning that can react with Folin–Ciocalteu's reagent, resulting in an overestimation of phenolic compound content. In the case of the storage time factor, there were fluctuations in total polyphenols throughout the entire storage period. There was a decrease ($p < 0.05$) at two months that was maintained until four months, followed by recovery to initial values at six months. These

results were in agreement with those of Klimczak et al. (27) who reported a decline in total polyphenols of two commercial orange juices after four months of storage at 18, 28, and 38 °C, followed by a significant increase in these compounds at the end of storage (6 months), though without reaching the initial contents. Likewise, Piljac-Zegarac et al. (28) reported fluctuations in total polyphenols in different dark fruit juices during 29 days of refrigerated storage at 4 °C without a lowering of the initial phenolic content. These authors (27, 28) consider that this phenomenon could be due to the formation of some compounds during storage that react with Folin–Ciocalteu’s reagent, thus enhancing total phenolic content.

The total antioxidant capacity (TAC) of beverages enriched with PS is shown in **Table 4**

Table 4. Total antioxidant capacity (μM Trolox) determined by TEAC method in PS-enriched beverages just after manufacture and after storage^a.

Sample	0 months		2 months	4 months	6 months
MFJPS	888.59 \pm 9.92	4 °C	720.67 \pm 74.44	883.71 \pm 78.86	842.80 \pm 45.61
		24 °C	747.66 \pm 74.23	1083.00 \pm 83.23	1039.83 \pm 94.17
FJPS	572.71 \pm 24.64	37 °C	825.97 \pm 60.39	882.88 \pm 44.54	870.94 \pm 39.50
		4 °C	727.62 \pm 72.42	590.87 \pm 59.72	723.51 \pm 29.68
		24 °C	675.66 \pm 62.50	712.25 \pm 58.50	717.29 \pm 45.06
MPS	107.87 \pm 9.92	37 °C	766.23 \pm 88.97	772.80 \pm 52.70	931.82 \pm 71.44
		4 °C	10.26 \pm 0.59	223.31 \pm 10.65	206.34 \pm 9.19
		24 °C	15.24 \pm 1.18	142.39 \pm 1.74	202.40 \pm 1.96
		37 °C	20.22 \pm 4.68	135.19 \pm 13.55	211.41 \pm 3.19

^aValues are expressed as mean \pm standard deviation (n = 3). MFJPS: Skimmed milk with fruit juice and plant sterols. FJPS: Fruit juice with plant sterols. MPS: Skimmed milk with plant sterols.

The mean TAC ranged between 573 and 1083 μM Trolox for MFJPS and FJPS and between 10 and 223 μM Trolox for MPS. Results of fruit juice-containing beverages (MFJPS and FJPS) are coincident with those previously reported for different juice–milk beverages containing fruits of citrus origin in their formulation (610 to 3600 μM Trolox) (23), while results of milk beverage (MPS) agree with those for hydrophilic antioxidant capacity reported in UHT full-fat milk (118 μM Trolox), with negligible lipophilic antioxidant capacity values (29). They furthermore also agree with the hydrophilic TEAC results of skimmed milk (~ 27 μM Trolox) of three beverages based on fruit juice, milk, and cereals (30). In general, hydrophilic antioxidant activity accounts for $> 90\%$ of the total antioxidant capacity of fruits and vegetables (31). Accordingly, fruit juice-containing beverages (MFJPS and FJPS) showed values of hydrophilic antioxidant activity ranging between 87 and 98%. In the case of milk beverage (MPS), with the exception of the two months time period in which hydrophilic antioxidant capacity accounted for 100%, these values ranged between 61 and 79%.

The pronounced decrease in MPS at 2 months of storage could be related to the heat treatment of milk in the manufacture process which can promote an increase in its pro-oxidant activity, mainly due to the formation of novel oxidative molecules in the early stages of the Maillard reaction. (32) In turn, a sample containing fruit juice and milk (MFJPS) showed a low decrease in TAC at this time point probably due to the interaction between polyphenol and milk. Accordingly, it has been reported that these kinds of interactions may maintain the total antioxidant capacity of beverages subjected to thermal processing (33).

Taking into account the statistical analysis applied (three-way ANOVA) (**Figure 5**), samples ranked in the following order: MFJPS > FJPS >> MPS ($p < 0.05$). There were no differences considering the temperature factor ($p > 0.05$), though in relation to the storage time factor, fluctuations were seen in TAC throughout the storage period. There was a nonsignificant descent at two months, followed by recovery ($p < 0.05$) of the initial values at four months, and a final increase was recorded at 18% ($p < 0.05$) in TAC versus the initial values at 6 months of storage. These results are in agreement with the 13% increase in TAC measured by the TEAC method, between the beginning and end of storage (4.5 months at 4 °C) of fruit beverages with/without iron and/or zinc and/or milk (20). This fact seems to be related to the formation of novel compounds with antioxidant activity (later Maillard reaction products formed during prolonged storage possess potent antioxidant properties) (27, 34). Besides, changes in the protein structure can increase the antioxidant capacity since casein and whey proteins have been regarded to have antioxidant activity (35, 36).

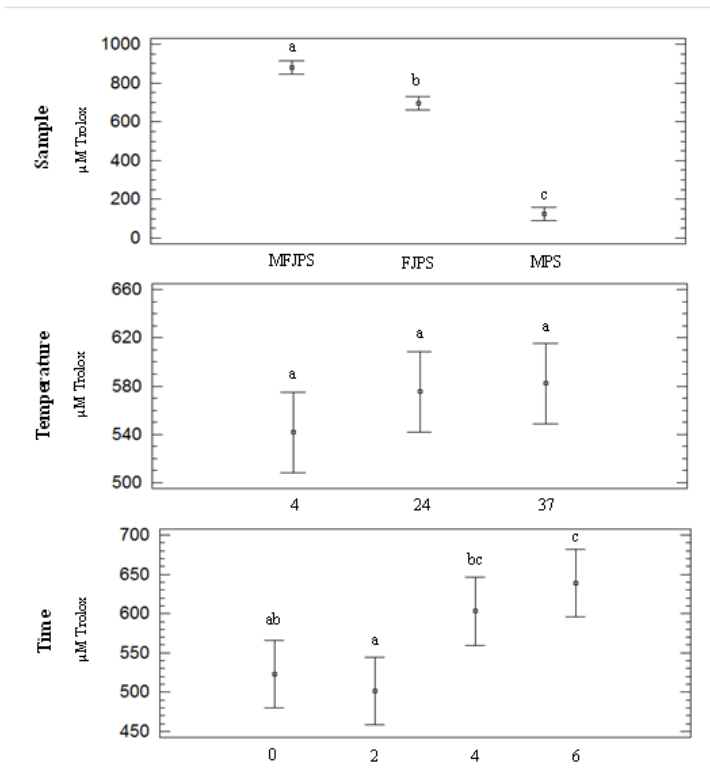


Figure 5. Total antioxidant capacity ($\mu\text{M Trolox}$) (TEAC method). Tukey's test: intervals of the means (sample, temperature, and time factor) Noncoincidences of letters in each plot indicate statistically significant differences. MFJPS: skimmed milk with fruit juice and plant sterols. FJPS: fruit juice with plant sterols. MPS: skimmed milk with plant sterols.

Increased browning during the production and/or storage of processed foods is influenced by diverse factors such as Maillard and enzymatic browning, ascorbic acid degradation, and the polymerization of anthocyanins with other phenolics (37). Thus, in order to clarify whether increases in total polyphenols and TAC are related to browning derived from Maillard reaction product formation, color differences (ΔE) were determined (**Table 5**).

Table 5. Changes in Color in PS-Enriched Beverages Just after Manufacture and after Storage: Difference in Color (ΔE) Parameter^a.

Sample		2 months	4 months	6 months
MFJPS	4 °C	2.28 ± 0.05	2.92 ± 0.08	3.08 ± 0.01
	24 °C	2.44 ± 0.01	4.96 ± 0.01	5.04 ± 0.01
	37 °C	5.80 ± 0.03	8.72 ± 0.01	10.89 ± 0.02
FJPS	4 °C	0.99 ± 0.08	2.31 ± 0.11	0.78 ± 0.02
	24 °C	3.28 ± 0.24	4.16 ± 0.10	7.40 ± 0.04
	37 °C	7.16 ± 0.06	12.24 ± 0.02	15.90 ± 0.02
MPS	4 °C	2.37 ± 0.11	2.46 ± 0.02	2.00 ± 0.02
	24 °C	2.45 ± 0.05	2.65 ± 0.09	1.36 ± 0.01
	37 °C	2.16 ± 0.01	1.67 ± 0.25	5.76 ± 0.01

^aValues are expressed as the mean ± standard deviation (n = 3). MFJPS: skimmed milk with fruit juice and plant sterols. FJPS: fruit juice with plant sterols. MPS: skimmed milk with plant sterols.

On considering the statistical analysis applied (three-way ANOVA), ΔE showed differences ($p < 0.05$) (**Figure 6**) between fruit juice-containing beverages (MFJPS and FJPS) and milk beverage (MPS), the latter showing the lowest changes. Concerning the temperature factor, there were temperature-dependent modifications in ΔE (being greatest at 37 °C). This fact is coincident with the temperature-dependent increase in total polyphenols (see **Figure 4**), which could correlate the increase in polyphenols at 37 °C with the formation of Maillard reaction products via nonenzymatic browning. Differences in ΔE also increased over time (with statistically significant differences ($p < 0.05$) between 2 and 6 months), in agreement with the results reported in a dessert made from dark-red concentrated juices resulting in a color change to a more brownish shade (37). This observation can explain the progressive increase in total polyphenols and TAC seen from month 2 to month 6 (see **Figures 4 and 5**), ascribed to later Maillard reaction products formed during prolonged storage.

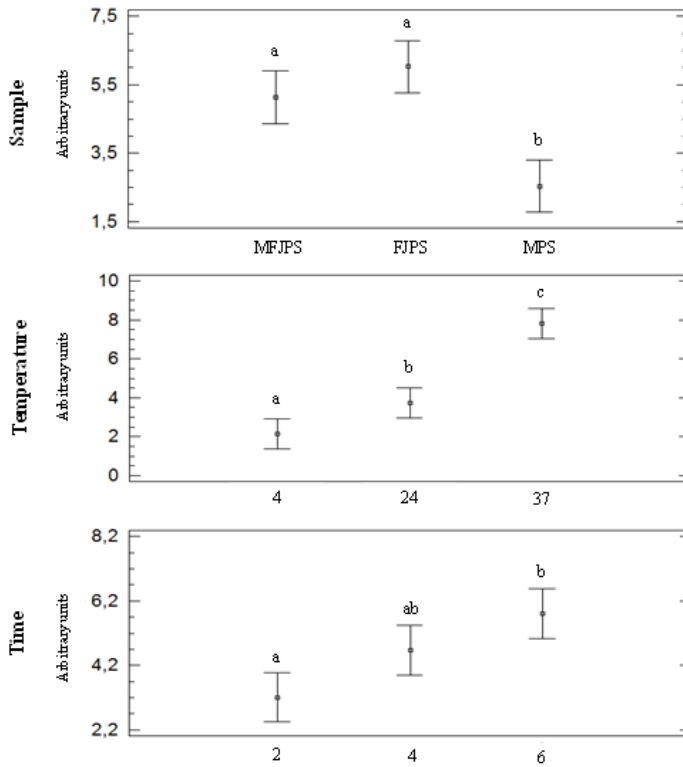


Figure 6. Color differences (ΔE). Tukey's test: intervals of the means (sample, temperature, and time factor).

Noncoincidences of letters in each plot indicate statistically significant differences.

MFJPS: skimmed milk with fruit juice and plant sterols. FJPS: fruit juice with plant sterols.

MPS: skimmed milk with plant sterols.

Another important issue to address is the linkage between PS stability and antioxidant parameters. To our knowledge, there are no studies relating PS stability in fruit–milk beverages with/without storage. However, it has been reported that natural antioxidants such as green tea catechins, α -tocopherol, and quercetin (38), or rosemary and green tea extracts (39) exert protective effects upon the oxidative stability of PS during heating in food matrixes of fat origin such as lard, corn oil, and olive oil, or rapeseed oil, respectively; however, in these studies, storage has not been assessed. The determination of total carotenoids, total polyphenols, total antioxidant capacity, and color can serve as

complementary measures to check PS stability during product shelf life since depending on the evolution in the content of antioxidants in the whole period of study, the fate of PS content can be explained. In light of the results obtained in this study, the increase in total antioxidant capacity, due to the formation of Maillard reaction products, as proved by color parameters, might have helped in the maintenance of PS contents throughout the entire storage period. Nevertheless, authors have not found a correlation between PS contents and TAC values.

In summary, it can be concluded that the studied storage times and temperatures did not affect PS stability of the PS-enriched beverages, these beverages being an adequate PS source throughout the storage period studied. Therefore, the inclusion of these functional ingredients in a food matrix containing antioxidant compounds (polyphenols, carotenoids, and antioxidant proteins) would be a good choice for maintaining the initial PS contents, and the functional beverages could be ingested whenever during the period of their shelf life, making the most out of the potential health benefits of PS.

REFERENCES

- (1) García-Llatas, G.; Rodríguez-Estrada, M. T. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chem. Phys. Lipids* 2011, 164, 607–624.
- (2) Hernández-Mijares, A.; Bañuls, C.; Rocha, M.; Morillas, C.; Martínez-Triguero, M. L.; Víctor, V. M.; Lacomba, R.; Alegría, A.; Barberá, R.; Farré, R.; Lagarda, M. J. Effects of phytosterol ester-enriched

low-fat milk on serum lipoprotein profile in mildly hypercholesterolaemic patients are not related to dietary cholesterol or saturated fat intake. *Br. J. Nutr.* 2010, 11, 1–8.

(3) Clifton, P. M.; Noakes, M.; Sullivan, D.; Erichsen, N.; Ross, D.; Annison, G.; Fassoulakis, A.; Cehun, M. Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004, 58, 503–509.

(4) Noakes, M.; Clifton, P. M.; Doornbos, A. M. E.; Trautwein, E. A. Plant sterol ester-enriched milk and yoghurt effectively reduce serum cholesterol in modestly hypercholesterolemic subjects. *Eur. J. Nutr.* 2005, 44, 214–222.

(5) Soupas, L.; Huikko, L.; Lampi, A.-M.; Piironen, V. Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 222, 266–273.

(6) Menendez-Carreño, M.; Ansorena, D.; Astiasarán, I. Stability of sterols in phytosterol-enriched milk under different heating conditions. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 9997–10002.

(7) Barnsteiner, A.; Lubinus, T.; Di Gianvito, A.; Schmid, W.; Engel, K.-H. GC-based analysis of plant Stanyl fatty acid esters in enriched foods. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 5204–5214.

(8) Maki, K. C.; Shinnick, F.; Seeley, M. A.; Veith, P. E.; Quinn, L. C.; Hallissey, P. J.; Temer, A.; Davidson, M. H. Food products containing free tall oil-based phytosterols and oat beta-glucan lower serum total and

LDL cholesterol in hypercholesterolemic adults. *J. Nutr.* 2003, 133, 808–813.

(9) Jones, P. J. H.; Vanstone, C. A.; Raeini-Sarjaz, M.; St-Onge, M.-P. Phytosterols in low- and nonfat beverages as part of a controlled diet fail to lower plasma lipid levels. *J. Lipid Res.* 2003, 44, 1713–1719.

(10) Shin, M. J.; Rim, S. J.; Jang, Y.; Choi, D.; Kang, S. M.; Cho, S. Y.; Kim, S. S.; Kim, D. K.; Song, K.; Chung, N. The cholesterol-lowering effect of plant sterol-containing beverage in hypercholesterolemic subjects with low cholesterol intake. *Nutr. Res. (N.Y.)* 2003, 23, 489–496.

(11) Devaraj, S.; Jialal, I.; Vega-López, S. Plant sterol-fortified orange juice effectively lowers cholesterol levels in mildly hypercholesterolemic healthy individuals. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 2004, 24, 25–28.

(12) Devaraj, S.; Autret, B. C.; Jialal, I. Reduced-calorie orange fruit beverage with plant sterols lowers C-reactive protein concentrations and improves the lipid profile in human volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 84, 756–761.

(13) Commission Decision 2004/336/EC of 31 March 2004 authorizing the placing on the market of yellow fat spreads, milk based fruit drinks, yoghurt type products and cheese type products with added phytosterols/phytostanols as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Comm.* 2004, L105, 49–51.

- (14) Normen, L.; Frohlich, J. Role of Plant Sterols in Cholesterol Lowering. In *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*; Dutta, C., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, NY, 2004; pp 243–315.
- (15) Saraiva, D.; da Conceição Castilho, M.; da Rosário Martins, M.; Noronha da Silveira, M. I.; Ramos, F. Evaluation of phytosterols in milk and yogurts used as functional foods in Portugal. *Food Anal. Methods* 2011, 4, 28–34.
- (16) Clement, L. M.; Hansen, S. L.; Costin, C. D.; Perri, G. L. Quantitation of sterols and sterol esters in fortified foods and beverages by GC/FID. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2010, 87, 973–980.
- (17) Boselli, E.; Velazco, V.; Caboni, M. F.; Lercker, G. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *J. Chromatogr., A* 2001, 917, 239–244.
- (18) González-Larena, M.; García-Llatas, G.; Vidal, M. C.; Sánchez-Siles, L. M.; Barberá, R.; Lagarda, M. J. Stability of plant sterols in ingredients used in functional foods. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 3624–3631.
- (19) Lee, H. S.; Castle, W. S.; Coates, G. A. High performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. *J. Chromatogr., A* 2001, 913, 371–377.

(20) Cilla, A.; Perales, S.; Lagarda, M. J.; Barberá, R.; Clemente, G.; Farré, R. Influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *J. Food Compos. Anal.* 2011, 24, 87–94.

(21) García-Alonso, F. J.; Bravo, S.; Casas, J.; Pérez-Conesa, D.; Jacob, K.; Periago, M. J. Changes in antioxidant compounds during the shelf life of commercial tomato juices in different packaging materials. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 6815–6822.

(22) Calvo, C. Optical Properties. In *Handbook of Food Analysis. Physical Characterization and Nutrient Analysis*; Nollet, L. M. L., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, NY, 2004; Vol. 1, pp 1–19.

(23) Zulueta, A.; Esteve, M. J.; Frasquet, I.; Frígola, A. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chem.* 2007, 103, 1365–1374.

(24) Zulueta, A.; Barba, F. J.; Esteve, M. J.; Frígola, A. Effects on the carotenoid pattern and vitamin A of a pulsed electric field-treated orange juice-milk beverage and behaviour during storage. *Eur. Food Res. Technol.* 2010, 231, 525–534.

(25) Plaza, L.; Sánchez-Moreno, C.; De Ancos, B.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O.; Cano, M. P. Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. *LWT-Food Sci. Technol.* 2011, 44, 834–839.

- (26) Choi, M. H.; Kim, G. H.; Lee, H. S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Res. Int.* 2002, 35, 753–759.
- (27) Klimczak, I.; Malecka, M.; Szlachta, M.; Gliszczynska-Swiglo, A. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J. Food Compos. Anal.* 2007, 20, 313–322.
- (28) Piljac-Zegarac, J.; Valek, L.; Martinez, S.; Belscak, A. Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chem.* 2009, 113, 394–400.
- (29) Pulido, R.; Hernández-García, M.; Saura-Calixto, F. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2003, 57, 1275–1282.
- (30) Perales, S.; Barberá, R.; Lagarda, M. J.; Farré, R. Antioxidant capacity of infant fruit beverages: influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion. *Nutr. Hosp.* 2008, 23, 547–553.
- (31) Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4026–4037.

(32) Calligaris, S.; Manzocco, L.; Anese, M.; Nicoli, M. C. Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *Int. Dairy J.* 2004, 14, 421–427.

(33) Wegrzyn, T. F.; Farr, J. M.; Hunter, D. C.; Au, J.; Wohlers, M. W.; Skinner, M. A.; Stanley, R. A.; Sun-Waterhouse, D. Stability of antioxidants in an apple polyphenol-milk model system. *Food Chem.* 2008, 109, 310–318.

(34) Lee, H. S. Antioxidative activity of browning reaction products isolated from storage-aged orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 550–552.

(35) Elías, R. J.; Kellerby, S. S.; Decker, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008, 48, 430–441.

(36) Clausen, M. R.; Skibsted, L. H.; Stagsted, J. Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 2912–2919.

(37) García-Alonso, F. J.; Periago, M. J.; Vidal-Guevara, M. L.; Cantos, E.; Ros, G.; Ferreres, F.; Abellán, P. Assessment of the antioxidant properties during storage of a dessert made from grape, cherry, and berries. *J. Food Sci.* 2003, 68, 1525–1530.

(38) Xu, G.; Guan, L.; Sun, J.; Chen, Z. Oxidation of cholesterol and β -sitosterol and prevention by natural antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 9284–929.


(39) Kmiecik, D.; Korczak, J.; Rudzińska, M.; Michałowska, A. M.; Hés M. Stabilization of phytosterols in rapeseed oil by natural antioxidants during heating. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2009, 111, 1124–1132.

Funding. This study was financed by AGL2008-02591-C02-01 (CICYTFEDER) and partially funded by Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063. M.G.-L. holds a Danone grant from Instituto Danone (Spain). Thanks are also due to the Generalitat Valenciana (Spain) for financial support (GVACOMP2011- 195) of the Bionutest group.

Notes The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Hero España, S.A. for providing the beverages tested in the present study.



Plant sterol oxides in functional beverages: influence of matrix and storage

Food Chemistry (en revisión)

Plant sterol oxides in functional beverages: influence of matrix and storage

Marina González-Larena¹, Guadalupe Garcia-Llatas¹, Gonzalo Clemente²,
Reyes Barberá¹, María Jesús Lagarda^{1*}

¹Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 - Burjassot (Valencia) Spain

²Department of Statistics. Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 – Valencia, Spain

ABSTRACT

Three plant sterol (PS)-enriched beverages, milk based fruit juice (MFJPS), fruit juice (FJPS) and milk beverage (MPS), were stored at 4, 24, or 37 °C and analyzed at regular time intervals of two months until 6 months. PS stability was analyzed from the production of phytosterol oxidation products (POPs). The β -sitosterol oxides (7 α /7 β -hydroxy, β / α -epoxy, triol, and 7-keto) and campesterol oxides (β / α -epoxy, and 7-keto) were detected in all beverages and at all storage times and temperatures. Total POP contents followed the order MPS >> FJPS > MFJPS. In general, the beverages showed low PS oxidation levels (<0.17%). Predictive models of POP content versus storage time were established. These models explain total POP content by over 75% and individual POP content by over 50%. We propose 7-ketositosterol and 7-ketocampesterol as PS oxidation markers during storage of beverages of this kind.

KEYWORDS: *Plant sterol oxidation products, POPs, oxysterols, beverage, functional foods, phytosterol stability.*

1. INTRODUCTION

Plant sterols (PS) are currently used as functional food ingredients due to their capacity to reduce low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels. PS consumption (2 g/day) results in a cholesterol reduction of approximately 10%, and the European Atherosclerosis Society Consensus Panel has concluded that functional foods with PS may be considered in patients with high cholesterol levels at intermediate and low global cardiovascular risk who do not qualify for drug treatment (Gylling, Plat, Turley, Ginsberg, Ellegård, Jessup et al., 2014). In addition, PS have been described as antiinflammatory and anticancer compounds (Marangoni & Poli, 2010; García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). A large variety of commercial foods have been enriched with free or esterified PS, including spreads, which were the first commercial applications of PS-enriched foods. Since the approval of PS-enriched spreads in the European Union, several more approvals have been issued for the addition of PS to other food categories such as milk-based fruit beverages (Commission Decision 2004/336/EC).

During processing and storage it is essential to maintain the quality and safety of PS-enriched foods, since PS are susceptible to oxidation like all unsaturated lipids, and a decrease in initial PS content could occur as a result (Kamal-Eldin & Lampi, 2008). One way of improving the oxidative stability of PS used for enrichment would be to include them in a matrix with natural antioxidant compounds such as milk based fruit beverages.

On the other hand, the compounds resulting from PS oxidation (phytosterol oxidation products (POPs)) could exert toxic effects qualitatively similar to those of cholesterol oxidation products (COPs),

which have been extensively studied and are now known to be implicated in the initiation and progression of major chronic diseases (atherosclerosis, neurodegenerative processes, diabetes, etc.) (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011; Vanmierlo, Husche, Schött, Pettersson & Lütjohann, 2013; Alemany, Barberá, Alegría & Laparra, 2014).

Regarding POP contents in PS-enriched dairy matrixes, only two studies have been made involving PS-enriched whole milk powder stored for 12 months and PS-enriched non-fat milk stored for 6 months (Soupas, Huikko & Lampi, 2006), and a phytosterol enriched milk subjected to Schaal oven conditions (equivalent to one month of storage at room temperature) (Menéndez-Carreño, Ansorena & Astiasarán, 2008). Another storage study has been made of PS-enriched margarine stored for 18 weeks at 4 °C and 20 °C (Rudzinska, Przybylski & Wasowicz, 2014).

Only three studies published by our group have evaluated PS stability and POP contents in functional beverages. Quantification has been made of POPs from two fruit beverages and two milk-based fruit beverages enriched with two different plant sterol sources (free PS from tall oil and esterified PS from vegetable oils), elaborated on a laboratory scale. Only POPs from β -sitosterol were detected. No differences in β -sitosterol oxidation percentage were recorded when free or esterified PS were used as enrichment source (Alemany-Costa, González-Larena, García-Llatas, Alegría, Barberá, Sánchez-Siles et al., 2012).

In a later study involving beverages of this kind but produced on an industrial scale and enriched with free PS from tall oil, again only POPs from β -sitosterol were detected - though the total POPs content was 10-fold lower than when preparation was on a laboratory scale. This indicates that the beverages manufactured on an industrial scale have a lesser oxidation

stage (Alemany, Cilla, Garcia-Llatas, Rodríguez-Estrada, Cardenia & Alegría, 2013).

In the functional beverages employed in this work, phytosterol stability and antioxidant parameters were assessed during 6 months of storage at 4 °C, 24 °C, and 37 °C in three PS-enriched functional beverages (González-Larena, Cilla, García-Llatas, Barberá & Lagarda, 2012). The results showed that the studied storage time and temperatures did not affect the PS contents in the samples. However, if part of the PS were oxidized to POPs, these could be present in very low concentrations (in the µg/100 g range), which would not imply a drop in the amount of PS.

Since storage can increase the POP contents, and in view of the fact that this phenomenon has not been previously evaluated in any PS-enriched functional beverage, the present study was carried out to determine the influence of the matrix, temperature and storage time upon the POP contents in these beverages, in order to confirm that they are adequate PS vehicles during their shelf life.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals and reagents

Standards used were cholest-5-ene-3β, 19-diol (19-hydroxycholesterol) (purity: 95%) used as internal standard (IS) in POPs quantification, (24R)-methylcholest-5-en-3β-ol (campesterol) (purity: 98.6%), cholest-5-ene-3β,7α-diol (7α-hydroxycholesterol) (purity: 98.6%) and (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3β-ol-7-one (7-ketostigmasterol) (purity: 98.6%), purchased from Steraloids (Newport, RI, USA). (24S)-Ethylcholest-5,22-dien-3β-ol

(stigmasterol) (purity: 95%), cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (cholestanetriol) (purity: 98%), cholest-5-ene-3 β ,7 β -diol (7 β -hydroxycholesterol) (purity: 95%), 5 α ,6 α -epoxycholestan-3 β -ol (α -epoxycholesterol) (purity: 80%), 5 β ,6 β -epoxycholestan-3 β -ol (β -epoxycholesterol) (purity: 98%) and cholest-5-en-3 β -ol-7-one (7-ketocholesterol) (purity: 90%) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). (24R)-Ethylcholest-5-en-3 β -ol (β -sitosterol, for POPs obtaining by thermo-oxidation) (purity: 78.7% β -sitosterol, with campesterol and sitostanol traces) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland).

Chloroform, diethyl ether, methanol, anhydrous sodium sulfate, acetone, 2-propanol, and anhydrous pyridine were purchased from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA). KOH was from POCH S.A. (Gliwice, Poland), KCl from Panreac (Barcelona, Spain), hexane from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), and butylated hydroxytoluene (BHT) was from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Silylating reagents: hexamethyldisilazane (HMDS) from Fluka (Buchs, Switzerland) and trimethylchlorosilane (TMCS) from Carlo Erba (Rodano, Italy). All reagents were of analytical grade. Ultrapure water was obtained by means of a Millipore Q water purification system (Milford, MA, USA).

2.2. Samples

Three beverages enriched with free microcrystalline PS from tall oil (0.8 g PS/100 mL beverage or 0.68 g PS/100 g beverage) as a source of PS were manufactured in a pilot plant by Hero Spain, S.A. Since PS are insoluble in water, they were supplied in microencapsulated powder form suitable for use in low-fat beverages. Milk based fruit beverage (MFJPS)

composed of skimmed milk, tangerine fruit juice from concentrate, banana puree, grape juice from concentrate, and PS; fruit beverage (FJPS) composed of tangerine fruit juice from concentrate, banana puree, grape juice from concentrate, PS and water to substitute skimmed milk; and milk beverage (MPS) composed of skimmed milk PS, and water to substitute fruit juices were used. The beverages were heat treated at 100-115 °C for 15-30 seconds to obtain a microbiologically stable foodstuff, and were packed under aseptic conditions in sterile plastic containers. The nutritional composition, per 100 g, of the MFJPS, FJPS and MPS was: 72, 30, and 48 kcal, 2.7, 0.5, and 1.6 g of proteins, 14.3, 6.1, and 2.5 g of carbohydrates, and 0.4, 0.2, and 0.2 g of fat (excluding PS), respectively. Samples were analyzed just after manufacture (time 0) and were then stored at 4 °C, 24 °C or 37 °C, and analyzed at regular time intervals of two months up until 6 months. The storage time of 6 months was chosen because the manufacturer of the PS-enriched beverages indicated that within this period the organoleptic properties of the samples are preserved. In addition, this is the common and usual turnover period for products at this kind at sales points, where storage is limited to no more than 6 months. Mean PS contents (g/100 g of beverage) of the samples were: β -sitosterol 0.486-0.556, sitostanol 0.077-0.088, campesterol 0.034-0.040, stigmasterol 0.010-0.011, and campestanol 0.008-0.009 (González-Larena et al., 2012).

2.3. Analysis of phytosterol oxidation products (POPs)

Lipids were extracted according to the procedure of González-Larena et al. (2012). Briefly, an amount of sample (15 g) providing approximately 120 mg of PS was taken. Lipids were extracted with 80 mL of a chloroform:

methanol mixture (1:1, v/v) containing 0.05% of BHT (used as antioxidant to avoid POPs artifact formation during saponification) and homogenized with a Polytron homogenizer (PT 2000, Kinematica AC, Switzerland) during 3 minutes at 250 W. After adding 40 mL of chloroform and mixing again with the Polytron, the sample was filtered (Whatman no. 1, 90 mm, Maidstone, England) through a Buchner funnel. To the filtrate, 20 mL of 1M KCl solution was added and refrigerated overnight. Then, after phase separation, the chloroform phase was concentrated in a rotary evaporator and dried with nitrogen. The lipid fraction was then reconstituted with hexane: 2-propanol (4:1, v/v), dividing the sample into four aliquots for saponification.

Then, the method described by González-Larena, García-Llatas, Vidal, Sánchez-Siles, Barberá & Lagarda (2011) was applied. Briefly, IS (10 μg of 19-hydroxycholesterol) was added to the extracted lipids. Cold saponification was performed at room temperature with 10 mL of methanolic 1N KOH, in darkness and under continuous agitation in an orbital shaker (IKA KS26, Stauffen, Germany) at 150 rpm during 18-20 hours. The unsaponifiable material was extracted with diethyl ether. A fraction (1/2) of the unsaponifiable material was purified by solid-phase extraction (Si-SPE, 3 mL/500 mg, Supelco, Bellefonte, PA, USA), and the acetone fraction obtained was then subjected to derivatization by silylation with HMDS/TMCS in anhydrous pyridine (2:1:5). The trimethylsilyl ether (TMSE) derivatives obtained were dissolved in hexane, filtrated (syringe-driven Millex-FH filter unit, 1 mL, 0.45 μm Millipore, Milford, MA, USA), and evaporated with nitrogen. For chromatographic analyses, the TMSE derivatives were dissolved in 40 μL of hexane, and 1 μL was injected into a

Trace GC-Ultra ITQ ion trap 900 gas chromatograph (GC)-mass spectrometer (MS) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for identification purposes and in a GC-flame ionization detector (FID) (Autosystem XL, Perkin-Elmer, Nortwalk, CT, USA) for quantification purposes. Both instruments were equipped with a CP-Sil 8 low bleed/MS (50 m x 0.25 mm x 0.25 m film thickness) capillary column (Chrompack-Varian, Middelburg, The Netherlands). The carrier gas was hydrogen (1 mL/min), and the oven temperature was initially held at 70 °C for 1 minute, raised to 280 °C at a rate of 30 °C/min, held for 12 minutes, and then increased at 0.7 °C/min to 290 °C and held for 20 minutes. The temperature was then finally raised to 320 °C at 30 °C/min and held for 45 minutes. In the GC-FID the injector and detector temperatures were 325 °C, and a split ratio of 1:10 was applied. The GC-MS programmable temperature vaporization (PTV) injector was set to ballistic heating from 50 to 260 °C at a split ratio of 1:10. The filament emission current was 70 eV, the ion source temperature was 250 °C, and the total ion current mode (TIC, m/z 50-650) was used to identify POPs.

Since standards of POPs are not commercially available (except for 7-ketostigmasterol), and in order to identify POPs contained in the beverages, phytosterol standard solutions (β -sitosterol, campesterol and stigmasterol) were thermo-oxidized, and the resulting POPs were identified by GC-MS using the procedure described by González-Larena et al. (2011). Briefly, POPs derived from the thermo-oxidation of β -sitosterol, campesterol and stigmasterol were separated by silica gel thin-layer chromatography (TLC, 20 cm x 20 cm x 0.25 mm film thickness plates, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, USA), and the different TLC POP fractions, as well as SPE-purified solutions, were then subjected to derivatization by

silylation. The TMSE derivatives were dissolved in 50 μ L of hexane after for the chromatographic analyses. Identification of the POPs obtained was performed on the basis of the resulting fragmentation patterns described in previous studies (García-Llatas, Cercaci, Rodríguez-Estrada, Lagarda, Farré & Lercker, 2008; González-Larena et al. 2011; Alemany-Costa et al., 2012). The elution order of the IS (19-hydroxycholesterol) and POPs (all as TMSE derivatives) was as follows (fragment ions are given in parenthesis, characteristic ion in boldface): 7 α -hydroxycampesterol (m/z **470**, 471, 472), 7 α -hydroxystigmasterol (m/z 470, **483**, 484, 572), 7 α -hydroxysitosterol (m/z **484**, 485, 486), 7 β -hydroxycampesterol (m/z **470**, 471, 472), 7 β -hydroxysitosterol (m/z **484**, 485, 486), β/α -epoxycampesterol (m/z 365, **380**, 382, 383, 398, 455, 470, 473, 488, 498), β -epoxysitosterol (369, 396, 397, **412**, 473, 472, **487**, 502), α -epoxysitosterol (369, 396, 397, **412**, 473, 472, **487**, 502) 7-ketocampesterol (381, 396, 469, 486), sitostanetriol (**431**, 469, 484, 559) and 7-ketositosterol (**395**, 410, 483, **500**). **Figure 1** shows GC-FID and GC-MS chromatograms of the identified POPs obtained by the thermo-oxidation process. A good baseline separation was achieved by GC-FID for the common POPs generated from three major phytosterols (**Figure 1.b**). The POPs which were co-eluted or had a poor baseline separation were 7 α -hydroxycampesterol/19-hydroxycholesterol; 7 α -hydroxysitosterol/unknown compound (m/z 417, 455, 470, 531, 545, 560); 7 β -hydroxycampesterol/non-oxidized β -sitosterol.

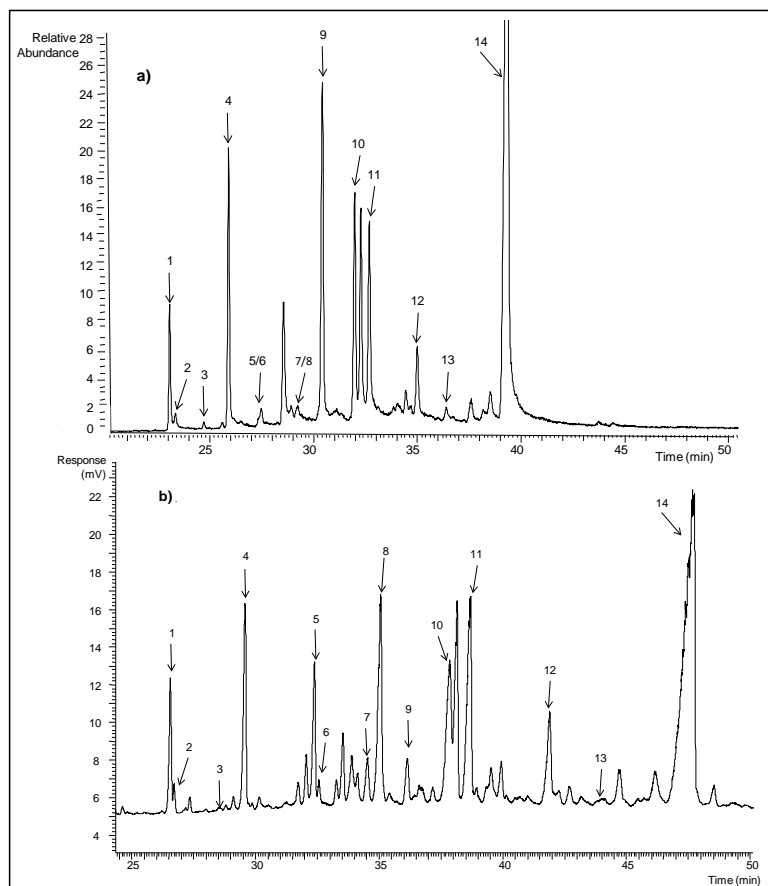


Figure 1. GC-MS (a) and GC-FID (b) chromatograms of the identified POPs obtained by the thermo-oxidation process. Peaks numbered corresponding to: 1: 19-hydroxycholesterol (IS); 2: 7 α -hydroxycampesterol; 3: 7 α -hydroxystigmasterol; 4: 7 α -hydroxysitosterol; 5: β -sitosterol; 6: 7 β -hydroxycampesterol; 7: β -epoxycampesterol; 8: α -epoxycampesterol; 9: 7 β -hydroxysitosterol; 10: β -epoxysitosterol; 11: α -epoxysitosterol; 12: 7-ketocampesterol; 13: sitostanetriol; 14: 7-ketositosterol.

Due to the structural similarity between COPs and POPs, and the lack of POP standards, calibration curves using a mixture of COP standards containing 5 μ g of IS (19-hydroxycholesterol) were performed in 5

replicates for quantification. The calibration equations obtained were: 7 α -hydroxycholesterol (0.1006 - 0.7040 μg ; $y = 1.2688x - 0.0005$, $r = 0,9956$), 7 β -hydroxycholesterol (0.2014 - 1.4098 μg ; $y = 1.1773x - 0.0007$, $r = 0,9958$), α -epoxycholesterol (0.0992 - 0.6944 μg ; $y = 0.9219x - 0.0027$, $r = 0,9972$), β -epoxycholesterol (0.1020 - 0.7134 μg ; $y = 0.7082x + 0.0016$, $r = 0,9990$), cholestanetriol (0.0999 - 0.6997 μg ; $y = 1.9882x - 0.0073$, $r = 0,9895$) and 7-ketocholesterol (0.1008 - 0.7056 μg ; $y = 1.048x - 0.0037$, $r = 0,9968$).

2.4. Statistical analysis

The sample determinations were conducted in triplicate, with values reported as means \pm standard deviation. Three-way (food matrix (milk based fruit, fruit or milk beverages), temperature (4 $^{\circ}\text{C}$, 24 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$) and storage time (0, 2, 4, 6 months) analysis of variance (ANOVA) was applied to the results obtained, followed by the Tukey post hoc test, and the significance of mean effects and interactions was also included. A significance level of $p < 0.05$ was adopted for all comparisons. Regression analyses were made to evaluate the evolution of POPs (individual and total) in the beverages throughout storage. Statgraphics Plus, version 5.1 (Rockville, MD, USA), was used throughout.

3. RESULTS AND DISCUSSION

A GC-FID chromatogram of the POPs identified in sample FJPS (stored during 2 months at 4 $^{\circ}\text{C}$) is shown in **Figure 2** for illustrative purposes. Only POPs corresponding to β -sitosterol (7 α - and 7 β -hydroxy, α -

and β -epoxy, 7-keto and triol derivatives) and campesterol (α - and β -epoxy and 7-keto derivatives) were detected, which would agree with the fact that these are the predominant phytosterols in the analyzed beverages (González-Larena et al., 2012). A co-elution between 7 β -hydroxycampesterol and sitostanol (see **Figure 2**) made it impossible to quantify this oxide in the samples.

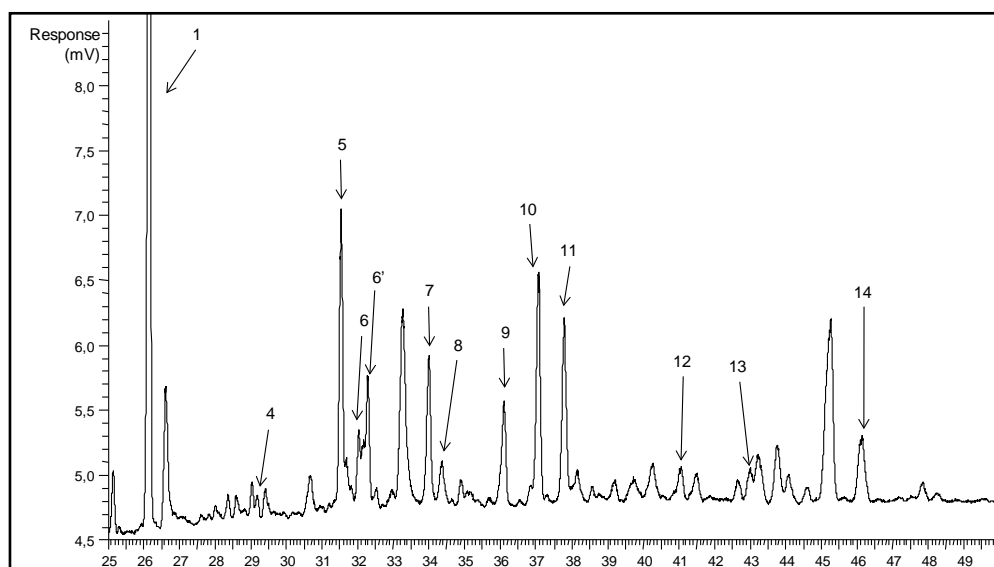


Figure 2. GC-FID chromatogram of the POPs identified in PS-enriched fruit beverage (FJPS) stored during 2 months at 4 °C. 1: 19-hydroxycholesterol (IS); 4: 7 α -hydroxysitosterol; 5: β -sitosterol; 6: 7 β -hydroxycampesterol; 6': sitostanol; 7: β -epoxycampesterol; 8: α -epoxycampesterol; 9: 7 β -hydroxysitosterol; 10: β -epoxysitosterol; 11: α -epoxysitosterol; 12: 7-ketocampesterol; 13: sitostanetriol; 14: 7-ketositosterol (peaks number 2 (7 α -hydroxycampesterol) and 3 (7 α -hydroxystigmasterol) of Figure 1 have not been identified in the samples).

The individual POP contents found in the beverages in the course of storage at different temperatures are summarized in **Table 1**, while the total POP contents and calculated oxidation rates are shown in **Table 2**.

Table 1. Individual phytosterol oxidation product contents ($\mu\text{g}/100$ g of sample) in PS-enriched beverages just after manufacture and during storage^a.

Sample	Month	°C	Campesterol oxides			β -Sitosterol oxides					
			β -Epoxy	α -Epoxy	7-Keto	7 α -Hydroxy	7 β -Hydroxy	β -Epoxy	α -Epoxy	Triol	7-Keto
MFJPS	0	-	51.99 \pm 2.37	20.65 \pm 2.78	15.02 \pm 0.86	5.42 \pm 0.68	39.55 \pm 4.52	42.91 \pm 13.59	28.24 \pm 10.92	7.29 \pm 1.85	31.52 \pm 7.09
	4	4	49.1 \pm 2.6	20.99 \pm 1.9	16.57 \pm 0.6	8.72 \pm 1.59	36.65 \pm 1.36	54.47 \pm 8.4	54.46 \pm 11.05	15.09 \pm 1.52	32.22 \pm 1.47
	2	24	58.96 \pm 1.21	21.31 \pm 4.41	20.53 \pm 5.28	8.18 \pm 0.87	34.61 \pm 4.66	66.11 \pm 15.72	70.19 \pm 13.64	13.56 \pm 2.23	45.40 \pm 12.77
	37	37	59.58 \pm 5.41	26.13 \pm 2.50	14.41 \pm 3.34	9.32 \pm 1.78	34.34 \pm 4.90	76.29 \pm 8.04	88.54 \pm 12.65	12.77 \pm 2.48	33.04 \pm 13.51
	4	4	63.02 \pm 0.51	35.45 \pm 1.09	24.61 \pm 1.97	10.85 \pm 3.51	43.25 \pm 0.45	87.85 \pm 9.36	83.38 \pm 0.72	14.39 \pm 1.03	50.79 \pm 2.13
	4	24	66.77 \pm 8.80	28.16 \pm 1.34	26.81 \pm 6.18	11.32 \pm 3.47	46.96 \pm 1.22	81.22 \pm 17.05	76.33 \pm 25.25	13.33 \pm 4.56	49.94 \pm 11.90
	37	37	65.50 \pm 3.57	28.5 \pm 5.09	25.61 \pm 5.91	9.63 \pm 1.99	43.14 \pm 2.95	80.62 \pm 12.62	87.20 \pm 7.59	13.89 \pm 2.46	54.45 \pm 27.72
FJPS	4	4	46.96 \pm 2.53	20.17 \pm 2.10	26.27 \pm 3.48	4.40 \pm 0.13	32.39 \pm 2.64	92.22 \pm 17.04	87.15 \pm 3.35	13.90 \pm 0.67	53.35 \pm 2.20
	6	24	77.49 \pm 13.86	21.03 \pm 2.32	24.63 \pm 4.11	6.19 \pm 3.18	36.14 \pm 6.93	69.36 \pm 15.93	46.98 \pm 8.41	9.14 \pm 0.26	44.56 \pm 4.94
	37	37	75.75 \pm 14.72	27.36 \pm 0.98	29.96 \pm 0.98	6.85 \pm 1.42	67.00 \pm 16.02	59.15 \pm 23.06	37.79 \pm 11.91	12.16 \pm 0.98	56.22 \pm 6.76
	0	-	76.84 \pm 10.7	22.85 \pm 4.01	19.6 \pm 2.27	4.80 \pm 0.51	43.33 \pm 1.70	127.06 \pm 32.01	144.92 \pm 32.10	15.89 \pm 4.27	41.81 \pm 8.53
	4	4	59.11 \pm 4.15	20.03 \pm 1.51	20.09 \pm 4.65	13.40 \pm 3.24	29.65 \pm 1.93	98.01 \pm 3.8	120.27 \pm 7.02	13.22 \pm 2.80	42.16 \pm 11.02
	2	24	74.8 \pm 22.69	29.62 \pm 10.43	24.22 \pm 1.21	10.80 \pm 1.88	44.89 \pm 2.00	130.09 \pm 43.79	149.30 \pm 54.06	15.00 \pm 2.33	45.95 \pm 3.78
	37	37	75.1 \pm 19.68	25.93 \pm 8.69	28.36 \pm 7.16	12.2 \pm 0.03	46.14 \pm 0.10	132.40 \pm 21.5	157.89 \pm 23.18	13.26 \pm 4.95	51.74 \pm 14.21
MPS	4	4	62.34 \pm 10.86	20.49 \pm 0.22	23.94 \pm 6.85	6.58 \pm 0.65	42.65 \pm 4.67	64.27 \pm 17.38	57.81 \pm 18.58	7.70 \pm 2.12	38.61 \pm 0.80
	4	24	64.19 \pm 8.13	22.87 \pm 3.28	23.39 \pm 1.31	8.65 \pm 0.81	43.97 \pm 2.11	62.35 \pm 19.28	49.97 \pm 24.36	16.76 \pm 0.69	48.33 \pm 2.38
	37	37	45.19 \pm 1.59	18.03 \pm 0.65	20.02 \pm 2.38	7.86 \pm 1.55	35.78 \pm 2.98	55.66 \pm 1.38	55.67 \pm 17.84	13.91 \pm 2.2	31.40 \pm 2.56
	4	4	62.45 \pm 0.8	19.91 \pm 2.17	23.98 \pm 2.06	6.46 \pm 0.71	42.06 \pm 1.10	40.20 \pm 3.16	27.82 \pm 12.03	6.48 \pm 0.06	36.61 \pm 2.99
	6	24	56.02 \pm 1.96	16.80 \pm 0.95	20.73 \pm 3.53	7.49 \pm 1.29	41.03 \pm 1.43	63.90 \pm 6.86	45.34 \pm 1.99	12.96 \pm 4.14	32.97 \pm 7.29
	37	37	64.59 \pm 4.99	18.68 \pm 1.77	19.74 \pm 2.45	8.48 \pm 4.56	45.68 \pm 2.98	34.42 \pm 5.77	23.03 \pm 8.93	14.76 \pm 2.69	36.99 \pm 2.04
	0	-	57.31 \pm 2.30	18.63 \pm 1.17	17.70 \pm 2.10	5.34 \pm 1.76	37.66 \pm 1.70	84.59 \pm 4.32	85.90 \pm 8.00	16.04 \pm 1.71	36.04 \pm 3.79
MPS	4	4	69.37 \pm 3.24	24.28 \pm 0.52	12.62 \pm 1.54	10.20 \pm 2.93	37.27 \pm 2.67	122.04 \pm 3.42	163.40 \pm 15.51	16.54 \pm 1.06	36.70 \pm 4.50
	2	24	85.93 \pm 1.02	35.06 \pm 2.79	29.98 \pm 2.59	11.30 \pm 1.18	57.46 \pm 3.01	130.76 \pm 28.35	109.30 \pm 1.45	23.57 \pm 1.31	57.73 \pm 2.19
	37	37	78.40 \pm 5.32	26.44 \pm 1.99	24.78 \pm 8.64	12.09 \pm 2.59	40.66 \pm 5.61	134.92 \pm 16.48	200.85 \pm 6.60	17.57 \pm 3.16	53.24 \pm 13.15
	4	4	67.86 \pm 13.13	36.22 \pm 1.41	28.63 \pm 0.61	10.45 \pm 2.82	43.40 \pm 7.05	91.31 \pm 17.48	139.32 \pm 17.50	14.28 \pm 2.03	91.63 \pm 7.89
	4	24	88.82 \pm 23.55	44.46 \pm 8.54	35.32 \pm 4.53	8.49 \pm 1.50	54.44 \pm 7.56	93.04 \pm 1.55	99.84 \pm 23.65	17.94 \pm 4.12	67.27 \pm 8.54
	37	37	61.64 \pm 0.33	23.03 \pm 0.38	30.96 \pm 5.21	9.76 \pm 0.94	34.72 \pm 0.40	105.78 \pm 16.89	140.94 \pm 26.83	10.95 \pm 2.29	64.73 \pm 1.94
	4	4	102.73 \pm 9.84	46.06 \pm 9.95	39.65 \pm 9.01	12.03 \pm 2.27	55.56 \pm 7.39	258.50 \pm 17.38	298.71 \pm 24.50	16.92 \pm 0.82	102.10 \pm 30.69
6	24	101.26 \pm 10.76	79.49 \pm 0.97	54.11 \pm 19.24	10.65 \pm 2.86	55.90 \pm 10.41	95.45 \pm 36.63	216.08 \pm 49.62	22.22 \pm 4.71	67.29 \pm 4.52	
37	37	72.2 \pm 69.44	32.69 \pm 7.06	44.31 \pm 7.76	11.13 \pm 5.57	42.67 \pm 1.62	162.79 \pm 8.84	191.94 \pm 7.03	17.46 \pm 4.47	75.73 \pm 14.11	

^aValues expressed as mean \pm standard deviation (n = 3). MFJPS = milk based fruit beverage; FJPS = fruit beverage; MPS = milk beverage.

Table 2. Total phytosterol oxidation product contents ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample) and oxidation rates in PS-enriched beverages just after manufacture and during storage.

Sample	Month	$^{\circ}\text{C}$	Total POPs ^a	Oxidation rates			
				Total ^b	β -Sitosterol ^c	Campesterol ^d	
MPS	0	-	359.21 \pm 10.81	0.07	0.05	0.25	
		4	492.42 \pm 17.39	0.09	0.07	0.29	
	2	24	541.08 \pm 28.96	0.09	0.07	0.39	
		37	588.94 \pm 24.73	0.11	0.09	0.35	
	4	4	523.09 \pm 29.27	0.10	0.08	0.37	
		24	509.60 \pm 35.87	0.08	0.06	0.40	
	6	37	482.52 \pm 32.29	0.09	0.07	0.34	
		4	932.25 \pm 46.70	0.16	0.14	0.50	
	6	24	702.44 \pm 66.56	0.14	0.10	0.69	
		37	650.96 \pm 24.07	0.12	0.10	0.39	
	MFJPS	0	-	242.59 \pm 19.81	0.05	0.03	0.26
			4	288.26 \pm 14.57	0.05	0.04	0.23
2		24	338.85 \pm 25.93	0.06	0.05	0.29	
		37	354.40 \pm 18.09	0.06	0.05	0.26	
4		4	413.58 \pm 10.56	0.08	0.06	0.34	
		24	400.84 \pm 34.78	0.07	0.05	0.33	
6		37	408.53 \pm 32.82	0.08	0.06	0.31	
		4	376.82 \pm 18.35	0.07	0.05	0.25	
6		24	335.52 \pm 24.93	0.06	0.04	0.34	
		37	372.24 \pm 34.59	0.06	0.04	0.35	
FJPS		0	-	497.09 \pm 47.80	0.08	0.07	0.30
			4	524.68 \pm 74.11	0.10	0.06	0.28
	2	24	479.8 \pm 74.08	0.08	0.07	0.33	
		37	491.27 \pm 41.71	0.08	0.07	0.32	
	4	4	324.37 \pm 28.98	0.05	0.04	0.27	
		24	340.48 \pm 32.48	0.06	0.04	0.29	
	6	37	283.51 \pm 18.75	0.05	0.04	0.22	
		4	266.07 \pm 13.23	0.04	0.03	0.27	
	6	24	297.37 \pm 11.92	0.05	0.04	0.25	
		37	266.38 \pm 13.71	0.04	0.03	0.25	

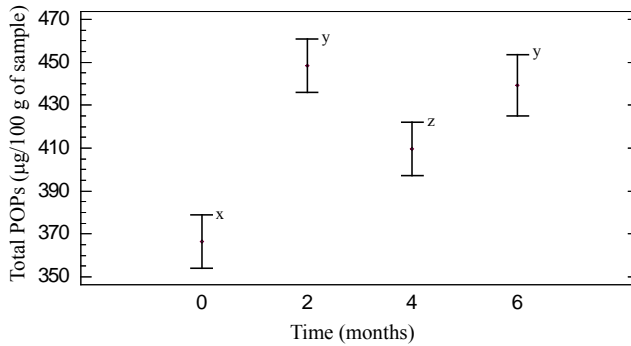
^aValues expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$). ^bCalculated as: (total POPs x 100/total PS content). ^cCalculated as: (β -sitosterol oxides x 100/ β -sitosterol content). ^dCalculated as: (campesterol oxides x 100/ campesterol content). MFJPS = milk based fruit beverage; FJPS = fruit beverage; MPS = milk beverage.

The results of the three-way ANOVA applied to individual POP contents in the three PS-enriched beverages indicate that in general, storage temperature does not affect the contents ($p < 0.05$). Regarding the sample factor, the individual oxide contents in MPS were greater than in the rest of the beverages ($p < 0.05$). On considering the time factor, the lowest contents corresponded to time zero ($p < 0.05$). Regarding the total POP contents, and independently of the food matrix and temperature (see **Figure 3a**), an increase was observed in the course of storage ($p < 0.05$). In turn, with respect to the food matrix, the total oxide contents followed the order MPS \gg FJPS $>$ MFJPS ($p < 0.05$) (see **Figure 3b**).

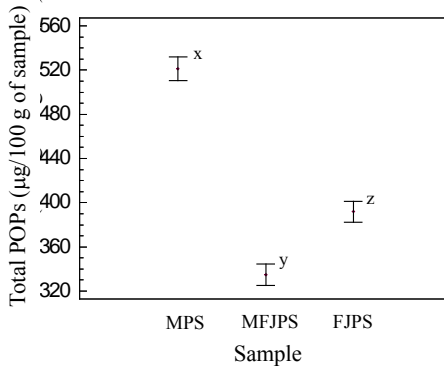
3.1. Milk beverage (MPS)

The order of relative abundance at time zero for β -sitosterol oxides, calculated from the contents reported in **Table 1**, was α/β -epoxy (32% for each) $>$ 7 β -hydroxy (14%) and 7-keto (14%) $>$ triol (6%), followed by 7 α -hydroxy (2%). In skimmed milk enriched with free phytosterols (Soupas et al., 2006), the major sterol oxides found were 7-hydroxysitosterol followed by 7-ketositosterol; α/β -epoxysitosterols were also detected, but their amounts remained under quantification limits. In milk enriched with esterified phytosterols (Menéndez-Carreño et al., 2008), the main β -sitosterol derivatives found were 7-hydroxy, 7-keto, followed by α/β -epoxy. In our samples, the α/β -epoxysitosterols were more abundant than in the above studies. In similar milk beverages (Alemany et al., 2013), 7-keto is the main POP followed by triol and α/β -epoxysitosterols.

a)



b)



c)

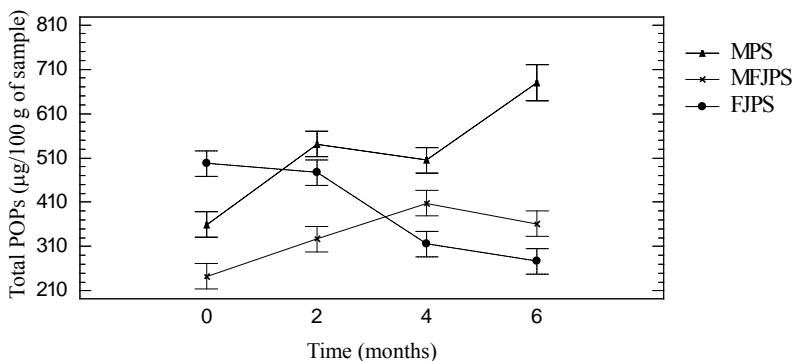


Figure 3. Intervals for the means of the total POP contents obtained by the three-way ANOVA: a) in the four different storage times independently of food matrix and storage temperature; b) in the three different beverages independently of storage time and temperature; c) interaction plot of the three beverages throughout time of storage. Different superscript letters (x-z) indicates statistically significant differences.

For campesterol oxides, the main contribution in MPS corresponded to β -epoxycampesterol (61%), followed by α -epoxycampesterol (20%) and 7-ketocampesterol (19%) at time zero. In contrast, according to Menéndez-Carreño et al. (2008), the main campesterol derivatives were 7-keto followed by 7-hydroxy and α/β -epoxy, with similar contributions.

After storing the MPS beverages for 6 months, the relative abundances of the different β -sitosterol oxides reflected a tendency to maintain constant proportions of 7-keto (14-15%) and 7 α -hydroxy (2%), with a slight decrease in triol (2-5%), 7 β -hydroxy (7-12%) and β -epoxy (20-35%), and an increase in α -epoxy (38-46%). In the case of the campesterol oxides, after 6 months of storage we recorded a decrease in β -epoxy (43-55%), and an increase in the proportions of α -epoxy (22-34%) and 7-keto (21-30%).

The total mean POP content at time zero was 359 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ beverage (**Table 2**). These values are higher than those found by Alemany et al. (2013) (98 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) in milk with free PS. In turn, Soupas et al. (2006) recorded 218 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in milk with free phytosterols, while Menéndez-Carreño et al. (2008) found 210 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in milk with esterified phytosterols.

In our samples, the β -sitosterol oxidation rate at time zero was 0.05% (**Table 2**), which is lower than the value obtained by Soupas et al. (2006) (0.08%) in milk with free phytosterols, and slightly greater than the 0.04% reported by Menéndez-Carreño et al. (2008). A greater difference was found with respect to the observations of Alemany et al. (2013), who recorded a β -sitosterol oxidation rate of 0.02% in milk beverage with free PS. The campesterol oxidation rate at time zero was

0.25% (**Table 2**), which is higher than in the case of β -sitosterol. This is in agreement with the observations of Menéndez-Carreño et al. (2008) (0.12%).

The differences between our results and those of other authors can be explained by several factors: the level of PS enrichment, the chemical form of the PS (free or esterified), and/or the manufacturing process involved. In this respect, Menéndez-Carreño et al. (2008) and Alemany et al. (2013) used samples manufactured on an industrial scale, while our samples and those of Soupas et al. (2006) were elaborated on a pilot plant scale.

Independently of the time and temperature of storage, MPS showed higher POP contents than the fruit containing beverages ($p < 0.05$) (see **Figure 3b**). In a previous stability study of PS-enriched milk beverages carried out by our group (González-Larena et al., 2012), the lowest total antioxidant capacity (TAC) was found to correspond to a beverage containing only milk. This could be related to the heat treatment of milk used in the manufacturing process, which can induce an increase in its pro-oxidant activity, mainly due to the formation of novel oxidative molecules in the early stages of the Maillard reaction (Calligaris, Manzocco, Anese & Nicoli, 2004). Significant interactions ($p < 0.05$) between food matrix and time of storage were found by ANOVA, as can be seen in **Figure 3c**. An increase is observed in the second month of storage - the increment being greater at the end of the storage period for MPS.

The PS oxidation rate ranged from 0.07% at time zero to 0.12-0.16% after 6 months of storage (**Table 2**). No significant changes in β -sitosterol oxides during 6 months of storage at room temperature or at 4

°C have been reported by Soupas et al. (2006), while according to Menéndez-Carreño et al. (2008), one month of storage at room temperature led to an increase in total oxysterol derivatives in relation to the amount found in control samples. In our samples (**Table 2**), the oxidation rates in the second month at 24 °C were 0.07% and 0.39% for β -sitosterol and campesterol, respectively. These results are in agreement with those of Menéndez-Carreño et al. (2008), who after one month of storage at room temperature found the β -sitosterol oxidation rate to increase to 0.06% from the initial value of 0.04%. Regarding the campesterol oxidation rate, our value is higher than that reported by Menéndez-Carreño et al. (2008). These authors obtained an oxidation rate of 0.21%, which was almost double the rate recorded at the start (0.12%).

3.2. Fruit beverages (MFJPS and FJPS)

The order of relative abundance at time zero for β -sitosterol oxides in MFJPS, calculated from the contents reported in **Table 1**, was β -epoxy (28%) > 7β -hydroxy (26%) > 7-keto (20%) > α -epoxy (18%) > triol (5%), followed by 7α -hydroxy (3%). In similar milk based fruit beverages, Alemany-Costa et al. (2012) found 7β -hydroxy to be the main oxide, followed by β -epoxy and 7-keto with similar contributions. No triol derivatives were found. In another study involving similar beverages (Alemany et al., 2013), the order of relative abundance was seen to be 7-keto > 7β -hydroxy \approx triol \geq α/β -epoxy \geq 7α -hydroxy.

The order of relative abundance for β -sitosterol oxides at time zero in FJPS was α -epoxy (38%) > β -epoxy (34%) > 7β -hydroxy and 7-keto (both 11%) > triol (4%) > 7α -hydroxy (1%). According to Alemany-

Costa et al. (2012) and Alemany et al. (2013), the main oxides in similar fruit beverages were 7 β -hydroxy and 7-keto, respectively.

For campesterol oxides at time zero, the main contribution corresponded to β -epoxy (61% and 64%), followed by α -epoxy (20% and 19%) and 7-keto (19% and 16%) for MFJPS and FJPS, respectively.

During the storage of MFJPS, α/β -epoxysitosterols increase their presence at the end of storage at 4 °C (31-33%) and 24 °C (22-33%), in contrast to 7 β -hydroxysitosterol decrease at 24 °C (17%) and 4 °C (11%) after 6 months of storage. In FJPS, several β -sitosterol oxides increase their relative abundance at the end of storage (7 α -hydroxy (4-5%), 7 β -hydroxy (20-28%), 7-keto (16-23%) and sitostanetriol (4-9%)), to the detriment of α/β -epoxysitosterols (14-31%).

The total POP contents at time zero were 243 and 497 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ beverage in MFJPS and FJPS, respectively (Table 2). These values are higher than those found by Alemany et al. (2013), with 74 and 71 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ beverage in PS-enriched milk based fruit beverage and PS-fruit beverage, respectively, and lower than those reported by Alemany-Costa et al. (2012), with 800 and 665 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ beverage in milk based fruit and fruit beverages enriched with PS, respectively.

In our samples, the β -sitosterol oxidation rate at time zero was 0.03% and 0.07% in MFJPS and FJPS, respectively (**Table 2**) - these values being higher than those recorded by Alemany et al. (2013) (0.01%) in similar beverages, and similar to those published by Alemany-Costa et al. (2012), with a 0.06% oxidation rate for β -sitosterol. Differences found within POP contents in these PS-enriched samples can be attributed to the application of different treatments in the elaboration process. The samples of Alemany-Costa et al. (2012) were subjected to

temperature and time conditions (80 °C/30 seconds) different from those used in our samples (100-115 °C/15-30 seconds).

FJPS showed greater ($p < 0.05$) total POP contents than MFJPS (**Figure 3b**), independently of the storage time and temperature conditions. These results can be explained by the fact that milk based fruit beverages have higher TAC values than fruit beverages, possibly because the interaction between polyphenol and milk may maintain the TAC of beverages subjected to thermal processing (Wegrzyn, Farr, Hunter, Au, Wohlers, Skinner et al., 2008; González-Larena et al., 2012). Furthermore, as can be seen in **Figure 3c**, the POP contents evolve differently according to storage time in beverages MFJPS and FJPS. In both of these beverages the POP contents from the fourth month of storage show the same tendency, and are lower than in the case of MPS.

In MFJPS, the PS oxidation rate ranged from 0.05% at time zero to 0.06-0.07% after 6 months of storage (**Table 2**), whereas in FJPS the PS oxidation rate ranged from 0.08% at time zero to 0.04-0.05% after 6 months of storage. These oxidation percentages are low and inferior to those corresponding to the milk beverage – a fact that might be related to the presence of antioxidants in the fruit juice and/or puree used in manufacturing the beverages. To our knowledge, there are no storage studies relating the formation of POPs in PS-enriched milk based fruit beverage and PS-enriched fruit beverages.

For each of the examined beverages, predictive models of POP content were developed as a function of storage time (**Table 3**). The mathematical predictive models for individual POPs explain the individual POP contents by more than 50%. 7-Ketositosterol and 7-ketocampesterol show the highest R^2 values (75% and 85%,

respectively), and thus could be used as markers of PS oxidation level in beverages such as those analyzed in our study – in the same way that 7-ketocholesterol has been proposed as an oxidation marker of cholesterol in different food matrixes (Rodríguez-Estrada, Garcia-Llatas & Lagarda, 2014). On the other hand, the models obtained for the total POP contents explain over 75% of the amount (Table 3).

Table 3. Mathematical predictive models between POP contents and storage time.

	Model	p	R ²
Total POPs			
MFJPS	$y = 248.277 + 58.9769\sqrt{t}$	0.0003	75.2
MPS	$y = 359.734 + 106.437\sqrt{t}$	0.0003	77.8
FJPS	$y = 515.177 - 41.1336t$	0.0000	84.1
β-Sitosterol oxides			
7 α -OH	$y = 6.01894 + 2.2362\sqrt{t}$	0.0016	68.8
α -Epoxy	$y = 161.964 - 47.288\sqrt{t}$	0.0008	69.3
β -Epoxi	$y = 137.89 - 33.6656\sqrt{t}$	0.0006	70.5
7-Keto	$y = 1/(0.0266241 - 0.00256607t)$	0.0006	74.8
Triol	$y = 8.42478 + 2.21741\sqrt{t}$	0.0103	49.9
Campesterol oxides			
β -Epoxi	$y = \sqrt{(5678.08 - 398.517 \cdot t)}$	0.008	52.2
7-Keto	$y = 18.2298 + 0.858191t^2$	0.0001	85.2

MFJPS = milk based fruit beverage; FJPS = fruit beverage; MPS = milk beverage; y: analyte content ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample); t: storage time (months); p: significance level; R²: percentage of variability explained by the model.

3.3. Contribution of PS ingredient

The POP contents in the ingredient used in this work as PS enrichment source (free microcrystalline PS from tall oil) has been analyzed elsewhere (González-Larena et al., 2011). Only oxides corresponding to β -sitosterol are detected in the ingredient. The theoretical contribution, expressed per 100 g of beverage, of the ingredient to the POP contents in the analyzed beverages was: 7α -hydroxy (12 μg), 7β -hydroxy (12.4 μg), triol (36 μg) and 7-keto (15 μg) - yielding a total POP content of 75 $\mu\text{g}/100$ g beverage. On comparing the total POP contents of the beverages at time zero (**Table 2**), it is seen that the POP levels increase between 3- and 6-fold, and campesterol oxides are detected. This reflects the impact of the thermal treatment used in beverage manufacture upon the POP contents, and indicates that oxidation occurs differently in the ingredients and beverages – probably due to the presence of water in the latter. In this regard, Cercaci, Rodríguez-Estrada, Lercker & Decker (2007) reported a big difference in PS oxidation level between oil-water emulsions and bulk oil (corn oil with 648 mg PS/100 g oil). Phytosterol oxidation was faster in oil-water due the fact that oxidation has been postulated to occur at the emulsion droplet interface, where the surface area of the oil is high – thus allowing more interactions with aqueous phase prooxidants.

4. CONCLUSIONS

The food matrix (milk, juice or a mixture of both) to which PS are added exerts a marked influence upon both the total and the individual POPs formed. An increase in POP contents is observed in the course of

storage, independently of the temperature involved. In this context, 7-ketostosterol and 7-ketocampesterol could be used as markers of the PS oxidation state in beverages of the kind analyzed in our study during the storage period considered. The manufacturing process exerts a marked influence upon the formation of POPs, in view of the increase in the amount and diversity of the latter compared with those found in the PS source ingredients. Results obtained show that milk based fruit beverages, compared to milk or fruit beverages, would be a suitable matrix for the preparation of functional beverages enriched with PS, since they offer the best PS stability during the shelf life period.

REFERENCES

Alemany, L., Barberá, R., Alegría, A., & Laparra, J.M. (2014). Plant sterols from foods in inflammation and risk of cardiovascular disease: A real threat?. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 140-149.

Alemany, L., Cilla, A., Garcia-Llatas, G., Rodríguez-Estrada, M.T., Cardenia, V., & Alegría, A. (2013). Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages. *Food Research International*, 52, 1-7.

Alemany-Costa, L., González-Larena, M., García-Llatas, G., Alegría, A., Barberá, R., Sánchez-Siles, L.M., & Lagarda, M.J. (2012). Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources. *Food Research International*, 48, 265-270.

Calligaris, S., Manzocco, L., Anese, M., & Nicoli, M. C. (2004) Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *International Dairy Journal*, 14, 421–427.

Cercaci, L., Rodríguez-Estrada, M.T., Lercker, G., & Decker, E.A. (2007). Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsions and bulk oil. *Food Chemistry*, 102, 161–167.

Commission Decision 2004/336/EC of 31 March 2004. Authorizing the placing on the market of yellow fat spreads, milk based fruit drinks, yoghurt type products and cheese type products with added phytosterols/phytostanols as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union* 2004, 105, 49-51.

García-Llatas, G., & Rodríguez-Estrada, M.T. (2011). Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 607-624.

García-Llatas, G., Cercaci, L., Rodríguez-Estrada, M.T., Lagarda, M.J., Farré, R. & Lercker, G. (2008). Sterol oxidation in ready-to-eat infant foods during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 469-475.

González-Larena, M., Cilla, A., García-Llatas, G., Barberá, R., & Lagarda, M.J. (2012). Plant sterols and antioxidant parameters in enriched beverages: storage stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4725-4734.

González-Larena, M., García-Llatas, G., Vidal, M.C., Sánchez-Siles, L.M., Barberá, R., & Lagarda, M.J. (2011). Stability of plant sterols in ingredients used in functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3624–3631 and 13365–13365.

Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H.N., Ellegård, L., Jessup, W., Jones, P.J., Lütjohann D., Maerz, W., Masana, L., Silbernagel, G., Staels, B, Borén, J., Catapano, A.L., De Backer, G., Deanfield J., Descamps, O.S., Kovanen, P.T., Riccardi, G., Tokgözoglu L., & Chapman, M.J. For the European Atherosclerosis Society Consensus Panel on Phytosterols. (2014). Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 232, 346-360.

Kamal-Eldin, A.K., & Lampi, A.M. (2008). Oxidation of cholesterol and phytosterols In: Kamal-Eldin and Min (Eds.) *Lipid Oxidation Pathways*, Vol 2. (Illinois, USA) AOCS Press.

Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, 61, 193–199.

Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2008). Stability of sterols in phytosterol-enriched milk under different heating conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9997-10002.

Rodríguez-Estrada, M.T., Garcia-Llatas, G. & Lagarda, M.J. (2014). 7-Ketocholesterol as marker of cholesterol oxidation in model and food systems: When and how. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446, 792–797.

Rudzinska, M., Przybylski, R., & Wasowicz, E. (2014). Degradation of phytosterols during storage of enriched margarines. *Food Chemistry*, 142, 294–298.

Soupas, L., Huikko, L., & Lampi, A.M. (2006). Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *European Food Research and Technology*, 222, 266-273.

Vanmierlo, T., Husche, C., Schött, H.F., Pettersson, H., & Lütjohann, D. (2013). Plant sterol oxidation products – Analogs to cholesterol oxidation products from plant origin? *Biochimie*, 95, 464-472.

Wegrzyn, T.F., Farr, J.M., Hunter, D.C., Au, J., Wohlers, M.W. Skinner, M. A., Stanley, R.A., & Sun-Waterhouse, D. (2008). Stability of antioxidants in an apple polyphenol-milk model system. *Food Chemistry*, 109, 310–318.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Hero España, S.A. for providing the samples. This study was financed by AGL2008-02591-C02-01 (CICYT-FEDER) and partially funded by Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063. Marina González-Larena holds a Danone grant from the Instituto Danone (Spain). Thanks are also due to the Generalitat Valenciana (Spain) for financial support (GVACOMP2011-195) of the Bionutest group.



**DISCUSIÓN
GENERAL**

La discusión de los resultados se realiza en base a los objetivos propuestos.

Evaluación de ingredientes fuente de EV utilizados en el enriquecimiento de alimentos y selección de los más idóneos para su utilización en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche.

Dada la escasa información disponible sobre los contenidos de EV y la formación de POPs en los ingredientes fuente de EV utilizados para el enriquecimiento de los alimentos y teniendo en cuenta los diferentes tipos de ingredientes que pueden ser utilizados, se analizan ocho ingredientes fuente de EV, cuatro de ellos procedentes de aceites vegetales (nº 1 y 4: soja (contienen EV en forma libre); nº 5 y 6: soja, colza, girasol y maíz (EV esterificados)), dos de ellos procedentes de “tall oil” (nº 2 y 3 (libres)) y dos de ellos de mezcla de ambos (nº 7 y 8 girasol y “tall oil” (libres)).

Los contenidos totales de EV en los ingredientes analizados están comprendidos entre 13,06 y 86,4 g/100 g de muestra. Los contenidos de fitoestanoles siempre se hallan en cantidades inferiores a los fitoesteroles correspondientes (ej. β -sitosterol 40-80% y β -sitostanol 1-13%). En general, el contenido de EV totales coincide con el declarado en la información facilitada por el fabricante.

El β -sitosterol es el fitoesterol más abundante en todos los ingredientes, seguido de campesterol y estigmasterol. Los ingredientes elaborados con aceite de soja tienen los mayores contenidos de

estigmasterol (n° 1 y 4 > 10 veces vs otras muestras), hecho acorde con lo indicado por diversos autores (Phillips et al., 2002; Normén et al., 2007; Schwartz et al., 2008; Li et al., 2011). El fitoesterol menos abundante en los ingredientes es el brassicasterol. Solo los ingredientes que contienen colza en su composición presentan mayores contenidos de brassicasterol, al igual que lo indicado por diversos autores (Piironen et al., 2000; Philips et al., 2002; Normén et al., 2007; Schwartz et al., 2008; Li et al., 2011; Ghazani et al., 2013). En el caso de ingredientes de “tall oil” (n° 2, 3, 7 y 8) presentan mayores porcentajes de sitostanol y menores de estigmasterol y brassicasterol, acorde a lo indicado por Cantrill y Kawamura (2008).

La cantidad total de POPs presentes está comprendida entre 1,70 y 27,12 mg POPs/100 g de ingrediente, ó de 7,61 a 31,39 mg/100 g de EV, (ingredientes 1 y 6, respectivamente). Solamente se detectan óxidos de β -sitosterol, excepto en el ingrediente n° 4 que contiene 7-cetocampesterol.

De los resultados obtenidos, dado el bajo porcentaje de oxidación del β -sitosterol en los ingredientes analizados (< 0,046%), puede afirmarse que los EV permanecen estables en estas muestras. Los principales POPs proceden del β -sitosterol (7 α / β -hidroxisitosterol, 7-cetositosterol y sitostanoltriol). Los óxidos correspondientes a los derivados 7-ceto y 7-hidroxi están presentes en mayor cantidad que los derivados triol, tendencia de acuerdo a lo observado en estudios previos en aceites vegetales (Lampi et al., 2002). En los ingredientes que proceden en su totalidad de aceite de soja, los derivados 7 α -hidroxi, 7-ceto y triol del β -sitosterol son los principales POPs, seguidos por 7 β -hidroxisitosterol. De modo similar, los óxidos mayoritarios detectados en

aceites de soja sometidos a luz solar son 7 α -hidroxi, 7 β -hidroxi y 7-ceto (Zhang et al., 2006). En las muestras que contienen aceite de girasol, el POP mayoritario es el 7-ceto, seguido de 7 β -hidroxi y 7 α -hidroxi, en cantidades similares. Estos perfiles están de acuerdo con los valores indicados para los aceites de girasol (Dutta, 1997; Bortolomeazzi et al., 2003; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2006).

Se ha establecido un modelo matemático predictivo que permite relacionar el contenido total de POPs con el de β -sitosterol y explicaría, en un 86,5%, el contenido de los óxidos con el análisis de este fitoesterol.

Los ingredientes que presentan un menor contenido en POPs en relación a su contenido en EV (mg POPs/100 g EV) son: Ingrediente n° 1 (7,61) < ingrediente n° 5 (10,82) < ingrediente n° 3 (11,05) < ingrediente n° 2 (13,66).

De los ocho ingredientes analizados, se seleccionan los números: 3 y 5 por ser los ingredientes que presentan un menor porcentaje de oxidación del β -sitosterol (0,014 y 0,016%, respectivamente).

Con los dos ingredientes seleccionados se elaboran, a escala de laboratorio, dos bebidas a base de zumo de frutas (mandarina, plátano y uva) con y sin leche, enriquecidas con cada uno de los dos ingredientes seleccionados en la etapa previa: n° 3 procedente de “tall oil” (EV en forma libre) o, n° 5 procedente de aceites vegetales (soja, colza, maíz y girasol) (EV en forma esterificada).

El contenido total de EV en la bebidas oscila entre 1,28 - 1,93 g/100 g bebida. En todas las bebidas, el β -sitosterol es el más abundante

(> 70%), seguido del campesterol (6-13%) y estigmasterol (1-2%). Como era de esperar, las bebidas enriquecidas con el ingrediente que procede de aceites vegetales contienen brassicasterol y mayores contenidos de campesterol y campestanol que las enriquecidas con “tall oil”. Estos perfiles son acordes a lo indicado por Cantrill y Kawamura (2008) al comparar aceites vegetales y “tall oil”. Las bebidas enriquecidas con “tall oil”, presentan mayores porcentajes de sitostanol, hecho acorde al ingrediente utilizado. Los porcentajes de EV cumplen con la legislación vigente para bebidas de fruta a base de leche (Decisión 2004/336/CE): < 80% β -sitosterol; < 15% β -sitostanol; < 40% campesterol; < 5% campestanol; < 30% estigmasterol; < 3% brassicasterol; < 3% otros esteroides y estanoles.

En las bebidas analizadas solo se detectan óxidos de β -sitosterol. Los contenidos totales de POPs oscilan entre 665,3-827,3 μg POPs/100 g de bebida (42,9-57,4 mg/100 g de EV). No existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido total de POPs en función del ingrediente utilizado. Los contenidos son superiores a los indicados por Soupas et al. (2006) para leche enriquecida con EV esterificados (203 μg POPs/100 g de leche) o libres (218 μg POPs/100 g de leche) y Menéndez-Carreño et al. (2008a) (210 μg POPs/100 g de leche) en leche enriquecida con EV esterificados. El menor enriquecimiento de EV en estas muestras, 0,5% (Soupas et al., 2006) y 0,3% (Menéndez-Carreño et al., 2008a), podría justificar las diferencias encontradas con nuestras bebidas.

Para todas las bebidas objeto de estudio, el porcentaje de oxidación del β -sitosterol es bajo (0,07%), inferior al indicado por Soupas et al.

(2006) (0,08-0,09%) pero superior al de Menéndez-Carreño et al. (2008a) (0,04%).

Al relacionar el porcentaje de oxidación del β -sitosterol en los ingredientes utilizados para la formulación de las bebidas con los porcentajes determinados en las mismas, se observa un mayor grado de oxidación en estas últimas con respecto al ingrediente (0,07% vs 0,014%-0,016%). Este hecho podría ser debido al procesado de las bebidas, que incluye un mezclado a alta velocidad (27.000 rpm), dos etapas de homogenización (150 bares), posterior pasteurización (90 °C/30 s) y, finalmente, envasado en caliente (80 °C).

Los perfiles de POPs identificados en ambos tipos de bebidas (zumo o zumo con leche) son similares, independientemente del ingrediente utilizado. Los POPs individuales son: $7\alpha/\beta$ -hidroxisitosterol, α/β -epoxisitosterol y 7-cetositosterol y, en general, los porcentajes relativos siguen el orden: 7β -hidroxisitosterol (39-59%), seguido de 7-cetositosterol (14-24%), β -epoxisitosterol (5-25%), 7α -hidroxisitosterol (6-14%) y α -epoxisitosterol (5-10%). Estos óxidos están presentes también en los ingredientes utilizados en el enriquecimiento en EV de las bebidas, si bien, en las mismas además se detectan α/β -epoxisitosteroles. En leche enriquecida con EV (Menéndez-Carreño et al., 2008a) el perfil de derivados oxidados del β -sitosterol (7 -hidroxi > 7 -ceto > α/β -epoxi) coincide con el obtenido en las bebidas objeto de estudio, aunque también se identifican derivados del campesterol y estigmasterol.

Por lo tanto, se observa que, independientemente de la fuente utilizada en el enriquecimiento de EV (libres o esterificados), el

porcentaje de oxidación en las bebidas objeto de estudio es bajo (0,07%) y ambos ingredientes serían adecuados para su utilización en este tipo de bebidas.

Estabilidad de los EV y formación de POPs en tres bebidas a base de zumo y/o leche enriquecidas con EV a lo largo del periodo de vida útil (6 meses) a tres temperaturas de almacenamiento (4, 24 y 37 °C).

Para la elaboración de las bebidas en planta piloto, se selecciona el ingrediente nº 3 con EV libres, en base a criterios analíticos. Se elaboran tres bebidas enriquecidas en EV: a base de leche desnatada y/o zumo de frutas. Se analizan durante su periodo de vida útil, a 0, 2, 4 y 6 meses, a temperaturas de almacenamiento de 4, 24 y 37 °C.

Para el conjunto de las bebidas, independientemente de la temperatura y tiempo de almacenamiento, el contenido total de EV oscila entre 0,61 y 0,74 g/100 g de bebida. El β -sitosterol es el más abundante (> 77%), seguido del sitostanol (12-13%), campesterol (5,5-6%), estigmasterol (1,5-1,6%), campestanol (1,2-1,3%) y no se halla brassicasterol. Este perfil es acorde a lo indicado por otros autores (Maki et al., 2003 o Jones et al., 2003) en bebidas enriquecidas con EV procedente de “tall oil”.

Los EV se mantienen estables durante el almacenamiento ya que no existen diferencias significativas en función del tiempo o temperatura de almacenamiento. Aunque disminuye (< 9%) el contenido de EV de las bebidas a base de leche y a base de zumo almacenadas a 24 °C, esta disminución no es significativa y es del mismo orden que la indicada por otros autores: Menéndez-Carreño et al. (2008a) en leche enriquecida con EV almacenada un mes a temperatura ambiente (método Schaal) y Soupas et al. (2006) en leche enriquecida con EV almacenada 1,5 meses

a temperatura ambiente. Considerando el factor matriz, la bebida que contiene solo zumo de frutas presenta los mayores contenidos de EV totales e individuales.

El contenido total de carotenoides ($t=0$) de la bebida que contiene solo zumo de frutas (0.265 mg β -caroteno/100 mL) es superior a la bebida a base de zumo de frutas con leche (0.112 mg β -caroteno/100 mL). El contenido de carotenoides disminuye (36%) en el segundo mes, permaneciendo estable hasta el final del almacenamiento. La temperatura influye en el contenido total de carotenoides, observándose una mayor estabilidad con el almacenamiento a 4 °C.

Los polifenoles totales presentes en las bebidas que contienen zumo de frutas oscilan entre 509-706 mg equivalentes de ácido gálico/L, y son del mismo orden a los indicados en bebidas de zumo de naranja, y zumo y leche, conteniendo cítricos en su composición (Klimczak et al., 2007 y Zulueta et al., 2007, respectivamente). La bebida de zumo de frutas con leche presenta mayor contenido en polifenoles que la bebida a base de zumo. En función de la temperatura, el contenido en polifenoles totales es superior a 37 °C que a 4 °C; este hecho es acorde a lo indicado por García-Alonso et al. (2009) en zumo de tomate, quienes lo atribuyen a una posible formación de productos de la reacción de Maillard que reaccionarían con el reactivo de Folin-Ciocalteu, produciéndose una sobreestimación del contenido en polifenoles. A lo largo del tiempo de almacenamiento se producen fluctuaciones en el contenido de polifenoles totales, dándose una disminución entre los 2 y 4 meses y recuperándose los contenidos al final del periodo de almacenamiento, fenómeno señalado por Klimczak et al. (2007) y Piljac-Zegarac et al. (2009) en

zumos de frutas y que también podía deberse a interacciones con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

La capacidad antioxidante total determinada por el método TEAC para las bebidas que contienen zumo de frutas oscila entre 573 y 1083 μM Trolox, y para la bebida de leche entre 10 y 223 μM Trolox. Al evaluar la capacidad antioxidante de las bebidas objeto de estudio, se observa que existen diferencias significativas entre matrices, de modo que la bebida que contiene zumo y leche es la que presenta mayor capacidad antioxidante total. El orden es: bebida de leche y zumo de frutas > bebida de zumo de frutas >> bebida de leche.

La temperatura de almacenamiento de las bebidas no influye en la capacidad antioxidante, mientras que hacia el final del almacenamiento se observa un aumento de la misma, probablemente debido a: la presencia de compuestos con capacidad antioxidante en el zumo de frutas, la posible interacción entre los polifenoles y la leche que podría mantener la capacidad antioxidante en bebidas sometidas a tratamientos térmicos (Wegrzyn et al., 2008), la formación de compuestos de las últimas etapas de la reacción de Maillard, así como a cambios en la estructura de la caseína y proteínas séricas (Elías et al., 2008; Clausen et al., 2009).

El color se incrementa con el almacenamiento de las bebidas, en mayor medida en las que contienen zumo de frutas. Independientemente del tipo de bebida, el color aumenta con la temperatura siguiendo el orden: 37 °C > 24 °C > 4 °C. Hecho que podría deberse a diversos factores como la reacción de Maillard, pardeamiento enzimático,

degradación del ácido ascórbico y polimerización de antocianinas con otros compuestos polifenólicos (García- Alonso et al, 2003).

Aunque los EV parecen permanecer estables a lo largo del tiempo y temperatura de almacenamiento, no se descarta la posible formación de POPs. Por ello se evalúan dichos contenidos y se discuten en función del tipo de bebida.

- Bebida a base de leche

El contenido total inicial de POPs en la bebida a base de leche desnatada es de 359 μg POPs/100 g bebida, contenidos superiores a los indicados por Alemany et al. (2013a) (98 μg /100 g bebida) y a los 218 y 210 μg /100 g bebida de Soupas et al. (2006) y Menéndez-Carreño et al. (2008a), respectivamente, para bebidas lácteas enriquecidas con EV.

El orden de abundancia relativa de los óxidos de β -sitosterol es α/β -epoxi (32%) > 7β -hidroxi (14%) y 7-ceto (14%) > triol (6%) > 7α -hidroxi (2%), al inicio del almacenamiento. En general, estas proporciones coinciden con lo señalado por otros autores en leche excepto en los α/β -epoxi (Soupas et al., 2006; Menéndez-Carreño et al., 2008a; Alemany et al., 2013a). Al final del almacenamiento los porcentajes de los derivados 7-ceto (14-15%) y 7α -hidroxi (2%) se mantienen, disminuyen los de triol (2-5%), 7β -hidroxi (7-12%) y β -epoxi (20-35%) y aumenta el de α -epoxi (38-46%).

En función del porcentaje de enriquecimiento en EV, el porcentaje de oxidación del β -sitosterol en las bebidas objeto de estudio a tiempo cero es 0,05%, valor inferior al obtenido por Soupas et al. (2006) (0,08%)

y superior a los de Menéndez-Carreño et al. (2008a) y Alemany et al. (2013a), que hallan un 0,04% y 0,02%, respectivamente. El porcentaje de oxidación del campesterol es 0,25%, superior al del β -sitosterol y del mismo orden al indicado por Menéndez-Carreño et al. (2008a). Las diferencias entre nuestros resultados y los de otros autores podrían deberse a distintos factores: nivel de enriquecimiento en EV, tipo de EV (libres o esterificados) y elaboración de las bebidas.

Independientemente del tiempo y la temperatura de almacenamiento, esta bebida a base de leche presenta mayores contenidos que las bebidas que contienen zumo de frutas, hecho que podría estar relacionado con la menor capacidad antioxidante total que presenta (González-Larena et al., 2012). El porcentaje de oxidación de los EV durante el almacenamiento oscila entre el 0,07% a tiempo cero y 0,12-0,16% a los 6 meses, acorde con Menéndez-Carreño et al. (2008a) que señalan un incremento con el almacenamiento a temperatura ambiente, mientras que Soupas et al., (2006) no hallan cambios significativos por el almacenamiento a 4 y 24 °C durante 6 meses.

- Bebidas a base de zumo de frutas o zumo de frutas y leche

El contenido total inicial de POPs en las bebidas a base de zumo de frutas y zumo de frutas y leche es 497 y 243 μg POPs/100 g bebida, respectivamente, contenidos superiores a Alemany et al. (2013a) (71 y 74 $\mu\text{g}/100$ g bebida) e inferiores a los de Alemany-Costa et al. (2012) (665 y 800 $\mu\text{g}/100$ g bebida) para bebidas similares.

Para la bebida a base de zumo de frutas y leche, el orden de abundancia relativa de los óxidos de β -sitosterol es: β -epoxi (28%) > 7 β -

hidroxi (26%) > 7-ceto (20%) > α -epoxi (18%) > triol (5%) > 7 α -hidroxi (3%). En la bebida de zumo de frutas, el orden es: α -epoxi (38%) > β -epoxi (34%) > 7 β -hidroxi y 7-ceto (11%) > triol (4%) > 7 α -hidroxi (1%). En bebidas similares tanto de zumo de frutas y leche como de zumo de frutas, los óxidos principales son 7 β -hidroxi (Alemany-Costa et al., 2012) o 7-ceto (Alemany et al., 2013a).

El porcentaje de oxidación del β -sitosterol es 0,03 y 0,07% para la bebida de zumo de frutas y leche y bebida de zumo de frutas, respectivamente, valores similares a los obtenidos por Alemany-Costa et al. (2012) (0,06%), pero superior al obtenido por Alemany et al. (2013a) (0,01%) en bebidas similares. Las diferencias entre nuestros resultados y los de otros autores podrían deberse al proceso de elaboración de las bebidas, ya que en Alemany-Costa et al. (2012) las bebidas están elaboradas a escala de laboratorio (sometidas a 80 °C/30 s), mientras que en las bebidas objeto de estudio están elaboradas a escala industrial (sometidas a 100-115 °C/15-30 s).

El porcentaje de oxidación de los EV durante el almacenamiento en la bebida de zumo de frutas y leche oscila entre 0,05% a tiempo cero y 0,06-0,07% a los 6 meses, y en la bebida de zumo de frutas entre 0,08% a tiempo cero y 0,04-0,05% a los 6 meses. Estos porcentajes de oxidación son bajos e inferiores a los correspondientes a la bebida a base de leche, hecho que podría estar relacionado con la presencia de antioxidantes procedentes de la fruta utilizada en su elaboración.

Para cada tipo de bebida se establecen modelos matemáticos predictivos del contenido total de POPs con respecto al tiempo de

almacenamiento. Estos modelos explican en más de un 75% esta relación. Además, cada óxido analizado de β -sitosterol y campesterol guarda relación con el tiempo de almacenamiento y los modelos predictivos para los derivados 7-ceto explicarían en más de un 75% esta relación. Por ello, estos derivados podrían ser utilizados como marcadores del estado de oxidación de los EV en las bebidas objeto de estudio.

En resumen y para las tres bebidas objeto de estudio, a lo largo del almacenamiento se observa un aumento en el contenido de POPs en función de la matriz. El orden seguido es: bebida a base de leche >> zumo > zumo y leche. Con respecto a los POPs individuales, en general, el almacenamiento y la temperatura no influyen en su contenido. La bebida a base de leche tiene los mayores contenidos de POPs individuales.

Al comparar el contenido de POPs en las bebidas analizadas con la contribución teórica de POPs a partir del ingrediente utilizado, se observa un aumento (entre 3-6 veces) de éstos, hecho atribuible al proceso de elaboración de las bebidas, lo que pone en evidencia el impacto del procesado en el contenido total de POPs.

De los resultados obtenidos, tanto del análisis de EV como de POPs en el estudio de estabilidad, se concluye que la bebida de zumo de frutas y leche es una matriz apropiada para la elaboración de bebidas enriquecidas con EV, dada la mayor estabilidad de los EV en su periodo de vida útil.



CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. Los métodos puestos a punto para la determinación de esteroles vegetales (EV) y óxidos de esteroles vegetales (POPs) son adecuados para su determinación en ingredientes fuentes de esteroles vegetales y bebidas elaboradas con los mismos.
2. En los ingredientes fuente de esteroles vegetales analizados, el contenido en estos y su porcentaje relativo cumple con la legislación vigente. El β -sitosterol es el esteroles mayoritario seguido del campesterol y estigmasterol. Los fitoestanoles, siempre se hallan en menor cantidad que el fitoesterol correspondiente. El origen de los EV ("tall oil" o aceites vegetales) es determinante del perfil de EV.
3. Los únicos POPs que se detectan en los ingredientes corresponden al β -sitosterol, a excepción de 7-cetocampesterol en uno de ellos. Los POPs principales son: $7\alpha/\beta$ -hidroxisitosterol, 7-cetositosterol y en menor cantidad sitostanol.
4. Aunque el porcentaje de oxidación de los EV en los ingredientes es bajo (< 0,05%), es recomendable la determinación de POPs en todo ingrediente que vaya a ser utilizado como fuente de enriquecimiento de EV en alimentos.
5. En bebidas a base de zumo de frutas con o sin leche, el tipo de EV (libres o esterificados) empleados para su enriquecimiento no influye en el contenido total o individual de POPs.
6. El almacenamiento (0-6 meses a 4, 24 y 37°C) no afecta al contenido total de EV en bebidas a base de zumo y/o leche. Este hecho puede ser atribuible a la presencia de compuestos antioxidantes

(carotenoides, polifenoles, caseínas, proteínas séricas y productos de la reacción de Maillard).

7. La matriz alimentaria influye notablemente en los contenidos totales e individuales de POPs. La bebida a base de zumo de frutas y leche presenta los menores contenidos de POPs a lo largo del almacenamiento.
8. Se han establecido modelos predictivos, en función del tiempo de almacenamiento, de los contenidos individuales de POPs explicando los modelos más del 50%. Para 7-cetositosterol y 7-cetocampesterol los modelos obtenidos explican en más de un 75-85% respectivamente el contenido en estos óxidos, por ello pueden ser utilizados como marcadores de oxidación de los EV en estas bebidas.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abidi, S.L. **2001**. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J. Chromatogr. A.*, 935, 173-201
- Abramsson-Zetterberg, L., Svensson, M., Johnsson, L. **2007**. No evidence of genotoxic effect *in vivo* of the phytosterol oxidation products triols and epoxydes. *Toxicol. Lett.*, 173, 132-139.
- Abumweis, S.S., Barake, R., Jones, P.J. **2008**. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr. Res.*, 52-69.
- Adcox, C., Boyd, L., Oehrl, L., Allen, J., Fenner, G. **2001**. Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophagederived cell lines. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2090-2095.
- Alemany, L., Laparra, J.M., Barberá, R., Alegría, A. **2012**. Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells. *Food Chem. Toxicol.*, 50, 3106-3113.
- Alemany, L., Cilla, A., García-Llatas, G., Rodríguez-Estrada, M.T., Cardenia, V., Alegría, A. **2013a**. Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages. *Food Res. Int.*, 52, 1-7.
- Alemany, L., Laparra, J.M., Barberá, R., Alegría, A. **2013b**. Relative expression of cholesterol transport-related proteins and inflammation markers through the induction of 7-ketosterol-mediated stress in Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 56, 247-253.

- Alemany, L., Barberá, R., Alegría, A., Laparra, J.M. **2014**. Plant sterols from foods in inflammation and risk of cardiovascular disease: A real threat?. *Food Chem. Toxicol.*, 69, 140-149.
- Analytical Methods Committee, **1987**. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst*, 112, 199-204.
- Andersson, S.W., Skinner, J., Ellegård, L., Welch, A.A., Bingham, S., Mulligan, A., Andersson, H., Khaw, K.T. **2004**. Intake of plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 58, 1378-1385.
- AOAC International. 2002. Separation of fat in cacao products. En Association of Official Analytical Chemists, official methods of analysis. Arlington: AOAC.
- AOAC official method 2007.03. Sorenson WR, Sullivan D. **2007**. Determination of campesterol, stigmasterol, and β -sitosterol in saw palmetto raw materials and dietary supplements by gas chromatography: collaborative study. *JAOAC Int.*, 90, 670-678.
- Apprich, S., Ulberth, F. **2004**. Gas chromatographic properties of common cholesterol and phytosterol oxidation products. *J. Chromatogr. A*, 1055, 169-176.
- Aringer, L., Eneroth, P. **1973**. Studies on the formation of C7-oxygenated cholesterol and β -sitosterol metabolites in cell-free preparations of rat liver. *J. Lipid Res.*, 14, 563-572.
- Aringer, L., Eneroth, P., Nordstrom, L. **1976**. Side chain hydroxylation of cholesterol, campesterol, and β -sitosterol in rat liver mitochondria. *J. Lipid Res.*, 17, 263-272.

- Assmann, G., Cullen, P., Erbey, J., Ramey, D.R., Kannenberg, F., Schulte, H. **2006**. Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 16, 13-21.
- Awad, A.B., Fink, C.S. **2000a**. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *J. Nutr.*, 130, 2127-2130.
- Awad, A. B., Downie, A., Fink, C.F., Kim, U. **2000b**. Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice. *Anticancer Res.*, 20, 821-824.
- Awad, A.B., Fink, C.S., Williams, H., Kim, U. **2001a**. In vitro and in vivo (SCID mice) effect of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *Eur. J. Cancer Prev.*, 10, 507-513.
- Awad, A.B., Williams, H., Fink, C.S. **2001b**. Phytosterols reduce in vitro metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr. Cancer*, 40, 157-164.
- Awad, A.B., Toczek, J., Fink, C.S. **2004**. Phytosterols decrease prostaglandin release in cultured P388D1/MAB macrophages. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 70, 511-520.
- Awad, A.B., Burr, A.T., Fink, C.S. **2005**. Effect of resveratrol and β -sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 72, 219-226.

- Awad, A.B., Chinnam, M., Fink, C.S., Bradford, P.G. **2007**. Beta-sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine*, 14, 747-54.
- Azadmard-Damirchi, S., Dutta, P. **2008**. Stability of minor lipid components with emphasis on phytosterols during chemical interesterification of a blend of refined olive oil and palm stearin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85, 13-21.
- Azadmard-Damirchi, S., Dutta, P.C. **2009**. A single step solid-phase extraction method for complete separation of sterol oxidation products in food lipids. *J. Chromatogr. A*, 1216, 36-42.
- Barriuso, B., Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Astiasarán, I., Ansorena, D. **2012**. Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. *Food Chem.*, 135, 706-712.
- Baumgartner, S., Mensink, R.P., den Hartog, G., Bast, A., Bekers, O., Huche, C., Lutjohann, D., Plat, J. **2013**. Oxyphytosterol formation in humans: identification of high vs low oxidizers. *Biochem. Pharmacol.*, 86, 19-25.
- Berdeaux, O., Dutta, P. C., Dobarganes, M.C., Sébédio, J.L. **2009**. Analytical methods for quantification of modified fatty acids and sterols formed as a result of processing. *Food Anal. Method.*, 2, 30-40.
- Berger, A., Jones, P.J.H., Abumweis, S.S. **2004**. Plant sterols: affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids health dis.*, 3, 907-919.

- Bortolomeazzi, R., Cordaro, F., Pizzale, L., Conte, L.S. **2003**. Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2394-2401.
- Boselli, E., Velazco, V., Caboni, M.F., Lercker, G. **2001**. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *J. Chromatogr. A*, 917, 239-244.
- Botelho, P., Galasso, M., Dias, V., Mandrioli, M., Lobato, L., Rodriguez-Estrada, M.T., Castro, I. **2014**. Oxidative stability of functional phytosterol-enriched dark chocolate. *Food Sci. Technol.*, 55, 444-451.
- Bouic, P.J., Etsebeth, S., Liebenberg, R.W., Albrecht, C.F., Pegel, K., van Jaarsveld, P.P. **1996**. Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: Implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Int. J. Immunopharmacol.*, 18, 693-700.
- Bouic, P.J. **2001**. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 4, 471-475.
- Bradford, P.G., Awad, A.B. **2007**. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 161-170.
- Brooks, C.J.W., McKenna, R.M., Cole, W.J., Maclachlan, J., Lawrie, T.D.V. **1983**. "Profile" Analysis of oxygenated sterols in plasma and serum. *Biochem. Soc. T.*, 11, 700-701.
- Brown, A.J., Jessup, W. **2009**. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol. Asp. Med.*, 30, 111-122.

- Brufau, G., Canela, M.A., Rafecas, M. **2008**. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutr. Res.*, 28, 217-225.
- Brüll, F., Mensink, R.P., van den Hurk, K., Duijvestijn, A., Plat, J. **2010**. TLR2 activation is essential to induce a Th1 shift in human peripheral blood mononuclear cells by plant stanols and plant sterols. *J. Biol. Chem.*, 285, 2951-2958.
- Busch, T.P., King, A.J. **2009**. Artifact generation and monitoring in analysis of cholesterol oxide products. *Anal. Biochem.*, 388, 1–14.
- Calderón-Santiago, M., Peralbo-Molina, Á., Priego-Capote, F., Luque, D., de Castro, M. **2012**. Cholesterol oxidation products in milk: Processing formation and determination. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 114, 687-694.
- Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J.C., Benítez, S., Bancells, C., González-Sastre, F., Palomer, X., Blanco-Vaca, F. **2007**. Dietary phytosterols modulate T-helper immune response but do not induce apparent anti-inflammatory effects in a mouse model of acute, aseptic inflammation. *Life Sci.*, 80, 1951-1956.
- Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J.C., Blanco-Vaca, F. **2009**. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*, 203, 18-31.
- Cantrill, R., Kawamura, Y. **2008**. Phytosterols, phytostanols and their esters. Chemical and Technical Assessment (CTA) for the 69th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *JECFA*.
<http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/69/Phytosterols.pdf> (consultado: septiembre 2014)

- Cercaci, L., Conchillo, A., Rodríguez-Estrada, M.T., Ansorena, D., Astiasarán I., Lercker, G. **2006**. Preliminary study on health-related lipid components of bakery products. *J. Food Prot.*, 69, 1393-1401.
- Cercaci, L., Rodríguez-Estrada, M.T., Lercker, G., Decker, E.A. **2007**. Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsions and bulk oil. *Food Chem.*, 102, 161-167.
- Chien, J.T., Wang, H.C., Chen, B.H. **1998**. Kinetic model of the cholesterol oxidation during heating. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2572-2577.
- Choi, Y.H., Kong, K.R., Kim, Y.A., Jung, K.O., Kil, J.H., Rhee, S.H., Park, K.Y. **2003**. Induction of Bax and activation of caspases during β -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 23, 1657-1662.
- Christianson-Heika, I., Smeds, P., Granholm, N., Bergelin, E., Isomaa, B. **2007**. Endocrine modulating actions of a phytosterol mixture in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 145, 518-527.
- Christianson-Heiska, I., Isomaa, B. **2008**. The use of primary hepatocytes from brown trout (*Salmo trutta lacustris*) and the fish cell lines RTH-149 and ZF-L for in vitro screening of (anti)estrogenic activity of wood extractives. *Toxicol. Vitro*, 22, 589-597.
- Christie, W.W. **2003**. Lipid extraction, storage and sample handling. En: *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. The Oily Press, Bridgewater. p. 91-104.

- Clausen, M.R., Skibsted, L.H., Stagsted, J. **2009**. Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2912-2919.
- Clement, L.M., Hansen, S.L., Costin, C.D., Perri, G.L. **2010**. Quantitation of sterols and sterol esters in fortified foods and beverages by GC/FID. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 87, 973-980.
- Codex Standard for Named Vegetable Oils Codex-Stan 210. **1999**. Codex Alimentarius.
- Conchillo, A., Cercaci, L., Ansorena, D., Rodríguez-Estrada, M.T., Lercker, G., Astiasarán, I. **2005**. Levels of phytosterol oxides in enriched and non enriched spreads: Application of thin-layer chromatography-gas chromatography methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7844-7850.
- Cordeiro, N., Freitas, N., Faria, M., Gouveia, M. **2013**. *Ipomoea batatas (L.) Lam.*: A rich source of lipophilic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 12380-12384.
- Davis, H.R., Altmann, S.W. **2009**. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim. Biophys. Acta*, 1791, 679-683.
- De Jong, A., Plat, J., Bast, A., Godschalk, R.W., Basu, S., Mensink, R.P. **2008**. Effects of plant sterol and stanol ester consumption on lipid metabolism, antioxidant status and markers of oxidative stress, endothelial function and low-grade inflammation in patients on current statin treatment. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 62, 263-73.
- De Smet, E., Mensink, R.P., Plat, J. **2012**. Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: Suggested

mechanisms from past to present *Mol. Nutr. Food Res.*, 56, 1058–1072.

- De Stefani, E., Boffetta, P., Ronco, A.L., Brennan, P., Deneo-Pellegrini, H., Carzoglio, J.C., Mendilaharsu, M. **2000**. Plant sterols and risk of stomach cancer: A case-control study in Uruguay. *Nutr. Cancer*, 37, 140-144.
- Decisión 2000/500/CE de la Comisión de 24 de julio de 2000 relativa a la autorización de la comercialización de las «grasas amarillas de untar con ésteres de fitosterol» como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L200, 59-60.
- Decisión 2004/333/CE de la Comisión de 31 de marzo de 2004 relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, aliños para ensaladas, productos de tipo leche, productos de tipo leche fermentada, bebidas de soja y productos tipo queso con fitoesteroles/fitoestanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L105, 40-42.
- Decisión 2004/334/CE de la Comisión de 31 de marzo de 2004 relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, productos tipo leche, productos tipo yogur y salsas aromáticas con fitoesteroles/fitoestanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L105, 43-45.

- Decisión 2004/335/CE de la Comisión de 31 de marzo de 2004 relativa a la autorización de comercialización de productos tipo leche y productos tipo yogur con ésteres de fitoesterol añadidos como nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L105, 46-48.
- Decisión 2004/336/CE de la Comisión de 31 de marzo de 2004 relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, bebidas de fruta a base de leche, productos tipo yogur y productos tipo queso, con fitoesteroles/fitoestanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L105, 49-50.
- Decisión 2004/845/CE de la Comisión de 12 de noviembre de 2004 relativa a la autorización de la comercialización de bebidas a base de leche con fitosteroles/ fitostanoles añadidos como nuevos alimentos o nuevos ingredientes alimentarios con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L366, 14-16.
- Decisión 2006/58/CE de la Comisión de 24 de enero de 2006 por la que se autoriza la comercialización de pan de centeno con fitosteroles/fitostanoles añadidos como nuevos alimentos o nuevos ingredientes alimentarios de conformidad con el Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L31, 18-20.
- Decisión 2006/59/CE de la Comisión de 24 de enero de 2006 relativa a la autorización de comercialización de pan de centeno

con fitosteroles/fitostanoles añadidos como nuevos alimentos o nuevos ingredientes alimentarios de conformidad con el Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L31, 21-23.

- Decisión 2007/343/CE de la Comisión de 15 de mayo de 2007 por la que se autoriza la comercialización de aceite enriquecido con fitoesteroles o fitoestanoles como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L129, 63-66.
- Decisión 2008/36/CE de la Comisión de 10 de enero de 2008 por la que se autoriza la comercialización de bebidas de arroz con fitoesteroles o fitoestanoles añadidos como nuevo alimento con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L8, 15-17.
- Demonty, I., Ras, R.T., vander Knaap, H.C., Duchateau, G.S., Meijer, L., Zock, P.L., Geleijnse, J.M., Trautwein, E.A. **2009**. Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect to of phytosterol intake. *J. Nutr.*, 139, 271-284.
- Derdemezis, C., Filippatos, T., Mikhailidis, D., Elisaf, M. **2010**. Review article: effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *J. Cardiovasc. Pharm.T.*, 15, 120-134.
- Derewiaka, D., Obiedzijski, M. **2012**. Phytosterol oxides content in selected thermally processed products. *Eur. Food Res. Technol.*, 234, 703-712.

- Deschner, E.E., Cohen, B.I., Raicht, R.F. **1982**. The kinetics of the protective effect of β -sitosterol against MNU-induced colon neoplasia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 103, 49-54.
- Devaraj, S., Autret, B.C., Jialal, I. **2006**. Reduced-calorie orange juice beverage with plant sterols lowers C-reactive protein concentrations and improves the lipid profile in human volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 84, 756-761.
- D'Evoli, L., Huikko, L., Lampi, A.M., Lucarini, M., Lombardi-Boccia, G., Nicoli, S., Piironen, V. **2006**. Influence of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.) on plant sterol oxidation in extra virgin olive oil. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 818-823.
- Diczfalusy, U. **2004**. Analysis of cholesterol oxidation products in biological samples. *J. AOAC Int.*, 87, 467-473.
- Dionisi, F., Golay, P.A., Aeschlimann, J.M., Fay, L.B. **1998**. Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: methods comparison and validation. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2227-2233.
- Dutta, P.C., Appelqvist L.Å. **1997**. Studies on phytosterol oxides. I: Effect of storage on the content in potato chips prepared in different vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 647-657.
- Dutta, P.C. **1997**. Studies on phytosterol oxides. II: Content in some vegetable oils and in French fries prepared in these oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 659-666.
- Dutta, P.C. **2002**. Determination of phytosterol oxidation products in foods and biological samples. En: *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence and Biological Effects*.

- Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., Savage, G.P. (Eds.). JAOCS. Press, Champaign, IL, p. 335-374.
- Dutta, P.C. **2004**. Chemistry, analysis, and occurrence of phytosterol oxidation products in foods. En: *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*. Dutta, P. D. (Eds.) Marcel Dekker Inc, New York, p. 397-418.
 - Dutta, P.C., Przybylski, R., Eskin, M.N.A., Appelqvist, L.Å. **2006**. Formation, analysis and health effects of oxidized sterols in frying fat. En: *Deep Frying; Chemistry, Nutrition and Practical Applications*. Erickson, M.D. (Eds.). JAOCS. Press, Urbana, IL, p.11-164.
 - EFSA 2007 Statement. Statement of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a novel food application on fruit juices and nectars with added phytosterols (Request N° EFSA-Q-2006-057). <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/391.pdf> (consultado: septiembre 2014)
 - Elías, R.J., Kellerby, S.S., Decker, E.A. **2008**. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 48, 430-441.
 - Eскурriol, V., Marí-Dell'Olmo, M., Rohlf, I., Borrell, C., Chirlaque, M.D., Buckland, G., Rodriguez, L., Sánchez, M.J. Amiano, P., Egüés, N., Ros, E. **2009**. Plant sterol intake and education level in the Spanish EPIC cohort. *Nutrition*, 25, 769-773.
 - Fernandes, P., Cabral, J.M.S. **2007**. Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technol.*, 98, 2335-2350.

- Field, F.J., Mathur, S.N. **1983**. Beta-sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. *J. Lipid Res.*, 24, 409-417.
- Field, F.J., Born, E., Mathur, S.N. **1997**. Effect of micellar betasitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *J. Lipid Res.*, 38, 348-360.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. **1957**. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Gabay, O., Sanchez, C., Salvat, C., Chevy, F., Breton, M., Nourissat, G., Wolf, C., Jacques, C., Berenbaum, F. **2010**. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthr. Cartilage*, 18, 106-116.
- García-Alonso, F. J., Periago, M. J., Vidal-Guevara, M. L., Cantos, E., Ros, G., Ferreres, F., Abellán, P. Assessment of the antioxidant properties during storage of a dessert made from grape, cherry, and berries. *J. Food Sci.*, 2003, 68, 1525-1530.
- García-Alonso, F.J., Bravo, S., Casas, J., Pérez-Conesa, D., Jacob, K., Periago, M.J. **2009**. Changes in antioxidant compounds during the shelf life of commercial tomato juices in different packaging materials. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 6815-6822.
- García-Llatas, G., Cercaci, L., Rodríguez-Estrada, M.T., Lagarda, M.J., Farré, R., Lercker, G. **2008**. Sterol oxidation in ready-to-eat infant foods during storage. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 469-475.
- García-Llatas, G., Rodríguez-Estrada, M.T. **2011**. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chem. Phys. Lipids*, 164, 607-624.

- Genser, B., Silbernagel, G., De Backer, G., Bruckert, E., Carmena, R., Chapman, M.J., Deanfield, J., Descamps, O.S., Rietzschel, E.R., Dias, K.C., März, W. **2012**. Plant sterols and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Heart J.*, 33, 444-445.
- Georgiou, C.A., Constantinou, M.S., Kapnissi-Christodoulou, C.P. **2014**. Sample preparation: A critical step in the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chem.*, 145, 918-926.
- Ghazani, S., García-Llatas, G., Marangoni, A.G. **2013**. Minor constituents in canola oil processed by traditional and minimal refining methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 90, 743-756.
- Grandgirard, A., Bretillon, L., Martine, L., Beaufriere, B. **1999**. Oxyphytosterols in human plasma. *Chem. Phys. Lipids*, 101, 141-213.
- Grandgirard, A., Martine, L., Joffre, C., Juaneda, P., Berdeaux, O. **2004a**. Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxysterol derivatives. Application to a phytosterolenriched food. *J. Chromatogr. A*, 1040, 239-250.
- Grandgirard, A., Martine, L., Demaison, L., Cordelet, C., Joffre, C., Berdeaux, O., Semon, E. **2004b**. Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *Br. J. Nutr.*, 91, 101-106.
- Grandgirard, A., Demaison-Meloche, J., Cordelet, C., Demaison, L. **2004c**. Incorporation of oxyphytosterols in tissues of hamster. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44, 599-608.

- Grandgirard, A., Martine, L., Juaneda, P., Cordelet, C. **2004d**. Sitostanetriol is not formed in vivo from sitosterol in the rat. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44, 609-616.
- Grattan, B.J. **2013**. Plant sterols as anticancer nutrients: evidence for their role in breast cancer. *Nutrients*, 5, 359-387.
- Guardiola, F., Codony, R., Rafecas, M., Boatella, J. **1995**. Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *J. Chromatogr. A*, 705, 289-304.
- Guardiola, F., Codony, R., Addis, P.B., Rafecas, M., Boatella, J. **1996**. Biological effects of oxysterols: Current status. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 193-211.
- Guardiola, F., Boatella, J., Codony, R. **2002**. Determination of Cholesterol Oxidation Products by Gas Chromatography. En: *Cholesterol and Phytosterols Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*. Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., Savage, G.P. (Eds.). AOCS Press, Champaign, p. 50-65.
- Guardiola, F., Bou, R., Boatella, J., Codony, R. **2004**. Analysis of sterol oxidation products in foods. *J. AOAC Int.*, 87, 441-466.
- Gutendorf, B., Westendorf, J. **2001**. Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology*, 166, 79-89.
- Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H.N., Ellegård, L., Jessup, W., Jones, P.J., Lütjohann, D., Maerz, W., Masana, L., Silbernagel, G., Staels, B., Borén, J., Catapano, A.L., De Backer, G., Deanfield, J., Descamps, O.S., Kovanen, P.T., Riccardi, G.,

- Tokgözoğlu, L., Chapman, M.J. for the European Atherosclerosis Society Consensus Panel on Phytosterols. **2014**. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 232, 346-360.
- Hara, A., Radin, N.S. **1978**. Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. *Anal. Biochem.*, 90, 420-426.
 - Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E. **2010**. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J. Chromatogr. A*, 1217, 2495-2511.
 - Houweling, A.H., Vanstone, C.A., Trautwein, E.A., Duchateau, G.S., Jones, P.J. **2009**. Baseline plasma plant sterol concentrations do not predict changes in serum lipids, C reactive protein (CRP) and plasma plant sterols following intake of a plant sterol-enriched food. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 63, 543-551.
 - Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lütjohann, D., Mensink, R.P., Trautwein, E.A. **2008**. Biological effects of oxidized phytosterols: a review of the current knowledge. *Prog. Lipid Res.*, 47, 37-49.
 - Huang, L., Zhong, T., Chen, T., Ye, Z., Chen, G. **2007**. Identification of beta-sitosterol, stigmasterol and ergosterin in *A. roxburghii* using supercritical fluid extraction followed by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 3024-3032.
 - Ikeda, I., Konno, R., Shimizu, T., Ide, T., Takahashi, N., Kawada, T., Nagao, K., Inoue, N., Yanagita, T., Hamada, T., Morinaga, Y., Tomoyori, H., Imaizumi, K., Suzuki, K. **2006**. Campesterol-5-en-3-

- one, an oxidized derivative of campesterol, activates PPAR α , promotes energy consumption and reduces visceral fat deposition in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1760, 800-807.
- Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G., Gallo, L. **1988**. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *J. Lipid Res.*, 29, 1573-1582.
 - Ikeda, I., Matsuoka, R., Hamada, T., Mistui, K., Imabayashi, S., Uchino, A., Sato, M., Kuwano, E., Itamura, T., Yamada, K., Tanaka, K., Imaizumi, K. **2002**. Cholesterol esterase accelerates intestinal cholesterol absorption. *Biochim. Biophys. Acta*, 1571, 34-44.
 - ISO 6799. **1991**. Determination of the composition of the sterol fraction of fats and oils by gas-liquid chromatography. http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=13299 (consultado: septiembre 2014)
 - ISO 12228. **1999**, revisado en **2014**. Animal and vegetable fats and oils-determination of the composition of individual and total sterols contents-gas chromatographic method. http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=60248 (consultado: septiembre 2014)
 - IUPAC Method 2.401. **1987**. Determination of unsaponifiable matter. http://old.iupac.org/publications/books/ISBN0632033371_compress.pdf (consultado: septiembre 2014)
 - IUPAC Method 2.403. **1987**. Identification and determination of sterols by gas-liquid chromatography.

http://old.iupac.org/publications/books/ISBN0632033371_compres.pdf (consultado: septiembre 2014)

- Jesch, E.D., Seo, J.M., Carr, T.P., Lee, J.Y. **2009**. Sitosterol reduces messenger RNA and protein expression levels of Niemann-Pick C1-like 1 in FHs 74 Int cells. *Nutr Res.*, 29, 859-866.
- Jiménez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A.B., Saura-Calixto, F. **2006**. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3462-3471.
- Johnsson, L., Andersson, R.E., Dutta, P.C. **2003**. Side-chain autoxidation of stigmasterol and analysis of a mixture of phytosterol oxidation products by chromatographic and spectroscopic methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80, 776-783,
- Johnsson, L., Dutta, P.C. **2003**. Characterization of side-chain oxidation products of sitosterol and campesterol by chromatographic and spectroscopic methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80 767-776.
- Johnsson, L., Dutta, P.C. **2005**. Separation of phytosterol oxidation products by combination of different polarity gas chromatography capillary columns. *J. Chromatogr. A*, 1064, 213-217.
- Johnsson, L., Dutta, P.C. **2006**. Determination of phytosterol oxides in some food products by using an optimized transesterification method. *Food Chem.*, 97, 606-613.
- Jones, P.J.H., Vanstone, C.A., Raeni-Sarjaz, M., St-Onge, M.-P. **2003**. Phytosterols in low- and nonfat beverages as part of a controlled diet fail to lower plasma lipid levels. *J. Lipid Res.*, 44, 1713-1719.

- Ju, Y.H., Clausen, L.M., Allred, K.F., Almada, A.L., Helferich, W.G. **2004**. Beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, and a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. *J. Nutr.*, 134, 1145-1151.
- Kamal-Edin, A., Moazzami, A. **2009**. Plant sterols and stanols as cholesterol-lowering ingredients in functional foods. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.*, 1, 1-14.
- Katan, 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 Clin. Proc.*, 78, 965-978.
- Kawahito, Y., Kondo, M., Machmudah, S., Sibano, K., Sasaki, M., Goto, M. **2008**. Supercritical CO² extraction of biological active compounds from loquat seed. *Sep. Purif. Technol.*, 61, 130-135.
- Kemmo, S., Soupas, L., Lampi, A.M., Piironen, V. **2005**. Formation and decomposition of stigmasterol hydroperoxides and secondary oxidation products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107, 805-814.
- Kemmo, S., Ollilainen, V., Lampi, A.M., Piironen, V. **2007**. Determination of stigmasterol and cholesterol oxides using atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Chem.*, 101, 143-1445.
- Kemmo, S., Ollilainen, V., Lampi, A.M., Piironen, V. **2008**. Liquid chromatography mass spectrometry for plant sterol oxide

- determination in complex mixtures. *Eur. Food Res. Technol.*, 226, 1325-1334.
- Kimura, Y., Yasukawa, K., Takido, M., Akihisa, T., Tamura, T. **1995**. Inhibitory effect of some oxygenated stigmastane-type sterols on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 1617-1619.
 - Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M., Gliszczynska-Swiglo, A. **2007**. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J. Food Compos. Anal.*, 20, 313-322.
 - Klingber, S., Winkvist, A., Hallmans, G., Johansson, I. **2012**. Evaluation of plant sterol intake estimated with the Northern Sweden FFQ. *Public Health Nutr.*, 16, 460-467.
 - Kmiecik, D., Korczak, J., Rudzinska, M., Michałowska, A.G., Hes, M. **2009**. Stabilization of phytosterols in rapeseed oil by natural antioxidants during heating. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111, 1124-1132.
 - Kmiecik, D., Korczak, J., Rudzinska, M., Kobus-Cisowska, J., Gramza-Michałowska, A., Hes, M. **2011**. β -Sitosterol and campesterol stabilisation by natural and synthetic antioxidants during heating. *Food Chem.*, 128, 937-942.
 - Koschutnig, K., Heikkinen, S., Kemmo, S., Lampi, A.M., Piironen, V., Wagner, K.H. **2009**. Cytotoxic and apoptotic effects of single and mixed oxides of β -sitosterol on HepG2-cells. *Toxicol. Vitro*, 23, 755-762.
 - Koschutnig, K., Kemmo, S., Lampi, A.M., Piironen, V., Fritz-Ton, C., Wagner, K.H. **2010**. Separation and isolation of β -sitosterol

- oxides and their nonmutagenic potential in the Salmonella microsome assay. *Food Chem.*, 118, 133-140.
- Laakso, P. **2005**. Analysis of sterols from various food matrices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107, 402-410.
 - Lagarda, M.J., García-Llatas, G., Farré, R. **2006**. Analysis of phytosterols in foods. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 41, 1486-1496.
 - Lambelet, P., Grandgirard, E., Gregoire, S., Juaneda, P., Sebedio, J.L., Bertoli, C. **2003**. Formation of modified fatty acids and oxyphytosterols during refining of low erucic acid rapeseed oil. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4284-4290.
 - Lampi, A.M., Juntunen, L., Toivo, J., Piironen, V. **2002**. Determination of thermooxidation products of plant sterols. *J. Chromatogr. B*, 777, 83-92.
 - Lampi, A.M., Kemmo, S., Makela, A., Heikkinen, S., Piironen, V. **2009**. Distribution of monomeric, dimeric and polymeric products of stigmasterol during thermooxidation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111, 1027-1034.
 - Lea, L.J., Hepburn, P.A., Wolfreys, A.M., Baldrick, P. **2004**. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with phytosterol oxides. *Food Chem. Toxicol.*, 42, 771-783.
 - Lengyel, J., Rimarcik, J., Vaganek, A., Fedor, J., Lukeš, V., Klein, E. **2012**. Oxidation of sterols: Energetics of C–H and O–H bond cleavage. *Food Chem.*, 133, 1435-1440.
 - Lercker, G., Rodríguez-Estrada, M.T. **2002**. Cholesterol oxidation mechanisms. En: *Cholesterol and Phytosterols Oxidation*

- Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*. Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., Savage, G.P. (Eds.), AOCS Press, Champaign, p. 1-25.
- Li, C., Yao, Y., Zhao, G., Cheng, W., Liu, H., Liu, C., Shi, Z, Chen, Y., Wang, S. **2011**. Comparison and analysis of fatty acids, sterols, and tocopherols in eight vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 12493-12498.
 - Liang, Y.T., Wong, W.T., Guan, L., Tian, X.Y., Ma, K.Y., Huang, Y., Chen, Z.Y. **2011**. Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, 219, 124-133.
 - Llaverias, G., Danilo, C., Wang, Y., Witkiewicz, A.K., Daumer, K., Lisanti, M.P., Frank, P.G. **2010**. A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Am. J. Pathol.*, 177, 3180–3191.
 - Llaverias, G., Escolà-Gil, J.C., Lerma, E., Julve, J., Pons, C., Cabré, A., Cofán, M., Ros, E., Sánchez-Quesada, J.L., Blanco-Vaca, F. **2013**. Phytosterols inhibit the tumor growth and lipoprotein oxidizability induced by a high-fat diet in mice with inherited breast cancer. *J. Nutr. Biochem.*, 24, 39-48.
 - Lu, B., Zhang, Y., Wu, X., Shi, J. **2007**. Separation and determination of diversiform phytosterols in food materials using supercritical carbon dioxide extraction and ultraperformance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, 588, 50-63.
 - Lütjohann, D., Bjorkhem, I., Beil, U.F., Von Bergmann, K. **1995**. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated

- by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J. Lipid Res.*, 36, 1763-1773.
- Maduko, C.O., Park, Y.W. **2007**. Modification of fatty acid and sterol composition of caprine milk for use as infant formula. *Int. Dairy J.*, 17, 1434-1440.
 - Maguire, L., Konoplyannikov, M., Ford, A., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. **2003**. Comparison of the cytotoxic effects of beta-sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7-beta-hydroxycholesterol, in cultured mammalian cells. *Br. J. Nutr.*, 90, 767-775.
 - Maki, K.C., Shinnick, F., Seeley, M.A., Veith, P.E., Quinn, L.C., Hallissey, P.J., Temer, A., Davidson, M.H. **2003**. Food products containing free tall oil-based phytosterols and oat beta-glucan lower serum total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic adults. *J. Nutr.*, 133, 808-813.
 - Marangoni, F., Poli, A. **2010**. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol. Res.*, 61,193-199.
 - Márquez Ruíz, G., Dobarganes, M.C. **2007**. Nutritional and physiological effects of used frying oils and fats. En: *Deep Frying: Chemistry, Nutrition, and Practical Applications*. (Eds.) Erickson M., AOCS, Champaign, IL (USA), p. 173-204.
 - McCann, S.E., Freudenheim, J.L., Marshall, J.R., Graham, S. **2003**. Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *J. Nutr.*, 133, 1937-1942.

- McClements, D.J., Decker, E.A. Weiss, J. **2007**. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food Sci.*, 72, 109-124.
- McClements, D.J. **2012**. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Adv. Colloid Interfac.*, 174, 1-30.
- Mel'nikov, S.M., Seijen ten Hoorn, J.W.M., Bertrand, B. **2004**. Can cholesterol absorption be reduced by phytosterols and phytostanols via a cocrystallization mechanism? *Chem. Phys. Lipids*, 127, 15-33.
- Mendilaharsu, M., Stefani, E.D., Deneo-Pellegrini, H., Carzoglio, J., Ronco, A. **1998**. Phytosterols and risk of lung cancer: A case-control study in Uruguay. *Lung Cancer*, 21, 37-45.
- Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I. **2008a**. Stability of sterols in phytosterol-enriched milk under different heating conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 9997-10002.
- Menéndez-Carreño, M., García-Herreros, C., Astiasarán, I., Ansorena, D. **2008b**. Validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of sterol oxidation products in serum. *J. Chromatogr. B*, 864, 61-68.
- Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., Piironen, V., Lampi, A.M. **2010**. Determination of non-polar and mid-polar monomeric oxidation products of stigmasterol during thermo-oxidation. *Food Chem.*, 122, 277-284.
- Mensink, R.P., de Jong, A., Lütjohann, D., Haenen, G.R.M.M., Plat, J. **2010**. Plant stanols dose-dependently decrease LDL-cholesterol concentrations, but not cholesterol-standardized fat-

- soluble antioxidant concentrations, at intakes up to 9 g/d. *Am. J. Clin. Nutr.* 92, 24-33.
- Meyer, W., Jungnickel, H., Jandke, M., Dettner, K., Spittler, G. **1998**. On the cytotoxicity of oxidized phytosterols isolated from photoautotrophic cell cultures of *Chenopodium rubrum* tested on meal-worms *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry*, 47, 789-797.
 - Mezine, I., Zhang, H., Macku, C., Lijana, R. **2003**. Analysis of plant sterol and stanol esters in cholesterol-lowering spreads and beverages using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5639-5646.
 - Micallef, M.A., Garg, M.L. **2009**. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis*, 204, 476-482.
 - Montserrat-de la Paz, S., Fernández-Arche, A., Ángel-Martín, M., García-Giménez, M.D. **2012**. The sterols isolated from Evening Primrose oil modulate the release of proinflammatory mediators. *Phytomedicine*, 19, 1072-1076.
 - Moon, D., Lee, K., Choi, Y.H., Kim, G. **2007**. b-Sitosterol-induced apoptosis is mediated by the activation of ERK and the downregulation of Akt in MCA-102 murine fibrosarcoma cells. *Int. Immunopharmacol.*, 7, 1044-1053.
 - Moreau, R., Whitaker, B., Hicks, K. **2002**. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.*, 41, 457-500.

- Musa-Veloso, K., Poon, T.H., Elliot, J.A., Chung, C.A. **2011**. Comparison of the LDL-cholesterol lowering efficacy of plant stanols and plant sterols over a continuous dose range: results of a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 85, 9-28.
- Naumann, E., Plat, J., Kester, A.D., Mensink, R.P. **2008**. The baseline serum lipoprotein profile is related to plant stanol induced changes in serum lipoprotein cholesterol and triacylglycerol concentrations. *J. Am. Coll. Nutr.*, 27, 117-126.
- Navarro, A., De Las Heras, B., Villar, A. **2001**. Antiinflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem. *Biol. Pharm. Bull.*, 24, 470-473.
- Newill, H., Loskel, R., Wagner, J., Johannes, C., Lorenz, R.L., Lehmann, L. **2007**. Oxidation products of stigmasterol interfere with the action of the female sex hormone 17 β -estradiol in cultured human breast and endometrium cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 888-898.
- Normén, L., Bryngelsson, S., Johnsson, M., Eyheden, Ellega, L., Brantsm, H., Andersson, H., Dutta, P. **2002**. The phytosterol content of some cereal foods commonly consumed in Sweden and in the Netherlands. *J. Food Compos. Anal.*, 15, 693-704.
- Normén, L., Ellegard, L., Brants, H., Dutta, P., Andersson, H. **2007**. A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. *J. Food Compos. Anal.*, 20, 193-201.
- Nourooz-Zadeh, J., Appelqvist, L. **1992**. Isolation and quantitative determination of sterol oxides in plant-based foods: soybean oil and wheat flour. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 288-293.

- O'Callaghan, Y., Foley, D.A., O'Connell, N.M., McCarthy, F.O., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. **2010**. Cytotoxic and apoptotic effects of the oxidized derivatives of stigmasterol in the U937 human monocytic cell line. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 10793-10798.
- O'Callaghan, Y., Kenny, O., O'Connell, N.M., Maguire, A., McCarthy, F., O'Brien, N.M. **2013**. Synthesis and assessment of the relative toxicity of the oxidised derivatives of campesterol and dihydrobrassicasterol in U937 and HepG2 cells. *Biochimie*, 95, 496-503.
- O'Callaghan, Y., McCarthy, F.O., O'Brien, N.M. **2014**. Recent advances in phytosterol oxidation products. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 446, 786-791.
- OMS-FAO. **1995**. Consulta conjunta. Processing and refining edible oils in fats and oils in human nutrition. *Nutr. Rev.*, 53, 202-205.
- Ostlund, R.E. Jr. **2002**. Phytosterols in human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.*, 22, 533-549.
- Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I. **2010**. Oxysterols: A world to explore. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 3289-3303.
- Pakrashi, A., Basak, B. **1976**. Abortifacient effect of steroids from *Ananas comosus* and their analogues on mice. *J. Reprod. Fertil.*, 46, 461-462.
- Pakrashi, A., Chakrabarty, S. **1979**. Antifertility effects of the steroid 5-alpha-stigmastane- 3-beta, 5,6-beta-triol-3-monobenzoate on mice. *Contraception*, 19, 145-150.

- Park, C., Moon, D., Rhu, C., Choi, B.T., Lee, W.H., Kim, G., Choi, Y.H. **2007**. β -Sitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio. *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 1317-1323.
- Park, S.W., Addis, P.B. **1986**. Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 653-659.
- Park, W.T., Guardiola, F., Park, S.H., Addis, P.B. **1996**. Kinetic evaluation of 3 β hydroxycholest-5-en-7-one (7-ketocholesterol) stability during saponification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 623-629.
- Phillips, K.M., Ruggio, D., Toivo, J., Swank, M. Simpkins A. **2002**. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J. Food Compos. Anal.*, 15, 123-142.
- Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Ashraf-Khorassani, M. **2005**. Phytosterol Composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9436-9445.
- Piironen, V., Lindsay, D., Miettinen, T., Toivo, J. Lampi, A.M. **2000a**. Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 939-966.
- Piironen, V., Toivo, J., Lampi, A.M. **2000b**. Natural sources of dietary plant sterols. *J. Food Compos. Anal.*, 13, 619-624.
- Piironen, V., Toivo, J., Lampi, A.M. **2002**. Plant sterols in cereal products. *Cereal Chem.*, 79, 148-154.
- Piironen, V., Toivo, J., Puupponen-Pimiä, R., Lampi, A.M. **2003**. Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *J. Sci. Food Agric.*, 83, 330-337.

- Piironen, V., Lampi, A. **2004**. Occurrence and levels of phytosterols in foods. En: *Phytosterols As Functional Food Components and Nutraceuticals*, Dutta C (Ed) Marcel Dekker Inc.: New York. p. 1-32.
- Plat, J., Brzezinka, H., Lütjohann, D., Mensink, R.P., Von Bergmann, K. **2001**. Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Lipid Res.*, 42, 2030-2038.
- Plat, J., Mensink, R.P. **2005**. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: Mechanism and safety aspects. *Am. J. Cardiol.*, 96, 15-22.
- Plat, J., Nichols, J.A., Mensink, R.P. **2005**. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J. Lipid Res.*, 46, 2468-2476.
- Plat, J., Mackay, D., Baumgartner, S., Clifton, P.M., Gylling, H., Jones, P.J.H., Awad, A., Chapman, J., Baker, P.C., Gylling, H., Jones, P., Lütjohann, D., März, W., Moreau, B., Ostlund, R., Plat, J., Rideout, T., Ros, E., Schaefer, E., Daniel, T., Vartiainen, E., Weingartner, O., Zampelas, A., Berger, A., Wester, I., Rosin, S., Meijer, G., Trautwein, E., Ras, R., Antoine, J.M., Jeansen, S., Koutnikova, H., Short, C., Messinger, H., Horlacher, P., Ehrhardt, C., Brañes, C., Harting, T., Thompson, G., Tikkanen, M., Shaghghi, M.A., Baer, D., Ansorena, D., Baumgartner, S., Blanco-Vaca, F., Ellegard, L., Carles, J., Laitinen, K., Mackay, D., Myrie, S., Miettinen, T., Mymin, D., Robinson, M., Rompelberg, C., Sarkkinen, E., Silbernagel, G., de Smet, E., Loman, S. **2012**. Progress and

prospective of plant sterol and plant stanol research: Report of the Maastricht meeting. *Atherosclerosis*, 225, 521-533.

- Plat, J., Theuwissen, E., Husche, C., Lütjohann, D., Gijbels, M.J., Jeurissen, M., Shiri-Sverdlov, R., van der Made, I., Mensink, R.P. **2014**. Oxidised plant sterols as well as oxysterol increase the proportion of severe atherosclerotic lesions in female LDL receptor +/- mice. *Br. J. Nutr.*, 111, 64-70.
- Plumb, J.A., Rhodes, M.J.C., Lampi, A.M., Buchgraber, M., Kroon, P.A. **2011**. Phytosterols in plant foods: Exploring contents, data distribution and aggregated values using an online bioactives database. *J. Food Compos. Anal.*, 24, 1024-1031.
- Quilliot, D., Boman, F., Creton, C., Pelletier, X., Floquet, J., Debry, G. **2001**. Phytosterols have an unfavourable effect on bacterial activity and no evident protective effect on colon carcinogenesis, *Eur. J. Cancer Prev.*, 10, 237-243.
- Ras, R.T., Hiemstra, H., Lin, Y., Vermeer, M.A. Duchateau, G.S.M.J.E., Trautwein, E.A. **2013**. Consumption of plant sterol-enriched foods and effects on plasma plant sterol concentrations a meta-analysis of randomized controlled studies. *Atherosclerosis*, 230, 336-346.
- Reglamento 1997/258/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. Diario Oficial de la Unión Europea L043, 1-6.
- Reglamento 2004/608/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 relativo al etiquetado de alimentos e ingredientes alimentarios con fitosteroles, ésteres de fitosterol,

- fitostanoles o ésteres de fitostanol añadidos. Diario Oficial de la Unión Europea L097, 44-42.
- Reglamento 2006/1924/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Diario Oficial L 404, 9-25.
 - Reglamento 2009/983/CE de la Comisión, de 21 de octubre de 2009, sobre la autorización o la denegación de autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. Diario Oficial de la Unión Europea L 277 3-12.
 - Reglamento 2012/432/CE de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. Diario Oficial de la Unión Europea L 136 1-40.
 - Roussi, S., Winter, A., Gosse, F., Werner, D., Zhang, X., Marchioni, E., Geoffroy, P., Miesch, M., Raul, F. **2005**. Different apoptotic mechanisms are involved in the antiproliferative effects of 7-beta-hydroxysitosterol and 7-beta-hydroxycholesterol in human colon cancer cells. *Cell Death Differ.*, 12, 128-35.
 - Roussi, S., Gossé, F., Aoudé-Werner, D., Zhang, X., Marchioni, E., Geoffroy, P., Miesch, M., Raul, F. **2007**. Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lisosomal destabilization are involved in 7b-hydroxysitosterol and 7b-hydroxycholesterol

- triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis*, 12, 87-96.
- Rozner, S., Garti, N. **2006**. The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 282-283, 435-456.
 - Rubis, B., Paszel, A., Kaczmarek, M., Rudzinska, M., Jelen, H., Ryczyńska, M. **2008**. Beneficial or harmful influence of phytosterols on human cells? *Br. J. Nutr.*, 100, 1183-1191.
 - Rudkowska, I., Plant sterols and stanols for healthy ageing. **2010**. *Maturitas*, 66, 158-162.
 - Rudzinska, M., Kazuś, T., Wąsowicz, E. **2001**. Sterols and their oxidized derivatives in refined and cold pressed seed oils. *Rośliny Oleiste*, 22, 477-494.
 - Rudzinska, M., Uchman, W., Wąsowicz, E. **2005**. Plant sterols in food technology. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 4, 147-156.
 - Rudzinska, M., Przybylski, R., Zhao, Y.Y., Curtis, J.M. **2010**. Sitosterol thermooxidative degradation leads to the formation of dimers, trimers and oligomers: a study using combined size exclusion chromatography/mass spectrometry. *Lipids*, 45, 549-558.
 - Rudzinska, M., Przybylski, R., Wasowicz, E. **2014**. Degradation of phytosterols during storage of enriched margarines. *Food Chem.*, 142, 294-298.
 - Russell, D.W. **2000**. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1529, 126-135.
 - Ryan, E., Chopra, J., McCarthy, F., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. **2005**. Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their

- corresponding cholesterol oxidation products. *Br. J. Nutr.*, 94, 443-451.
- Ryan, E., McCarthy, F.O., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. **2009**. Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence, and biological effects. *Food Rev. Int.*, 25, 157-174.
 - Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. **2009**. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *J. Food Eng.*, 95, 240-253.
 - Salen, G., Horak, I., Rothkopf, M., Cohen, J.L., Speck, J., Tint, G.S., Shore, V., Dayal, B., Chen, T., Shefer, S. **1985**. Lethal atherosclerosis associated with abnormal plasma and tissue sterol composition in sitosterolemia with xanthomatosis. *J. Lipid Res.* 26, 1126-1133.
 - Santos, R., Limas, E., Sousa, M., Castilho, M.C., Ramos, F., Silveira, M.I.N. **2007**. Optimization of analytical procedures for GC-MS determination of phytosterols and phytostanols in enriched milk and yoghurt. *Food Chem.*, 102, 113-117.
 - Saraiva, D., Castilho, M.C. Martins, M.R., Silveira, M.I.N., Ramos, F. **2011**. Evaluation of phytosterols in milk and yogurts used as functional foods in Portugal. *Food Anal. Methods*, 4, 28-34.
 - Sarojini, J.K.A., Ubhayasekera, J., Dutta, P.C. **2012**. Assessment of sterol oxidation in oils recovered from exhausted bleaching earth by coupled capillary column GC and GC-MS methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 89, 1427-1433.
 - Sato, H., Nishida, S., Tomoyori, H., Sato, M., Ikeda, I., Imaizumi, K. **2004**. Oxysterol regulation of estrogen receptor α -mediated gene

expression in a transcriptional activation assay system using HeLa cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1790-1793.

- Säynäjoki, S., Sundberg, S., Soupas, L., Lampi, A.M., Piironen, V. **2003**. Determination of stigmasterol primary oxidation products by high-performance liquid chromatography. *Food Chem.*, 80, 415-421.
- SCF, **2000**. Opinion on a request for the safety assessment of the use of phytosterol esters in yellow fat spreads. Opinión adoptada por el Scientific Committee on Food el 6 de Abril de 2000. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out56_en.pdf (consultado: septiembre 2014).
- SCF, **2002**. General view on the long-term effects of the intake of elevated levels of phytosterols from multiple dietary sources, with particular attention to the effects on β -carotene. Opinión adoptada por el Scientific Committee on Food el 26 de Septiembre 2002. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out143_en.pdf (consultado: septiembre 2014).
- Schmarr, H.G., Gross, H.B., Shibamoto, T. **1996**. Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 512-517.
- Schroepfer, G.J. **2000**. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other process. *Physiol. Rev.*, 80, 361-554.
- Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., Lampi, A.M. **2008**. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J. Food Compos. Anal.*, 21, 152-161.

- Sioen, I., Matthys, C., Huybrechts, I., Van Camp, J., De Henauw, S. **2011**. Consumption of plant sterols in Belgium: estimated intakes and sources of naturally occurring plant sterols and β -carotene. *Br. J. Nutr.*, 105, 960-966.
- Smart, E.J., De Rose, R.A., Farber, S.A. **2004**. Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3450–3455.
- Smith, L.L. **1987**. Cholesterol autoxidation. *Chem. Phys. Lipids*, 44, 87-125.
- Sorenson, W.R., Sullivan, D. **2007**. Determination of campesterol, stigmasterol, and β -sitosterol in saw palmetto raw materials and dietary supplements by gas chromatography: collaborative study. *J. Am. Oil Chem. Soc., Int.*, 90, 670-678.
- Sosinska, E., Przybylski, R., Hazendonk, P., Zhao, Y.Y., Curtis, J.M. **2013**. Characterization of non-polar dimers formed during thermo-oxidative degradation of β -sitosterol. *Food Chem.*, 139, 464-474.
- Sosinska, E., Przybylski, R., Aladedunye, F., Hazendonk, P. **2014**. Spectroscopic characterisation of dimeric oxidation products of phytosterols. *Food Chem.*, 151, 404-414.
- Sottero, B., Gamba, P., Gargiulo, S., Leonarduzzi, G., Poli, G. **2009**. Cholesterol oxidation products and disease: an emerging topic of interest in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.*, 16, 685-705.
- Soupas, L., Juntunen, L., Lampi, A.M., Piironen, V. **2004a**. Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6485-6491.

- Soupas, L., Juntunen, L., Säynäjoki, S., Lampi, A.M., Piironen, V. **2004b**. GC–MS Method for characterization and quantification of sitostanol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81, 135-141.
- Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M., Piironen, V. **2005**. Esterification affects phytosterol oxidation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107, 107-118.
- Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M., Piironen, V. **2006**. Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 222, 266-273.
- Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M., Piironen, V. **2007**. Pan-frying may induce phytosterol oxidation. *Food Chem.*, 101, 286-297.
- Struijs, K., Lampi, A.M., Ollilainen, V., Piironen, V. **2010**. Dimer formation during the thermo-oxidation of stigmaterol. *Eur. J. of Lipid Sci. Technol.*, 231, 853-863.
- Sumner, C., Bernicki, S., Dolfi, M. **1995**. Process of the production of sterol and tocoferol concentrates. US Patent 5,424-456.
- Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M., Wellsm, W.W. **1963**. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85, 2497-2507.
- Tabee, E., Azadmard-Damirchi, S., Jägerstad, M., Dutta, P.C. **2008a**. Lipids and phytosterol oxidation in commercial French fries commonly consumed in Sweden. *J. Food Compos. Anal.*, 21, 169-177.
- Tabee, E., Azadmard-Damirchi, S., Jägerstad, M., Dutta, P.C. **2008b**. Effect of α -tocopherol on oxidative stability and phytosterol

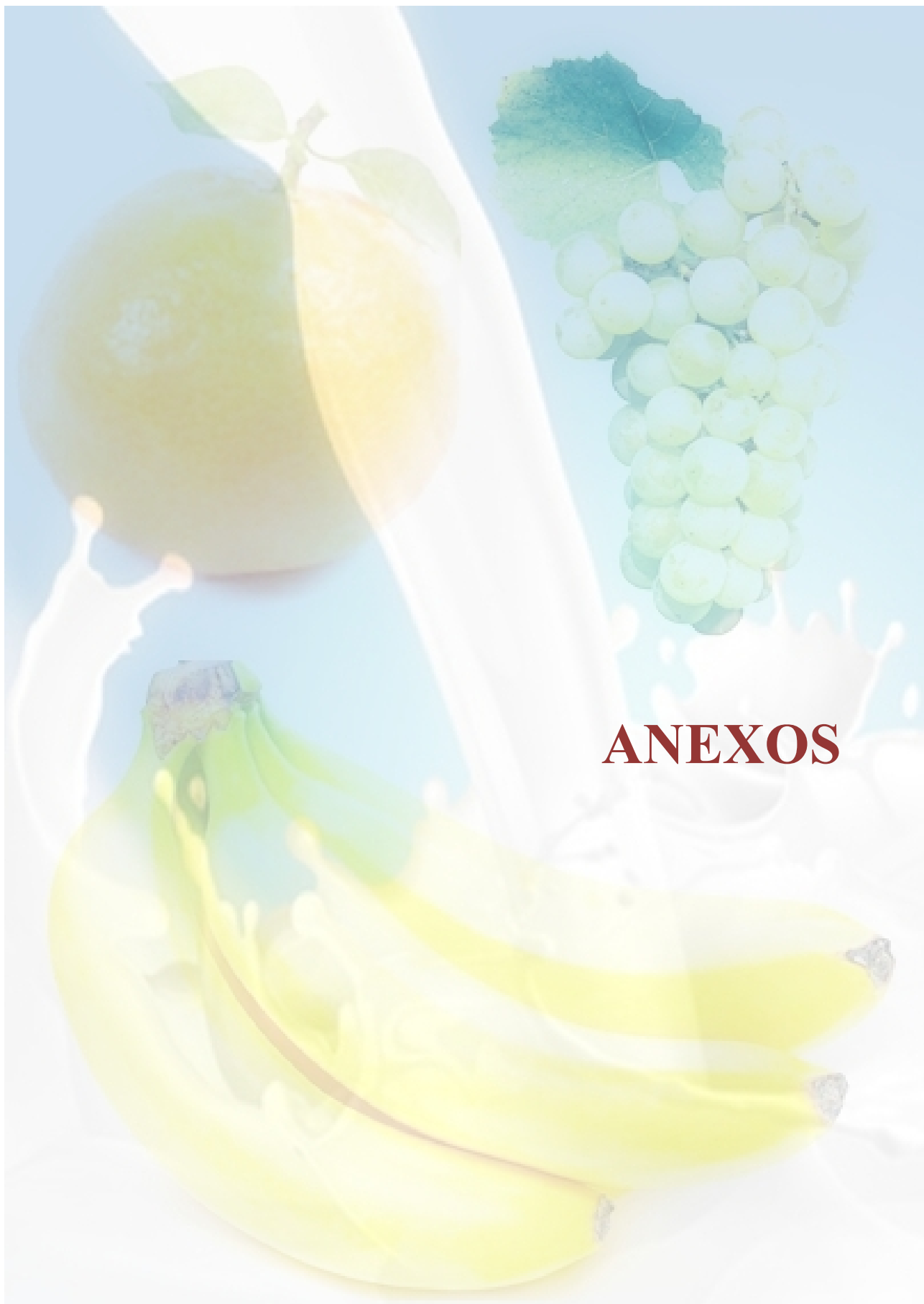
- oxidation during heating in some regular and high oleic vegetable oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 85, 857-867.
- Tabee, E., Jägerstad, M., Dutta, P. **2009**. Frying quality characteristics of French fries prepared in refined olive oil and palm olein. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 86, 885-893.
 - Tai, C.Y., Chen, Y.C., Chen, B.H. **1999**. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (Part I). *J. Food Drug Anal.*, 7, 243-257.
 - Talati, R., Sobieraj, D.M., Makanji, S.S., Phung, O.J., Coleman, C.I. **2010**. The comparative efficacy of plant sterols and stanols on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *J. Am. Diet Assoc.*, 110, 719-726.
 - Tomoyori, H., Kawata, Y., Higuchi, T., Ichi, I., Sato, H., Sato, M., Ikeda, I., Imaizumi, K. **2004**. Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *J. Nutr.*, 134 1690-1696. Erratum en: *J. Nutr.*, **2004** 134, 2738.
 - Tonello, A., Poli, G. **2006**. Serum phytosterols not only from dietary intake. *Br. J. Nutr.*, 96, 791-792.
 - Touillaud, M.S., Pillow, P.C., Jakovljevic, J., Bondy, M.L., Singletary, S.E., Li, D., Chang, S. **2005**. Effect of dietary intake of phytoestrogens on estrogen receptor status in premenopausal women with breast cancer. *Nutr. Cancer*, 51, 162-169.
 - Trautwein, E.A., Duchateau, G.S.M.J.E., Lin, Y., Mel'nikov, S.M., Molhuizen, H.O.F., Ntanos, F.Y. **2003**. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 105, 171-185.

- Trautwein, E.A., Demonty, I. **2007**. Phytosterols: natural compounds with established and emerging health benefits. *Oleagineux Corps Gras Lipides*, 14, 259-266.
- Ulberth, F., Rossler, D. **1998**. Comparison of solid phase extraction methods for the cleanup of cholesterol oxidation products. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2634-2637
- Vági, E., Simándi, B., Vásárhelyiné, K.P., Daood, H., Kéry, A., Doleschall, F., Nagy, B. **2007**. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *J. Supercrit. Fluids*, 40, 218-226.
- Valenzuela, A., Sanhueza J., Nieto, S. **2003**. Cholesterol oxidation: Health hazard and the role of antioxidants in prevention. *Biol. Res.*, 36, 291-302.
- Valenzuela, B.A., Ronco, M. **2004**. Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Rev. Chil. Nutr.*, 31, 161-169.
- Valerio, M., Awad, A.B. **2011**. Beta-Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.*, 11, 1012-1017.
- Valerio, M., Liu, H.B., Heffner, R., Zivadinov, R., Ramanathan, M., Weinstock-Guttman B., Awad, A.B. **2011**. Phytosterols ameliorate clinical manifestations and inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Inflamm. Res.*, 60, 457-465.
- Van den Heuvel, M.R., Leusch, F.D., Taylor, S., Shannon, N., McKague, A.B. **2006**. Assessment of the reproductive-endocrine

- disrupting potential of chlorine dioxide oxidation products of plant sterols. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 2594-2600.
- Vanmierlo, T., Husche, C., Schött, H.F., Pettersson, H., Lütjohann, D. **2013**. Plant sterol oxidation products e Analogs to cholesterol oxidation products from plant origin?. *Biochimie*, 95, 464-472.
 - Vejux, A., Montange, T., Martine, L., Zarrouk, A., Riedinger, J.M., Lizard, G. **2012**. Absence of oxysterol-like side effects in human monocytic cells treated with phytosterols and oxyphytosterols. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 4060-4066.
 - Verleyen, T., Forcades, M., Verhe, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., De Greyt, W. **2002a**. Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 117-122.
 - Verleyen, T., Sosinska, M., Ioannidou, U., Verhe, S., Dewettinck, R., Huyghebaert, A., De Greyt, W. **2002b**. Influence of the vegetable oil refining process on free and esterified sterols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 947-953.
 - Vivancos, M., Moreno, J.J. **2005**. β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264 7 macrophages. *Free Radic. Biol. Med.*, 39, 91-97.
 - Volin, P. **2001**. Analysis of steroidal lipids by gas and liquid chromatography. *J Chromatogr. A*, 935, 125-140.
 - Vundru, S.S., Kale, R.K., Singh, R.P. **2013**. β -sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *BMC Complem. Altern. M.*, 13, 280.

- Wang, D.Q. **2007**. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 221-248.
- Wang, P., Chen, Y.M., He, L.P., Chen, C., Zhang, B., Xue, W., Su, Y. **2012**. Association of natural intake of dietary plant sterols with carotid intima-media thickness and blood lipids in Chinese adults: a cross-section study. *PLOS ONE*, 7, n° e32736.
- Wegrzyn, T.F., Farr, J. M., Hunter, D.C., Au, J., Wohlers, M.W., Skinner, M.A., Stanley, R.A., Sun-Waterhouse, D. **2008**. Stability of antioxidants in an apple polyphenol-milk model system. *Food Chem.*, 109, 310-318.
- Woyengo, T.A., Ramprasath, V.R., Jones, P.J.H. **2009**. Anticancer effects of phytosterols. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 63, 813-820.
- Xu, G., Guan, L., Sun, J., Chen, Z.Y. **2009**. Oxidation of cholesterol and β -sitosterol and prevention by natural antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 9284-9292.
- Yang, C., Chen, Z.Y., Wong, S.L., Liu, J., Liang, Y.T., Lau, C.W., Lee, H.K., Huang, Y., Tsang, S.Y. **2013**. β -Sitosterol oxidation products attenuate vasorelaxation by increasing reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Cardiovasc. Res.*, 97, 520-532.
- Zhang, X., Julien-David, D., Miesch, M., Geoffroy, P., Raul, F., Roussi, S., Aoudé-Werner, D., Marchioni, E. **2005**. Identification and quantitative analysis of β -sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids*, 70, 896-906.
- Zhang, X., Julien-David, D., Miesch, M., Raul, F., Geoffroy, P., Aoude-Werner, D., Ennahar, S., Marchioni, E. **2006**. Quantitative analysis of β -sitosterol oxides induced in vegetable oils by natural

- sunlight, artificially generated light, and irradiation. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5410-5415.
- Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R., Freeman, M.R. **2005**. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J. Clin. Invest.*, 115, 959-968.
 - Zulueta, A., Esteve, M.J., Frasquet, I., Frigola, A. **2007**. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chem.*, 103, 1365-1374.
 - Zunin, P., Calcagno, C., Evangelisti, F. **1998**. Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. *J. Dairy Res.*, 65, 591-598.



ANEXOS

ANEXO I: Patentes relacionadas con la incorporación de EV a alimentos hasta 2013

N° de patente	Año	Denominación	Descripción
Patentes de adición de EV a productos grasos			
EP0839458	1998	Composición y producción de fitoesteroles	Producción de aceite de esteroles vegetales solubilizados, para su uso en alimentos mejorando su estabilidad y absorción. Se caracteriza por la adición de vitamina E y emulgentes para hacer los EV solubles en aceite.
US20006031118	2000	Producción y composición de éster de estanol	Preparación de ésteres de estanoles con AG a partir de ésteres de esteroles con AG.
US20006087353	2000	Composición y uso de fitoesteroles en alimentos, bebidas, productos farmacéuticos, nutracéuticos y similares	Métodos para la esterificación y la posterior hidrogenación de los EV, que proporciona una mayor solubilidad y su dispersión.
WO00061694	2000	Método para la fabricación de EV éster ácido graso insaturado, liposoluble	Preparación mediante: esterificación de los EV con ácido graso insaturado en un disolvente orgánico no polar, un catalizador básico y un agente de activación de grupo carboxilo, seguida por la precipitación del producto esterificado en metanol, o una mezcla de metanol y acetona.
US2000 6162483	2000	Composiciones de grasas para su uso en alimentos	Preparación de EV esterificados a ácidos grasos, que contienen ácidos grasos insaturados. Utilizando agentes texturizantes como sustitutos, total o parcial, de la fase grasa sólida convencional, para ser utilizados en productos que contienen grasa, en donde la cristalización de la fase grasa sólida es de primordial importancia para la calidad sensorial global.
US200026410758	2002	Preparación de esteroil y estanol-ésteres	Esterificación directa de EV con ácidos grasos, para formar, EV esterificados, libres de disolventes orgánicos y ácidos minerales de calidad alimentaria.
US2002 WO02060916	2002	Proceso de producción de esteroles esterificados con ácidos linoleicos conjugados	Preparación de EV ésteres de ácido linoleico conjugado para usos alimentarios y nutracéuticos.

N° de patente	Año	Denominación	Descripción
WO20060916	2002	Métodos para producir composiciones de éster de esteroles	Preparación de ésteres de esteroles utilizando transesterificación de esteroles libres, a partir de aceites vegetales, acilglicéridos en presencia de un catalizador alcalino. Uso como ingredientes alimentarios.
US20026147236	2002	Preparación de EV ésteres	Método para la esterificación directa de EV con ácidos grasos.
US20036589588	2003	Composiciones de fitoesteroles	Preparación de ésteres de EV con ácidos grasos de composición específica.
US20070231447	2007	Composiciones de esteroles y métodos de fabricación	Preparación de esteroles y mezclas con monoacilglicerol para su adición a alimentos tales como bebidas.
WO/2008/125380	2008	Grasa comestible para grasas extensibles	Obtención de una grasa extensible comestible que comprende de 5 a 85% (p/p) de grasa y de 0,1 a 20% (p/p) de EV, presentes en forma de cristales alargados. Para su obtención, se mezclan los EV como cristales alargados con TG, seguidamente se hace una segunda mezcla con componentes de la fase grasa del alimento, para finalmente hacer una tercera mezcla con la fase acuosa.
EPI959746	2008	Grasa de composición mejorada	Método para la obtención de una composición de grasa comestible que comprende de 0 a 90% en peso de EV y de 10 a 98,5% en peso de un componente de grasa comestible. Esta última contiene de 0,05 a 60% en peso de ácido eicosenoico y ácidos grasos n-3 y n-6 en relación 0,6:1 a 5,0:1 sobre la base de la composición de la grasa comestible.
US 20090238942	2009	Método para el desarrollo de fitoesteroles esterificados	Obtención de ingrediente funcional adecuado para su uso en la fabricación de margarinas especiales y mantecas para panadería. El método de fabricación del producto, se basa en la esterificación de EV con ácidos grasos saturados. La reacción de esterificación se lleva a cabo a temperaturas elevadas, bajo vacío, en presencia de un catalizador y, opcionalmente, de aceite de canola alto oleico. El producto de reacción se neutraliza, después se filtra preferiblemente dos veces para eliminar cualquier catalizador residual.
WO/2010/109441	2010	Método para la producción de EV ésteres de fosfolípidos	Método para la producción de ésteres de EV mediante el uso de aciltransferasa lipídica en un medio acuoso y la combinación de una composición de fosfolípidos.
US 20120142644	2012		El método incluye: a) mezclar entre un 10% - 70% de fosfolípidos y como mínimo un 5% de agua; aciltransferasa y EV. b) purificar los ésteres de EV de dicha mezcla. Uso para productos alimenticios y productos cosméticos.

N° de patente	Año	Denominación	Descripción
WO/2011/144405	2011	Grasas extensibles alimentarias	Grasas extensibles que contienen el 85% en peso de grasa, de 0,1 a 20% en peso de EV y dos emulgentes, el primero es un bopolímero soluble en agua y el segundo es un emulgente soluble en aceite. Al menos el 70% en de las partículas de EV son menores que 10 µm. El procedimiento de la preparación es una primera dispersión acuosa de las partículas de EV y el emulgente soluble en agua como mínimo, y la adición de dicha dispersión a una fase grasa o una emulsión de agua en aceite.
WO/2012/084438	2012	Emulsión de grasas extensibles alimentarias con EV	Preparación de una emulsión de grasa comestible que contiene una fase acuosa dispersa y una fase grasa, dicha fase grasa contiene: de 60 a 85% en peso de aceite y grasa estructurante y de 15 a 40% en peso de ésteres de EV.
WO/2012/038226	2012	Grasas extensibles alimentarias	Método para la preparación de grasas extensibles alimentarias que contienen una fase dispersa acuosa y EV no esterificados en forma cristalina. El método incluye: se prepara primero la emulsión de la grasa en una fase continua para posteriormente adicionar los EV no esterificados que recristalizarán rápidamente.
US20130237506	2013	Composición y uso de compuestos de estanol	Composición de estanoles que contienen como componente principal el sitostanol y como mínimo un 10% de campestanol. La composición se esterifica y es especialmente útil en la adición a grasas y aceites comestibles así como en alimentos que contienen grasa.
EPI142494	2001	Micromolienda de EV y emulgentes	Patentes de adición de EV a productos tanto hidrofílicos como lipofílicos Los EV libres o esterificados y otros esteroides se someten a una micromolienda con emulgentes en un disolvente (agua o aceite comestible) para producir una dispersión que se puede incorporar en alimentos grasos, bajos en grasa, productos no grasos y alimentos sin triglicéridos. Tales dispersiones se pueden utilizar para incorporar niveles relativamente altos de EV en productos alimenticios sin los efectos organolépticos adversos que normalmente se asocian con el uso de EV.

N° de patente	Año	Denominación	Descripción
WO/ 2009/089117	2009	Encapsulación de componentes inestables por oxidación	Material encapsulado que contiene un núcleo sensible a la oxidación cubierto por al menos una capa de fosfolípido con EV en el núcleo. Mediante el uso de la microencapsulación, se protege a los EV de la oxidación.
US 20100298261	2010	Compuestos alimentarios para reducir el colesterol	Composiciones mejoradas para la reducción de los niveles de colesterol. Son combinaciones de una o varias fibras dietéticas (preferiblemente β -glucano) y EV libres o esterificados. Se pueden utilizar como productos farmacéuticos o nutracéuticos.
US 20100112185 Y WO/2010/051148	2010	Compuesto de fitoesteroles y sal para aplicación en superficie de productos alimenticios	Al menos un tipo de EV se combinan con al menos una sal de un tamaño de partícula similar, para formar una mezcla homogénea y garantizar que ni los EV ni el componente de sal sedimentan. Dicha mezcla se aplica a la superficie de un producto alimenticio tipo aperitivo caliente (snack). Los EV pueden ser una mezcla de libres y esterificados siendo al menos el 95% EV libres.
EP 2279673	2011	Compuesto para disminuir el colesterol sérico	Combinaciones de fibra dietética y EV. Se pueden utilizar como tales, o como ingredientes en productos alimenticios. Contienen una o varias fibras, preferiblemente β -glucano, en combinación con uno o varios EV en su forma libre ó esterificada.
WO2013067603	2013	Encapsulación para ingredientes alimenticios, suplementos y fármacos	Proceso para la obtención de microencapsulados de productos lipídicos y bioactivos lipofílicos sensibles a la oxidación. Se obtiene a partir de: a) solución acuosa que contiene una o más proteínas con grupos amino libres (caseína, soja, suero de leche, gelatina, huevo, albúmina, proteínas de algas, levadura, proteínas de hongos, y las formas hidrolizadas de estas) y/ó al menos un lípido con grupos amino libres, incluyendo grasas, ceras, esteroides obtenidos de aceite vegetal, aceite de pescado, grasas animales y mezclas de los mismos; b) Uno o más hidratos de carbono con un grupo azúcar reductor (monosacárido, disacárido, trisacárido, oligosacárido, maltodextrina, maltodextrinas resistentes, almidón, derivados de almidón, jarabe de glucosa, sólidos de jarabe de glucosa y miel). Dichas proteínas y/o lípidos (a) reaccionan con los hidratos de carbono (b) de forma que al calentar la mezcla se produce la glicación sin coagulación, posteriormente se seca obteniendo un compuesto adaptado a la rehidratación y la formación de un encapsulado.

N° de patente	Año	Denominación	Descripción
Patentes de adición de EV a productos de base acuosa			
WO00052029	2000	Proceso para la preparación de un derivado de esteroles soluble en agua para la inhibición de la absorción de colesterol	Preparación de derivados de esteroles solubles en agua, para su uso en productos alimenticios y bebidas con base acuosa. Los compuestos se obtienen por reacción de: EV y anhídrido succínico o glutárico en un disolvente no polar en presencia de un catalizador básico, seguido por el acoplamiento de polímeros hidrófilos en un disolvente orgánico no polar en presencia de un catalizador básico y un agente de acoplamiento.
WO02028204	2002	Método para la dispersión de esteroides vegetales en bebidas, donde el tamaño de partícula es a escala nanométrica	Preparación de EV con tamaño de partícula en la escala nanométrica para la dispersión en bebidas. La dispersión se inicia mezclando los EV con al menos un emulgente (sacarosa ácido graso éster, sorbitán ácido graso éster y/o poliglicerina ácido graso éster) y se mezcla con la bebida acuosa que puede contener también un emulgente.
US2003003131	2003	Método para la fabricación de un compuesto sólido que contiene esteroides dispersables en agua	Procedimiento para producir un compuesto sólido que contiene esteroides dispersables en agua y lecitina como emulgente, utilizando un coadyuvante de secado para la homogenización en el secado por pulverización del producto.
US20036623780	2003	Productos de esteroles para dispersión acuosa	Preparación de esteroides dispersables en agua para su uso en suplementos dietéticos y alimentos, particularmente en bebidas.
US20046677327	2004	Composiciones de EV	Preparación de una composición comestible que contiene un EV, una proteína aislada soluble en agua y, opcionalmente, un emulgente.
EP1749520	2007	Esteroides encapsulados dispersables en agua	Producción de polvo dispersable en agua que contiene EV mediante encapsulación de los EV con almidón y un almidón modificado (éster de almidón) y, preferiblemente, un agente tensioactivo.
US20080187645	2008	Productos alimentarios bajos en energía	Producto emulsionado para la adición a alimentos de base acuosa, que contiene: 0 a 5% (p/p) de TG, 0,5 a 60% (p/p) de EV esterificados con ácidos grasos, donde del 0 a 7% (p/p) de estos AG son saturados. Opcionalmente se adicionan uno o más emulgentes.

N° de patente	Año	Denominación	Descripción
US20087335389	2008	EV para su adición a bebidas	Preparación de una dispersión estable de EV en un material acuoso, para mejorar la solubilidad de los EV en las bebidas (el tamaño de las partículas de EV oscila entre 0,1-30 µm).
EP2002726	2008	Proceso para la producción de una bebida a base de leche con esteroides vegetales	Bebida láctea con EV con una excelente estabilidad, en la que los EV permanecen emulsionados de manera estable durante el almacenamiento a largo plazo. Dicha bebida contiene EV, leche y, al menos, un emulgente seleccionado de (a) ácido monoalilglicérido y caseinato de sodio, y (b) celulosa microcristalina. Además la bebida contiene al menos un elemento de los siguientes: ésteres de ácidos grasos de sacarosa, goma de xantano, goma gelán natural y carragenano.
US20080138488	2008	Método para la preparación de polvo de esteroides vegetales y obtención de alimentos y bebidas que los contienen	Preparación de ésteres de EV en polvo. Mediante la emulsión de los ésteres de EV en una solución acuosa que contiene un almidón modificado con succinato de octenilo y una dextrina indigerible y posterior pulverización de la emulsión resultante.
WO/2009/147297	2009	Composición de pan con un mejor volumen	Composición de pan que se compone, en peso seco, de 78-98% de harina y 2 a 22% de ésteres de EV en forma de polvo, los cuales contienen de 50 a 95% de ésteres de EV y de 5 a 50% de un excipiente (preferiblemente maltodextrina y un componente que contiene proteína).
US20110081447	2011		
WO/2009/013395	2009	Método para la preparación de una bebida	Obtención de una bebida estable que contiene EV esterificados de 0,2 a 25% en peso y, al menos, un texturizante entre: puré de vegetales no homogenizado, pulpa de fruta y puré de fruta, jugo de vegetales opcionalmente no homogenizado, y/o zumo de fruta.
US20100209587	2010		
US20090004359	2009	Proceso de obtención de un ingrediente que contiene β-sitosterol	Describe tres procesos opcionales: (1) Partiendo de EV pulverizados, se mezclan con la materia prima acuosa que contiene un emulgente. (2) Se pulverizan los EV y la materia prima acuosa y, posteriormente, se mezclan. (3) Se mezclan los EV con la materia prima y después se pulverizan.

N° de patente	Año	Denominación	Descripción
WO/2009/099392	2009	Composición de EV de mayor biodisponibilidad	Método para la preparación de micropartículas porosas que contienen EV. Se prepara una masa fundida homogénea de EV y un componente parcialmente soluble en agua, que posteriormente se enfría para obtener un material sólido amorfo que es procesado a un polvo fino, y seguidamente se adiciona a una solución acuosa mediante agitación. Se obtienen micropartículas porosas que contienen EV que pueden ser utilizadas como productos farmacéuticos o alimentarios.
US20100291198	2010		
US 20090047355	2009	Proceso para la producción de formulaciones de EV pulverizado	Proceso que incluye la suspensión o dispersión de EV en una solución acuosa, que contiene un protector coloidal. Posteriormente se seca.
US 20090092727 Y	2009	Partículas de conglomerado fitoesterol-surfactante dispersables en medio acuoso	Partículas molidas en seco de conglomerado fitoesterol-surfactante que son dispersables en agua, tanto fría como caliente, compuestas por una mezcla de micropartículas secas de fitoesterol no esterificados y un surfactante binario seco. La composición incluye además, opcionalmente, uno o más ingredientes adicionales secos, tales como agentes antiaglomerantes, anti-espumantes, edulcorantes naturales y artificiales, cremas no lácteas y aromatizantes.
US20100016269	2010	Método para la producción de EV y fosfatidilcolina	Se parte de una gran cantidad de EV, completamente insolubles en agua y que presentan una escasa solubilidad en aceite, debido a su alta tendencia a cristalizar. Una composición obtenida por adición y disolución de una pequeña cantidad de fosfatidilcolina con estos EV, los hace fácilmente dispersables en agua.
WO/2010/084240	2010	Bebidas para la reducción del colesterol sérico	Desarrollo de una bebida que contiene proteínas, éster de EV, una preparación de frutas y/o vegetales, y un estabilizante.
US20110223312	2011	TG y EV encapsulados en micropartículas dispersables en bebidas	Método para la adición de EV en bebidas u otros alimentos de medio acuoso. El método incluye la mezcla de EV no esterificados como micropartículas de polvo seco, junto con TG de aceite comestible, para obtener una suspensión de dicho polvo en el aceite. La suspensión se homogeniza para desagregar posibles aglutinados, lo que permite un aumento de la proporción de las micropartículas que se recubren uniformemente con el aceite. La suspensión se mezcla y se homogeniza en la fase acuosa líquida, con al menos un emulgente, tensoactivo u otro agente que pueda estabilizar la dispersión de aceite encapsulado en micropartículas de fitoesterol en medio acuoso.

N° de patente	Año	Denominación	Descripción
WO/2011/112840	2011	Compuestos de fitoesterol soluble en agua para la reducción del colesterol	Método para preparar un derivado de fitoesterol acoplado a un vehículo soluble en agua. El método controla la estructura molecular del producto, dando lugar a derivados de fitoesterol que son solubles en agua a alta concentración.
US 20110288018	2011	Bebidas para disminuir el colesterol	Bebida que contienen proteínas, ésteres de EV, fruta y/o preparado de verduras, y estabilizante.
WO/2012/129333	2012	Composición y uso de fitoesterol rico en	Este compuesto contiene, al menos, el 50% de estigmasterol respecto al total de fitosteroles, ≤ 1000 ppm de agua, ≤ 50 ppm de etanol, y en el que estigmasterol está el 98% como mínimo en su forma anhidra. Este compuesto se utiliza para
US20130078358	2013	estigmasterol	bebidas listas para su congelado que contienen estigmasterol, agente de nucleación, agua y aditivos opcionales. Se obtiene una bebida congelada, como un granizado.
WO/2013/023826	2013	Composición alimentaria que contiene EV	Composición alimentaria que contiene una fase acuosa, una fase grasa y partículas de EV en una cantidad entre 0,1 a 20% (p/p) de los que al menos el 70% (v/v) son menores de 10 μm . La composición contiene un emulgente a base de un bpolimero hidrofílico, y una grasa estructurante en polvo. La composición aporta como mínimo 0,3 g de EV por día.
EP2578085	2013	Preparación de queso blanco suave en salmuera-maturada con agentes reductores del colesterol	Se elabora en las siguientes etapas: a) preparación de una mezcla homogénea con leche desnatada y EV. b) preparación de leche parcialmente desnatada. c) mezcla y homogenización de las preparaciones (a) y (b) para la obtención de un queso blanco suave con EV. Finalmente d) preparación de dicho queso blanco suave con EV en salmuera-maturada.

EV: esteroides vegetales; ppm: partes por millón; AG: ácidos grasos; TG: triglicéridos.

Esta recopilación se ha llevado cabo a partir del trabajo desarrollado por Kamal-Edin y Moazzami (2009) y mediante búsqueda en la plataforma de patentes internacionales “world intellectual property organization” (WIPO) pagina web de búsqueda: <http://patentscope.wipo.int/search/en/structuredSearch.jsf> (consultado en septiembre de 2014).

ANEXO II: Metodologías.

1. Obtención e identificación por GC(FID)/GC-MS de patrones de óxidos de esteroides vegetales termo-oxidados

Al no existir patrones de POPs comercializados, es necesaria su obtención e identificación con el fin de poner a punto un método de análisis de los mismos en las muestras objeto de estudio.

Se aplica el método descrito por Conchillo et al. (2005) con modificaciones. La obtención de patrones de POPs se basa en un proceso de oxidación por aplicación de calor en presencia de oxígeno (termo-oxidación). Posteriormente se purifican mediante TLC y SPE, se derivatizan a TMSE y se inyectan en el GC(FID) y GC-MS.

A. *Termo-oxidación: obtención de POPs*

Dos alícuotas de 10 mL de una disolución (1 mg/mL) de patrón β -sitosterol (60% sitosterol, 30% campesterol y trazas de estigmasterol) se introduce en placas Petri, se llevan a sequedad en corriente de N_2 y se someten a un tratamiento térmico a 150 °C, en estufa con aireación, durante 2 h. El residuo de cada termo-oxidación se redisuelve con hexano:isopropanol (Hx:Ip) (3:2, v/v) y se afora a 10 mL.

De forma similar, se realiza la termo-oxidación con disoluciones patrón de (0,8 mg/mL) campesterol (98,6%) y (1 mg/mL) estigmasterol (95%).

B. Purificación por cromatografía en capa fina

Cinco mL de cada proceso de termo-oxidación se evaporan hasta sequedad, se disuelven con 150 μ L de cloroformo y se siembran en una placa de TLC de gel de sílice junto con una mezcla de patrones de COPs (0,1 mg/mL) ($7\alpha/\beta$ -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, α/β -epoxicolesterol y colestanoetriol) como referencia para su identificación. La fase móvil utilizada es EE:hexano:etanol (70:30:3, v/v/v) y el desarrollo de la placa se da en oscuridad a 4 °C.

Tras la elución, 1/3 de la placa se pulveriza con ácido sulfúrico (80%, v/v), lo que permite una mejor visualización de las bandas y 2/3 con una disolución metanólica de 2',7'-diclorofluoresceína, para su visualización bajo luz UV (**figura n° 11**).

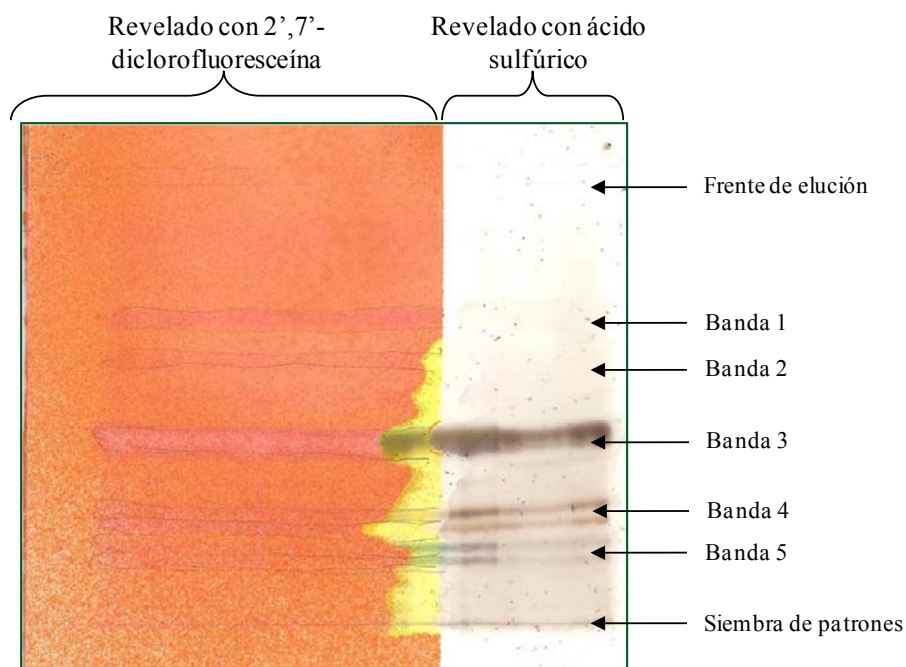


Figura n° 11: Placa de TLC de patrones termo-oxidados junto con patrones de COPs.

Las bandas de interés (**cuadro n° 11**) se raspan (de la parte pulverizada con 2',7'-diclorofluoresceína) de la placa y se extraen tres veces con 1 mL de cloroformo.

Cuadro n° 11. Bandas de la TLC de los productos de oxidación obtenidos por termo-oxidación.

Bandas	Rf	Compuestos
1	0,34-0,36	esterol no oxidado
2	0,27-0,28	α/β -epoxesteroles
3	0,23-0,24	7-cetoesteroles
4	0,18	7 β -hidroxiesteroles
5	0,14	7 α -hidroxiesteroles y trioles

TLC: cromatografía en capa fina; Rf: frente relativo.

C. Purificación por extracción en fase sólida

Un mL de cada proceso de termo-oxidación, se purifica mediante SPE (columna de sílice de 500 mg) según el método descrito por Guardiola et al. (1995). Para ello, las columnas de SPE se activan con 5 mL de hexano y, a continuación, se introducen en la columna las disoluciones de patrón termo-oxidados redissueltos en hexano:éter (95:5, v/v) procediéndose a la elución de los EV no oxidados con la mezcla de disolventes siguientes y aplicando vacío: 5 mL de hexano; 10 mL de hexano:éter (95:5, v/v); 30 mL de hexano:éter (90:10, v/v); 10 mL de hexano:éter (80:20, v/v); 10 mL de acetona.

En la fracción acetónica es donde se encuentran los POPs, se recoge en un tubo de fondo redondo de 20 mL.

D. Derivatización en compuestos trimetilsililéteres

Las disoluciones de POPs procedentes de las bandas de TLC así como las purificadas por SPE se derivatizan siguiendo los procedimientos de Sweeley et al. (1963) y Menéndez-Carreño et al. (2008a).

Los tubos cónicos para derivatizar han de estar secos (deben estar en desecador un mínimo de 24 h). Se tratan con un poco de reactivo derivatizante (piridina:HMDS:TMCS, 5:2:1, v/v/v) pasándolo por toda la pared del tubo y se seca con N₂ (para evitar la posible absorción de los analitos al tubo durante la derivatización).

Se introducen las disoluciones de POPs obtenidos, en el tubo cónico preparado como se ha indicado anteriormente junto con 5 µg/µL de PI (19-OHcol), se evapora el disolvente bajo corriente de N₂ y se adiciona el reactivo derivatizante (en exceso, unos 70 µL) con pipeta Pasteur de vidrio. Se purga 30 s con N₂ y se introduce en bloque calefactor durante 25 min a 40 °C (agitando a los 15 min). A continuación, se atempera y se evapora el resto de reactivo en corriente de N₂. Se redissuelve con 1 mL de hexano, se agita en ultrasonidos durante 3 min y se filtra a una velocidad aproximada de 1 gota/s con filtro Millex® FH para eliminar los residuos de reactivo derivatizante. Previamente, se activan estos filtros con 1 mL de hexano.

Las disoluciones derivatizadas según el apartado anterior se inyectan (1µL) en GC-MS para su identificación y GC(FID) para su cuantificación, utilizando las condiciones descritas en el **cuadro n° 12**.

Cuadro n° 12. Condiciones instrumentales para la determinación de POPs en GC(FID) y GC-MS.

	GC (FID)	GC-MS	
Modelo	Perkin-Elmer AutoSystem XL	Thermo Scientific Trace GC-Ultra	
Columna	Pre-columna en GC-MS (2m x 0,32 mm x 0,25 μ m) Varian: CP-Sil 8 bajo sangrado/MS (50 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)		
Temperatura del inyector (°C) (split)	325 (PTV) (1:10 split ratio)		
Detector	Ionización de llama (FID) T ^a 325 °C	ITQ 900 detector de masas, trampa iónica Corriente emisión -70 eV Intervalo de espectro 50-650 m/z. T ^a 250 °C	
Gas portador H₂	15 psi	0,7 mL/min	
	Δ T ^a	T ^a (°C)	(min)
Programa horno	T1	70	1
	T2	30	280
	T3	0,7	290
	T4	30	320

GC(FID): cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama; GC-MS: cromatógrafo de gases con detector de masas; PTV: sistema de vaporización con temperatura programada.

La identificación por GC-MS se realiza en base a los patrones de fragmentación y los tiempos de retención obtenidos en estudios previos (García-Llatas et al., 2008) y consultados en la bibliografía (Dutta, 1997; Dutta y Appelqvist, 1997; Soupas et al., 2004b; Zhang et al., 2005; Menendez-Carreño et al., 2008a), así como el patrón de elución de POPs en la TLC según Conchillo et al. (2005). También se procede a la optimización de un método de identificación de POPs por GC-MS/MS,

los patrones de POPs termo-oxidados y purificados por SPE se inyectan en GC-MS y se ensayan distintas energías de colisión (EC) (1,0-3,7 eV) para cada uno de los POPs seleccionando como óptima aquella que proporciona una abundancia relativa del ion precursor entre el 10 y el 20%.

En la **figura nº 12** se muestran los cromatogramas de los POP de β -sitosterol obtenidos por GC-MS y GC(FID).

A modo de ejemplo en la **figura nº 13** se pueden observar los cromatogramas de GC-MS y GC(FID) de la banda nº 3 de la TLC de los patrones termo-oxidados de β -sitosterol y el espectro de masas del 7-cetositosterol, lo que ha servido para confirmar su identificación por GC(FID).

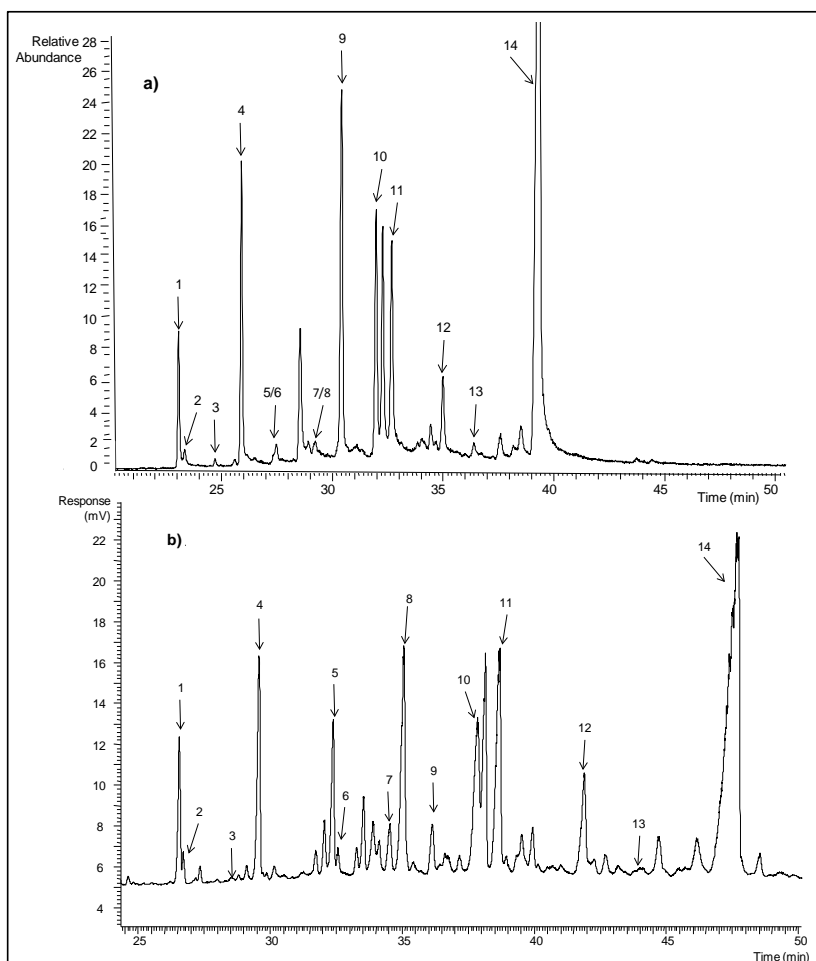


Fig. nº 12: Cromatogramas de POPs de β -sitosterol en GC-MS (a) y GC(FID) (b). 1: 19-hidroxicolesterol (PI); 2: 7 α -hidroxicampesterol; 3: 7 α -hidroxiestigmasterol; 4: 7 α -hidroxisitosterol; 5: β -sitosterol; 6: 7 β -hidroxicampesterol; 7: β -epoxicampesterol; 8: α -epoxicampesterol; 9: 7 β -hidroxisitosterol; 10: β -epoxisitosterol; 11: α -epoxisitosterol; 12: 7-cetocampesterol; 13: sitostenatriol; 14: 7-cetositosterol.

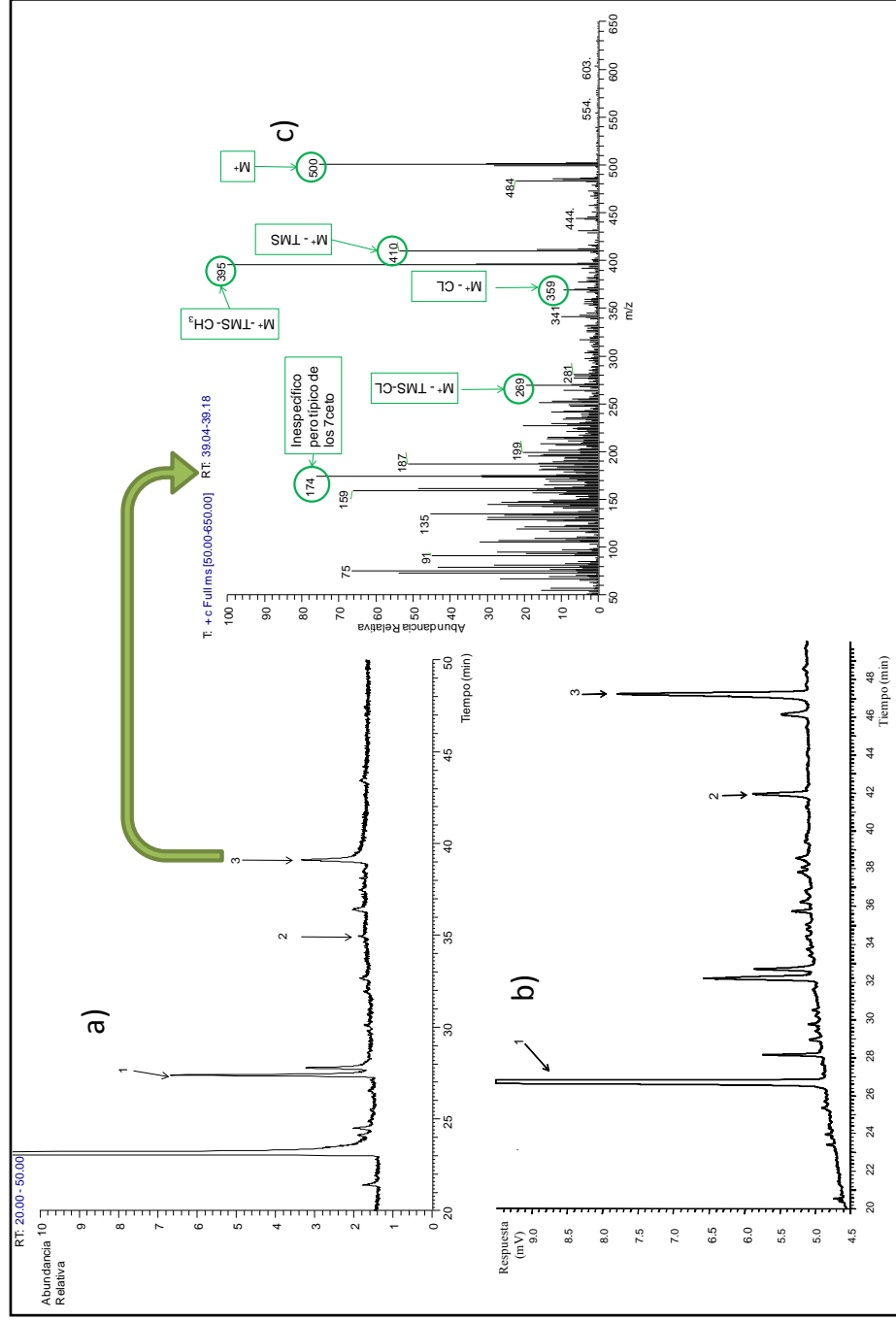


Figura n° 13. Perfil cromatográfico (a) GC-MS y (b) GC(FID) de la banda n° 3. (c) Espectro de masas de 7-cetostosterol (se indican los iones de fragmentación característicos). 1: 19-hidroxicolesterol (PI); 2: 7-cetocampesterol; 3: 7-cetostosterol; M⁺ = ión molecular; TMSO = grupo hidroxitrimetilsilil; CL = Cadena lateral.

Los tiempos de retención relativos, en GC(FID) y GC-MS de los POPs termo-oxidados, iones de fragmentación característicos (en negrita se presenta el más abundante), ion precursor, energía de colisión y sus iones producto se presentan en el **cuadro n° 13**.

Cuadro n° 13: Identificación de POPs termo-oxidados.

POPs	TRR (FID)	TRR (MS)	Iones (TIC) característicos	IP	CE	Iones producto
POPs de β-Sitosterol						
7α-hidroxi	1,12	1,12	379, 394, 484 , 485, 486	484	2,9	470, 469, 379, 233
7β-hidroxi	1,38	1,31	379, 394, 484 , 485, 486	484	2,9	470, 469, 379, 233
α-epoxi	1,45	1,42	396, 397, 412 , 473, 472, 487 , 502	396	2	381, 367, 255, 213
β-epoxi	1,42	1,39	396, 397, 412 , 473, 472, 487 , 502	396	2	381, 367, 255, 213
triol	1,64	1,57	341 , 469, 484, 559	431	2,3	343, 341, 301
7-ceto	1,77	1,70	395 , 410, 483, 500	500	3,2	483, 410, 395
POPs de Campesterol						
7α-hidroxi	1,00	1,01	470, 471 , 472, 455, 365, 233	470	2,9	456, 455, 442
7β-hidroxi	1,23	1,19	365, 455, 470 , 471, 472	470	2,9	456, 455, 442
α-epoxi	1,30	1,20	380 , 398, 470, 488			
β-epoxi	1,31	1,19	380 , 398, 470, 488			
7-ceto	1,57	1,52	381, 396, 469, 486	486	3,3	485, 471, 470, 469, 381
POPs de Estigmasterol						
7α-hidroxi	1,07	1,07	482, 483 , 484, 557, 572	482	2,9	468, 467, 439, 327
7β-hidroxi	1,30	1,26	482, 483 , 484, 557, 572	482	2,9	468, 467, 439, 327
α-epoxi	1,37	1,31	392, 410, 484, 485, 500	500	2,9	468, 467, 439, 327
β-epoxi	1,42	1,36	394, 442, 484, 485, 500	500	2,5	382, 486, 485, 482, 456, 410
7-ceto	1,62	1,56	359, 386, 408, 499	498	3	485, 471, 457, 443, 410, 395, 410

TRR: tiempo de retención relativo con respecto al patrón interno (26.5 min en GC(FID) y 23 min en GC-MS); POPs: óxidos de esteroides vegetales; FID: detector de ionización de llama; MS: detector de masas; TIC: "total ion current" en negrita se señala el ion característico; IP: ion precursor; CE: energía de colisión.

2. Determinación de esteroides vegetales y sus óxidos en ingredientes fuente de esteroides vegetales

A. Determinación de esteroides vegetales

- Saponificación en caliente (adaptación de Piironen et al., 2000b).

Proceso de hidrólisis alcalina en caliente. A un peso de muestra conteniendo 30 mg de EV se le adicionan 2 mg de epicoprostanol como PI, se lleva a sequedad bajo corriente de N₂, posteriormente, se adicionan 3 mL de KOH en metanol 1N y se dispersa la fracción grasa mediante agitación con ultrasonidos, tras purgar 30 segundos con N₂, se mantiene en baño de agua a 65 °C durante 1 hora.

- Extracción de la fracción insaponificable

Se transfiere la muestra, ya saponificada, a un embudo de decantación de 125 mL y se adicionan 5 mL de agua milliQ y 10 mL de éter etílico (EE). Se agita durante 30 segundos, mezclando bien las fases. La fase acuosa se lava otras dos veces con EE. Se reúnen las fases etéreas y se lavan dos veces con 2 mL de disolución acuosa de KOH 0,5N y, finalmente, 2-3 veces con 5 mL de NaCl al 20% hasta conseguir un pH neutro. Se transfiere el extracto etéreo a un frasco de 100 mL conteniendo Na₂SO₄ anhidro y se mantiene en refrigeración durante 2 h.

Posteriormente, se filtra recogiendo el filtrado en un matraz redondo de 250 mL. Se evapora el disolvente con flujo de N₂ y se redissuelve el residuo con Hx:Ip (4:1) pasándolo a un tubo de 10 mL que se mantiene en congelación (-20 °C) hasta su derivatización.

- Derivatización en trimetilsililéteres (Se ha descrito la metodología en el apartado 1-D).

- Identificación y cuantificación

Fitoesteroles

La identificación de los fitoesteroles se realiza mediante comparación de sus tiempos de retención relativos (TRR) en GC(FID) con los correspondientes a los distintos patrones de fitoesteroles, confirmando su identidad con los espectros obtenidos por GC-MS. En la **figura n° 14** se muestra, a modo de ejemplo, el cromatograma de los EV correspondientes al ingrediente n° 5.

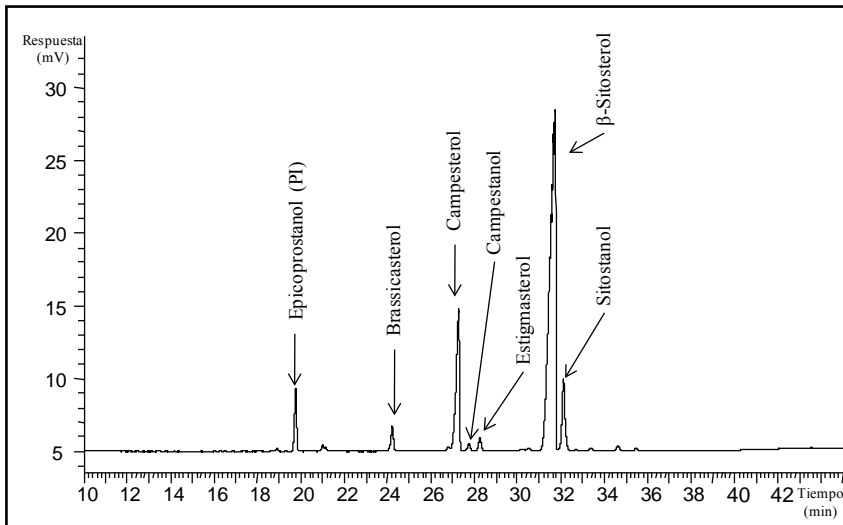


Figura n° 14: Cromatograma de EV correspondiente al ingrediente n° 5. 1: epicoprostanol (PI); 2: brassicasterol; 3: campesterol; 4: campestanol; 5: estigmasterol; 6: β -sitosterol; 7: sitostanol.

La cuantificación de los fitoesteroles se realiza mediante curvas de calibrado, con 200 μg de PI (epicoprostanol). En el **cuadro n° 14** se muestran los intervalos y las ecuaciones de regresión obtenidas.

Cuadro n° 14: Curvas de calibrado e intervalos de linealidad de brassicasterol, campesterol, estigmasterol y β -sitosterol.

Disoluciones patrón	Intervalo cantidades (μg)	Ecuación ^a
Brassicasterol	9,86 - 59,16	$y = 1,283x + 0,0027$ $r = 0,9980$
Campesterol	98 - 553	$y = 1,3134x + 0,0016$ $r = 0,9996$
Estigmasterol	9,5 - 99,75	$y = 0,9985x + 0,0067$ $r = 0,9989$
β -Sitosterol	703 - 2394	$y = 0,937x - 0,4784$ $r = 0,9924$

^a y = área analito/ área PI; x = cantidad analito (μg); r = coeficiente de correlación.

Fitoestanoles

Dado que sólo existe un patrón comercializado de fitoestanoles (estigmastanol), la identificación de los mismos se realiza por GC-MS.

A partir de los espectros obtenidos, se identifican los fitoestanoles por comparación con el respectivo fitoesterol, teniendo en cuenta que determinados fragmentos de iones obtenidos tienen, en este caso, 2 unidades de m/z más que el fitoesterol y que los fitoestanoles eluyen después de su correspondiente fitoesterol.

La cuantificación de los fitoestanoles se realiza por el método del FR obtenido con la misma cantidad de PI (epicoprostanol) (200 μg) que de estigmastanol. Se asume para todos los fitoestanoles el FR correspondiente al estigmastanol que se obtiene aplicando la siguiente expresión:

$$FR = \frac{\text{Área patrón interno}}{\text{Área patrón de estanol}} \quad \text{El FR obtenido es de 1,119.}$$

El cálculo de la cantidad de los fitoestanoles en las muestras, se realiza mediante la siguiente expresión:

$$\mu\text{g fitoestanol} = \left(\frac{\text{Área fitoestanol}}{\text{Área de patrón interno}} \right) \times \mu\text{g de patrón interno} \times \text{FR}$$

B. Determinación de óxidos de esteroides vegetales

El procedimiento es similar al descrito anteriormente para EV salvo la hidrólisis alcalina (que se realiza a temperatura ambiente) y la introducción de una etapa de purificación de la fracción insaponificable mediante SPE.

- Saponificación en frío

Se pesa la cantidad de muestra necesaria para tener alrededor de 30 mg de EV. Se añaden 10 μg de 19-hidroxicolesterol (PI), se evapora el disolvente con corriente de N_2 y se adicionan 10 mL de una disolución de KOH 1N en metanol. Se dispersa la fracción grasa utilizando agitación ultrasónica y, posteriormente, se mantienen en agitación orbital continua durante 18-20 h, en oscuridad.

- Extracción de la fracción insaponificable

La fracción insaponificable se transfiere a un embudo de decantación de 250 mL y se sigue el procedimiento descrito para los EV (apartado 2-A) con 10 mL de agua y 20 mL de EE, se repite la extracción de la fase acuosa dos veces más con 10 mL de EE. Las fases etéreas recogidas se lavan dos veces con 5 mL KOH 0,5N (acuosa) y dos veces con 8 mL de NaCl 20% hasta conseguir un pH neutro. La fase etérea así obtenida se transfiere a un frasco de 100 mL al que se le añaden dos espátulas de Na_2SO_4 anhidro y se mantiene 2 h en refrigeración. El insaponificable obtenido se filtra con papel Whatman nº 1, y el filtrado se recoge en un matraz redondo de 250 mL. Se evapora el disolvente en

corriente de N₂ y el residuo se disuelve con 10 mL de Hx:Ip (4:1, v/v). Tras dividir la muestra en dos alícuotas, se almacenan a -20 °C hasta su purificación y derivatización.

- Purificación

Una de las alícuotas del insaponificable obtenido se somete a purificación mediante SPE. Se ha descrito la metodología en el apartado 1-C.

- Derivatización en trimetilsililéteres (adaptación de Sweeley et al., 1963, Menéndez-Carreño et al., 2008a).

Para la derivatización se sigue el procedimiento descrito en el apartado 1-D. El exceso de reactivo se evapora con N₂ y los derivados TMSE se disuelven en 40 µL de hexano. Las muestras se inyectan en GC(FID) para su cuantificación y en GC-MS para su identificación utilizando las condiciones descritas en el **cuadro n° 12**.

La cuantificación de los POPs se realiza aplicando los FR obtenidos para los correspondientes COPs. La misma cantidad de patrones de COPs (7β-hidroxicolesterol, α-epoxicolesterol, colestaneetriol, 7-cetocolesterol) que del PI, 19-hidroxicolesterol (10 µg), se derivatizan y se inyectan en el GC(FID) y el GC-MS usando las condiciones cromatográficas descritas en el **cuadro n° 12**. Los FR se calculan como se ha explicado en el apartado 2-A para los fitoestanoles. En el **cuadro n° 15** se indican los FR obtenidos.

Cuadro nº 15: Factores respuesta calculados para los patrones de COPs

Patrón	FR ^a
7 β -hidroxicolesterol	1,143 \pm 0,095
α -epoxicolesterol	0,727 \pm 0,021
colestanetriol	2,583 \pm 0,180
7-cetocolesterol	1,157 \pm 0,049
7-cetoestigmasterol	1,120 \pm 0,210

FR= factor respuesta. ^aexpresado como media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

El FR obtenido del 7 β -hidroxicolesterol se emplea para el cálculo del contenido de los 7-hidroxiderivados de EV, del mismo modo el FR del α -epoxicolesterol para los epoxiderivados, el FR del colestanetriol para los derivados trioles y el FR del 7-cetocolesterol para los 7-cetoderivados.

3. Determinación de esteroides vegetales y sus óxidos en bebidas a base de zumo de frutas y/o leche enriquecidas en esteroides vegetales

El procedimiento es similar al descrito anteriormente para ingredientes salvo que requiere de una etapa previa de extracción de la fracción grasa.

- Extracción de la fracción lipídica: (Método descrito por Folch et al. (1957) modificado por Boselli et al. (2001))

A un peso de muestra, conteniendo 120 mg de EV, se le añaden 80 mL de una disolución cloroformo:metanol (1:1, v/v) (conteniendo 0,05% de BHT), se homogeniza con Polytron® durante 3 minutos a 250 W y se mantiene en estufa ($\pm 0,1$ °C) a 60 °C, durante 20 min, abriendo el tapón a los 10 min para la eliminación de sobrepresión. Después de atemperar la muestra, se añaden 40 mL de cloroformo y, tras homogenizar de nuevo con Polytron®, se filtra con embudo Büchner sobre papel de filtro Whatman n° 1, lavando el recipiente dos veces con 10 mL de cloroformo. Se trasvasa la muestra a una botella Pyrex®, se añaden 40 mL de KCl 1M y se agita vigorosamente durante 1 min. La muestra se mantiene toda la noche en refrigeración (4 °C). Posteriormente, se transfiere la muestra a un embudo de decantación y, tras la separación de las fases (10 min), se recoge la fase orgánica. Se le añade cantidad suficiente de Na₂SO₄ anhidro para eliminar el agua y se mantiene en refrigeración durante 2 h (agitando cada 30 min). La muestra se filtra (Whatman n° 2) sobre un matraz de fondo redondo y se seca, inicialmente con evaporador rotatorio a vacío y, finalmente, bajo corriente de N₂ hasta peso constante. Se mantiene 1 h en el desecador (en la oscuridad) y, por último, se pesa en balanza analítica ($\pm 0,0001$ g) la cantidad de grasa extraída.

El extracto se disuelve con 20 mL de Hx:Ip (4:1, v/v), se divide en 4 alícuotas y se guarda en congelación (-20 °C). Dos de las alícuotas se utilizarán para determinación de EV y las otras dos para determinación de POPs. El proceso, en ambos casos, es el descrito en el apartado 2 para ingredientes fuente de EV. En el caso de la determinación de EV se

utiliza 1/10 de la alícuota extraída, mientras que en el caso de determinación de POPs, se trabaja con la alícuota entera.

- Cuantificación

La cuantificación de los fitoesteroles se realiza por curva de calibrado externa, con 200 µg de PI (epicoprostanol). La cuantificación de los fitoestanoles se realiza por el método del FR, asumiendo para todos ellos el correspondiente al estigmastanol, todo ello como se describe en el apartado 2 para ingredientes fuente de EV.

La cuantificación de los POPs en las bebidas objeto de estudio, se realiza mediante el FR o curvas de calibrado externas, con 5 µg de PI (19-hidroxicolesterol) a partir de patrones de COPs conjuntos.

El perfil cromatográfico de los patrones de COPs en GC(FID) se muestra en la **figura n° 15**.

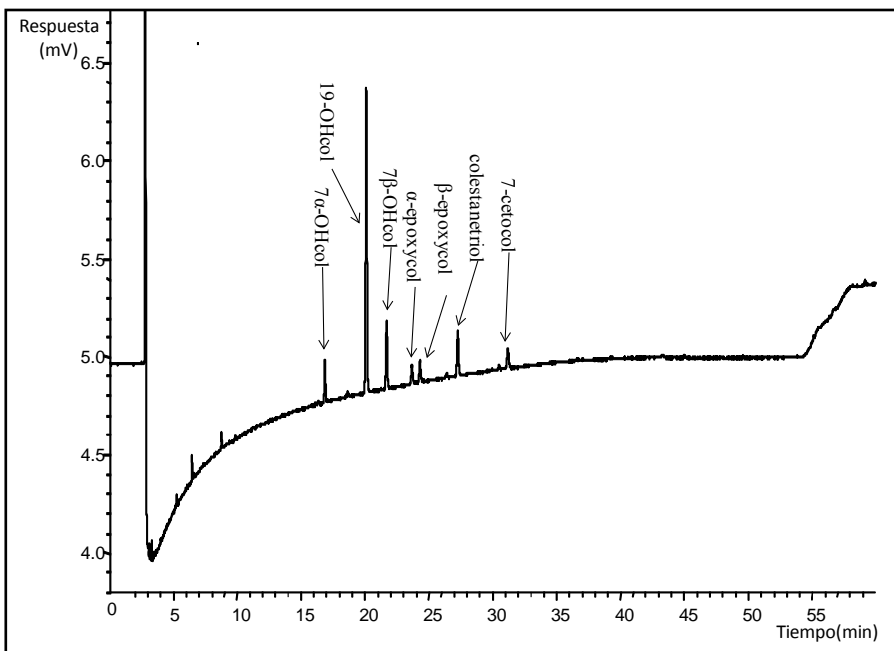


Figura n°15: Cromatograma de patrones de COPs obtenido en GC(FID).

En el **cuadro n° 16** se muestran los intervalos y las ecuaciones de regresión obtenidas para los COPs.

Cuadro n° 16. Curvas de calibrado e intervalos de linealidad de los patrones de COPs.

Patrón	Intervalo cantidades (μg)	Ecuación ^a
7 α -hidroxicolesterol	0,1006 – 0,7040	$y = 1,2688x - 0,0005$ $r = 0,9956$
7 β -hidroxicolesterol	0,2014 – 1,4098	$y = 1,1773x - 0,0007$ $r = 0,9958$
α -epoxicolesterol	0,0992 - 0,6944	$y = 0,9219x - 0,0027$ $r = 0,9972$
β - epoxicolesterol	0,1020 - 0,7134	$y = 0,7082x + 0,0016$ $r = 0,9990$
colestanetriol	0,0999 – 0,6997	$y = 1,9882x - 0,0073$ $r = 0,9895$
7-cetocolesterol	0,1008 – 0,7056	$y = 1,048x - 0,0037$ $r = 0,9968$

^a y = área COP/área PI; x = cantidad COP (μg), r = coeficiente de correlación.

En la **figura n° 16** se presenta un esquema general de la determinación de EV y sus óxidos en las muestras objeto de estudio, en el caso de los ingredientes se omite la etapa de extracción grasa.

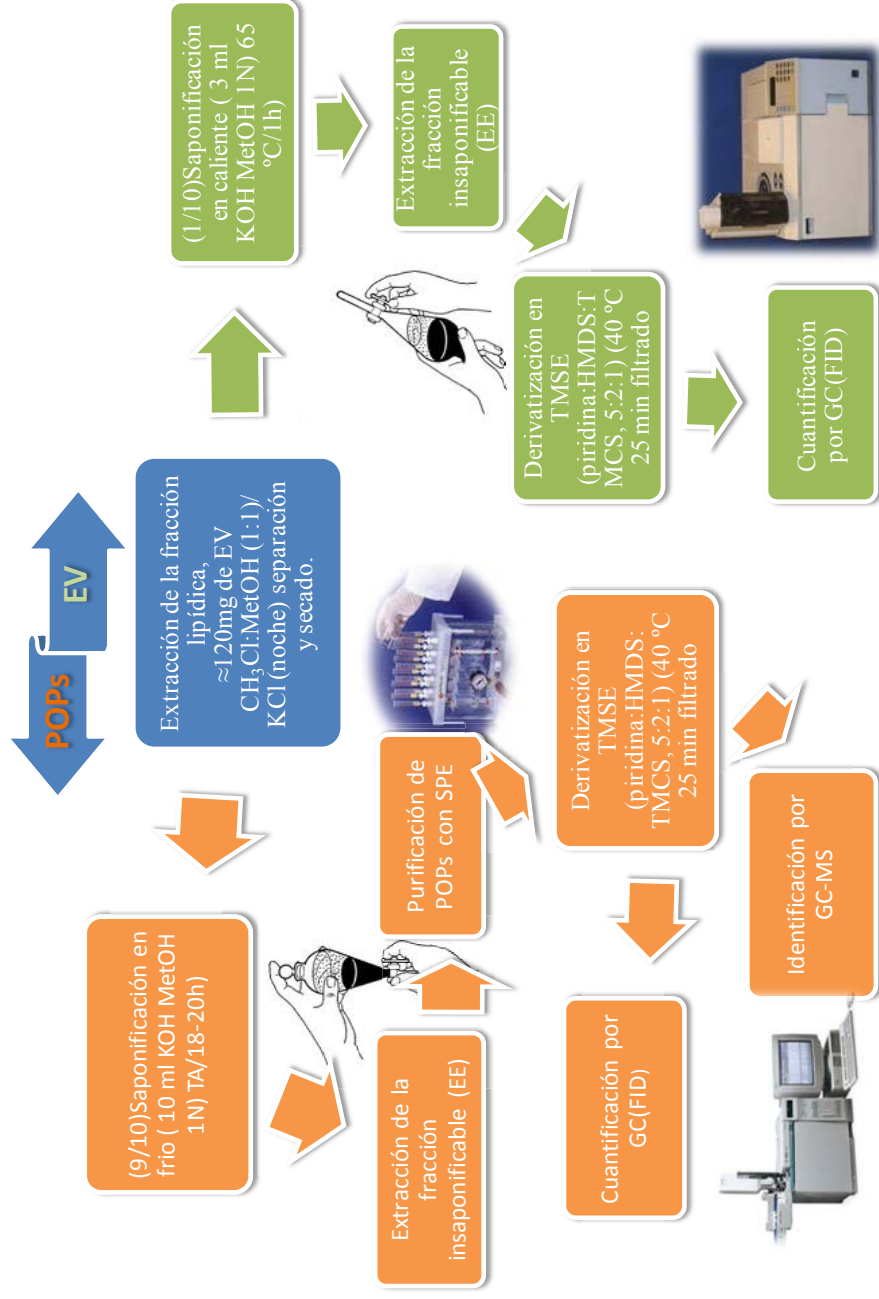


Figura n° 16. Esquema general de la determinación de EV y POPs. EE: dietiléter; MetOH: Metanol; SPE: Extracción en fase sólida; TA: Temperatura ambiente; TMCS: trimetilclorosilano; HMDs: hexametildisilazano; GC-MS: cromatógrafo de gases masas; GC(FID): cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama.



**DIFUSIÓN DE
RESULTADOS**

Stability of Plant Sterols in Ingredients Used in Functional Foods

Marina González-Larena,[†] Guadalupe García-Llatas,[†] M. Carmen Vidal,[†] Luis Manuel Sánchez-Siles,[‡] Reyes Barberá,[†] and María Jesús Lagarda^{*,†}

[†]Nutrition and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain

[‡]Research & Development Department, Hero Institute for Nutrition, (Alcantarilla) Murcia, Spain

ABSTRACT: The content of plant sterol (PS) and their oxidation products (POPs) in eight ingredients used to enrich functional foods was studied. A gas chromatographic (GC) technique with mass-spectrometric detection was used for identification, while GC with a flame ionization detector (GC-FID) was used for quantification. β -Sitosterol was the most abundant phytosterol, and the main POPs found were derived from this compound (7 α / β -hydroxysitosterol, 7-ketositosterol, and sitostanetriol). The total amount of POPs found in the ingredients ranged from 29.03 to 110.02 μ g/100 g PS. The β -sitosterol oxidation rates ranged from 10 to 50 μ g β -sitosterol oxides/100 g of β -sitosterol. In view of this low rate of oxidation in the ingredients tested, it can be concluded that the PS remain stable in these ingredients. Significant correlations ($p < 0.01$) were found between total oxysterols versus β -sitosterol contents ($R^2 = 86.5\%$) and between total POPs and total PS ($R^2 = 81.6\%$).

KEYWORDS: Plant sterol oxidation products, POPs, phytosterol stability, gas chromatography–mass spectrometry, functional ingredients

INTRODUCTION

Plant sterols (PS: phytosterols/-stanols) are natural constituents of plants and have many essential functions in plant cells, in a way similar to cholesterol (cholest-5-en-3 β -ol) in animal cells. Structurally, they are very similar to cholesterol but have a much lower intestinal absorption rate in humans. PS consumption (2 g/day) results in an approximately 9% reduction in LDL-cholesterol. PS also have beneficial effects upon other lipid parameters.¹ In the European Union, the use of PS and their esters in different food matrices is regulated by different Commission Decisions.^{2,3} Recently, the European Commission authorized as a health claim that "plant sterols and plant stanol esters have been shown to lower/reduce blood cholesterol. High cholesterol is a risk factor in the development of coronary heart disease."⁴

A variety of commercial foods have been enriched with free or esterified PS, spreads being the first (and still the most common) commercial application of PS-enriched food.

Like all unsaturated lipids, PS are liable to oxidation, giving rise to plant sterol oxidation products (POPs). To date, data on the biological effects of POPs are still scarce and sometimes contradictory. In some studies, no deleterious biological effects have been observed, with no reported POP genotoxicity. In other cases, however, POPs have been suggested to have cytotoxic effects, these being less severe than in the case of cholesterol oxidation products (COPs).⁵

The major sources of PS for current functional foods and dietary supplements are tall oil and vegetable oil deodorizer distillate. Tall oil is a byproduct of the Kraft pulping of wood to make paper and contains a mixture of PS. The latter is extracted from tall oil soap, a residue from the paper pulping process, or from tall oil pitch. Vegetable oil processing involves refining, one of the stages of which is deodorization. The lower molecular weight compounds are eliminated in the deodorizer distillate by-product fraction. Free sterols are a major component (15–30%) of the contents of the deodorizer distillate fraction.⁶

Obtainment of the deodorizer distillate by conventional or physical refining involves high temperatures (180–220 and 240–250 °C, respectively),⁷ and separation of the sterol fraction from the distillate involves different processes that can reach temperatures ranging from 150 to 240 °C.⁸ Both conditions are favorable for POPs formation.⁹ POPs have been quantified in by-product fractions from chemical refining and by-product distillate fractions from physical refining of edible fats and oils (limit of quantification 0.01 mg/100 g), for their use in animal feed formulations.¹⁰ However, industrial processing (chemical refining and deodorization) caused no increase in POPs of β -sitosterol ((24R)-ethylcholest-5-en-3 β -ol) in soybean oil at a detection level of 0.2 ppm,¹¹ and no POPs (from β -sitosterol and campesterol [(24R)-methylcholest-5-en-3 β -ol]) were detected in rapeseed oil at a detection level of 1 μ g/g oil.¹²

Contents of POPs in different crude and refined vegetable oils have been reported.^{9,13–17} Once the PS are extracted, they are processed to be later incorporated into different food matrices. Therefore, PS storage, processing, and storage once PS are incorporated in different food matrices are stages susceptible for POPs formation. For this reason, PS ingredients manufacturers usually use a wide variety of delivery systems for the protection of the PS from degradation during processing and storage.¹⁸ Emulsion-based technologies and spray drying are currently the most common approaches employed for microencapsulation and delivery of functional lipophilic components into food.¹⁹

To our knowledge, only one study has been published on the evaluation of the oxidation of PS in different vegetable oils added as microcrystalline PS suspensions prepared from wood-based fractions.¹⁶

Received: November 16, 2010

Accepted: February 22, 2011

Revised: February 4, 2011

Published: March 11, 2011



Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources

Laia Alemany-Costa ^{a,1}, Marina González-Larena ^{a,1}, Guadalupe García-Llatas ^{a,*}, Amparo Alegría ^a, Reyes Barberá ^a, Luis Manuel Sánchez-Siles ^b, María Jesús Lagarda ^a

^a Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Burjassot, Spain

^b Research and Development Department, Hero Institute for Nutrition, Alcantarilla, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history

Received 5 March 2012

Accepted 2 May 2012

Keywords

Plant sterols

Phytosterol oxidation products

Gas chromatography

Phytosterol stability

Sterol oxidation

Functional foods

ABSTRACT

Two different plant sterol (PS) sources (free PS from tall oil and esterified PS from vegetable oils) were used for manufacturing two types of functional beverages (fruit and milk-based fruit beverages), and their PS and phytosterol oxidation product (POP) contents were determined. Gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC–MS/MS) was used for identification and gas chromatography–flame ionization detection (GC–FID) for quantitation purposes. Brassicasterol, campesterol, campestanol, stigmasterol, β -sitosterol and sitostanol were the quantified PS, conforming a profile in order with current legislation. The relative percentages of PS differed according to the enrichment source involved, though the enrichment levels (g/100 g beverage) were of the same order (1.77 from tall oil and 1.84 from vegetable oils). Only POPs from β -sitosterol (the prevalent PS in the analyzed beverages) were detected – the predominant representative being 7 β -hydroxysitosterol (39–58.5% of total POP content). The following POPs were quantified: 7 α -hydroxy, β -epoxy, α -epoxy, and 7-ketositosterol, yielding a total POP content ranging between 42.9 and 57.4 mg/100 g of PS. No statistically significant differences ($p > 0.05$) in total and individual POP content according to the source of PS were found. The mean β -sitosterol oxidation percentage was $< 0.07\%$, which reflected a low PS oxidation extent, though manufacture was on a laboratory scale regardless of the PS source used in enrichment of the functional beverages. These functional drinks therefore can be regarded as healthy food products and as an adequate PS vehicle as well.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Consumption of foods enriched with plant sterols (PS) (including phytosterols and phytostanols) may help reduce low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels. PS consumption (2 g/day) results in a cholesterol reduction of approximately 9%, exerts beneficial effects upon other lipid variables and, in addition, PS have been described

as anti-inflammatory and anti-cancer compounds (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011; Hernández-Mijares et al., 2010; Marangoni & Poli, 2010).

Plant sterols intake with the diet ranges from 150 to 440 mg/day, and can reach 1 g/day in vegans (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). Since the diet alone is unable to offer the effective intake required to deliver the health benefits of PS, a large variety of commercial foods have been enriched with free or esterified PS, including spreads, which were the first commercial applications of PS-enriched foods. Since the approval of spreads in the European Union (EU), several more approvals have been issued for the addition of phytosterol to other food categories such as milk-based fruit beverages (European Food Safety Authority (EFSA), 2008). This kind of enrichment is a convenient and alternative way for consumers to obtain the daily recommended amount of PS for subjects with moderate hypercholesterolemia. In effect, these products can be regarded as healthy staple foods, since skimmed milk can be used for their formulation – thereby replacing milk fat with unsaturated fatty acids used in PS esterification. Furthermore, fruit juices can provide vitamins and antioxidants as well (Normen & Frohlich, 2004).

The main sources of PS for current functional foods and dietary supplements are tall oil, a by-product of the wood pulp industry, and vegetable oil deodorizer distillate. Tall oil contains a mixture of

Abbreviations: BHT, butylhydroxytoluene; COPs, cholesterol oxidation products; EU, European Union; Fb, fruit beverages; GC–HD, gas chromatography–flame ionization detection; GC–MS/MS, gas chromatography–tandem mass spectrometry; HMDS, hexamethyldisilazane; IS, internal standard; KCl, potassium chloride; KOH, potassium hydroxide; LDL, low-density lipoprotein; MFB, milk-based fruit beverages; POPs, phytosterol oxidation products; PS, plant sterols; RF, response factor; SPE, solid-phase extraction; TMS, trimethylchlorosilane; TMSI, trimethylsilyl ether.

* Corresponding author at: Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. Tel.: +34 963544907; fax: +34 963544954.

E-mail addresses: laia.alemany@uv.es (L. Alemany-Costa), marina.gonzalez@uv.es (M. González-Larena), guadalupe.garcia@uv.es (G. García-Llatas), amparo.alegría@uv.es (A. Alegría), reyes.barbera@uv.es (R. Barberá), luisma.sanchez@heroes (L.M. Sánchez-Siles), m.j.lagarda@uv.es (M.J. Lagarda).

¹ Both authors have contributed equally to the study, and thus may be regarded as first author.

Plant Sterols and Antioxidant Parameters in Enriched Beverages: Storage Stability

Marina González-Larena, Antonio Cilla, Guadalupe García-Llatas, Reyes Barberá, and María Jesús Lagarda*

Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

ABSTRACT: Plant sterols (PS) stability, antioxidant parameters, and color were studied during 6 months of storage at 4, 24, and 37 °C in three PS-enriched functional beverages. Beverages were skimmed milk with fruit juice and PS (MFJPS), fruit juice and PS (FJPS), and skimmed milk with PS (MPS). No loss in total PS content occurred during storage observing the same values at any given storage time point. Total carotenoids decreased 36% with storage at two months and then remained stable. Total polyphenols showed fluctuations throughout the storage, remaining stable at 6 months and reaching initial values. The antioxidant capacity (TEAC method) increased 18% at 6 months, and there was an increase in color over time and temperature, probably due to Maillard reaction compound formation. The increase in total antioxidant capacity might have helped PS maintenance throughout storage, these beverages being a good PS source even after 6 months of storage.

KEYWORDS: sterol-enriched beverage, functional foods, phytosterols, antioxidants, storage stability

■ INTRODUCTION

Plant sterols (PS) are currently used as functional food ingredients due to their protective effects, especially β -sitosterol, against colon, prostate and breast cancer, and their well-known total and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol lowering activity.¹ Indeed, controlled clinical trials have demonstrated that PS consumption (2 g/d) results in a cholesterol reduction of approximately 10%.²

The first (and still the most common) PS-enriched commercial formulations were high fat food products.¹ However, the enrichment of spreads or high-fat foodstuffs with PS is contrary to dietary recommendations aimed at decreasing the risk of cardiovascular diseases. Hence, low-fat and nonfat alternatives need to be developed. In this sense, there are some examples of low-fat drinking foodstuffs enriched with PS, such as nonfat or low-fat milks and yogurts^{3–7} and different beverages^{8–10} including PS fortified orange juice-based beverages.^{11,12}

Prevention of lipid oxidation during processing and storage is essential to maintain the quality and safety of PS-enriched foods since PS are susceptible to oxidation like all unsaturated lipids, and a decrease in initial PS content could occur as a result. The oxidative process of the lipid fraction in foods during long-term storage can be influenced by the packaging materials, storage temperature, oxygen availability, exposure to light, as well as by the antioxidant and pro-oxidant contents. In this context, one way of improving the oxidative stability of PS enrichment in a food would be their inclusion in a matrix with natural antioxidant compounds. In this sense, fruit–skimmed milk beverages, where PS enrichment is allowed,¹³ appear as a suitable way to fulfill this requirement because they are appropriate for complying with health recommendations (restrictions of simple carbohydrates and saturated fatty acids (milk fat) and consumption of unsaturated fatty acids (used in the formation of PS esters)) and are good sources of other

bioactive compounds such as polyphenols and vitamins, which also possess antioxidant activity.¹⁴

Although the PS profiles of several dairy products and juice beverages have been reported in the literature,^{7,15,16} there are few studies regarding PS stability during storage in enriched beverages. Evaluations have been made of phytosterol-enriched whole milk powder stored at room temperature and at 38 °C for 12 months, milk enriched with free and esterified phytosterols and phytostanyl esters stored in the dark at room temperature and at 4 °C for 6 months,⁵ and phytosterol-enriched milk subjected to Schaal oven conditions (24 h/65 °C, equivalent to one month of storage at room temperature).⁶ However, as far as we are aware, no studies have evaluated PS stability in fruit–milk beverages, though it would be of special interest to check whether PS content is maintained stable during product shelf life to safeguard its potential bioactive properties. In addition, the relationship between PS stability and antioxidant parameters during storage is a relevant aspect that has not been addressed in food matrices in literature so far. Besides, the stability of antioxidant parameters may be affected by processing and storage conditions (time and temperature) during the product shelf life.

The aim of the present study was to determine the effect of storage at 4, 24, and 37 °C during 6 months on PS stability (phytosterols/-stanols content) in three PS-enriched beverages. Furthermore, the evolution of antioxidant parameters (total carotenoids, total polyphenols, and total antioxidant capacity) and color measurements were determined complementarily to ascertain their protective role on PS stability in these functional beverages. These results will improve the knowledge on PS

Received: January 20, 2012

Revised: April 17, 2012

Accepted: April 18, 2012

Published: April 18, 2012

- González-Larena, M., Garcia-Llatas, G., Clemente, G., Barberá, R., Lagarda, M.J. Plant sterol oxides in functional beverages: influence of matrix and storage. *Enrevisión Food Chemistry*.

PRESENTACIONES A CONGRESOS:

- **González-Larena M.**, Higeras Contreras L, Bañuls C, Lagarda MJ: “Caracterización de fracción lipídica de bebidas lácteas enriquecidas con fitoesteroles”
Poster presentado en el V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Murcia, España (26-29 mayo 2009).
- **González-Larena M.**, Vidal MC, García-Llatas G, Barberá R, Lagarda MJ, Sánchez-Siles LM.: “Caracterización de esteroles vegetales de materias primas para alimentos funcionales”
Comunicación oral presentada en el XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición (SEN). Sitges, España (11-13 junio 2009).
- **González-Larena M.**, García-Llatas G, Lagarda MJ, Vidal MC, Barberá R. “Phytosterols Oxides in ingredients for functional foods”
Poster presentado en el 7th Euro Fed Lipid Congress, Lipids, Fats and Oils: From knowledge to application. Graz, Austria (18-21 octubre 2009).

- Alemany-Costa L., **González-Larena M.**, García-Llatas G., Alegría A., Barberá R., Lagarda M.J. “Gas chromatographic determination of phytosterols and their oxidation products in enriched fruit beverages”
Poster presentado en el 28th International Symposium on Chromatography. Valencia, España (12-16 septiembre 2010).
- **M. González-Larena**, A. Cilla, G. García-Llatas*, R. Barberá, A., Alegría, M.J. Lagarda “Effect of storage on plant sterol contents and antioxidant parameters in functional beverages”
Poster presentado en el 2010 EFFoST annual meeting. Food and Health. Dublín, Irlanda. (10-12 Noviembre 2010).
- **M. González-Larena**, A. Cilla, G. García-Llatas, R. Barberá, M.J. Lagarda* “Ingredientes funcionales (esteroles vegetales) en bebidas: estabilidad durante el almacenamiento”
Poster presentado en el VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Valencia, España (8-10 junio 2011).
- **González-Larena M.**, García-Llatas G, Sánchez-Siles LM, Clemente, G, Barberá R, Lagarda MJ “Phytosterols oxides in functional beverages: matrix and storage influence”
Poster presentado en el 20th International Congress of Nutrition. Granada, España (15-20 septiembre 2013).

Otros

Difusión de resultados en medios de comunicación digitales. Resultados del estudio “Stability of plant sterol in ingredients used in functional foods” en

<http://www.nutraingredients.com/Research/Phytosterols-stable-in-functional-foods>.

Y resultados del estudio “Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources” en <http://www.nutraingredients.com/Research/Study-shows-plant-sterols-don-t-go-POP-in-fruit-beverages>

(Ambas paginas consultadas en septiembre de 2014).

