



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



Instituto de la Grasa

Lab. Plantas Pilotos
Dept. Caracterización y
Calidad

ACEITE DE ORUJO DE OLIVA REFINADO. NUEVA MATERIA PRIMA PARA FORMULACIONES DERMATOLÓGICAS

Tesis Doctoral realizada por:

Carla Andrea Sánchez Gutiérrez

Sevilla, 2017



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



Instituto de la Grasa

Lab. Plantas Pilotos
Dept. Caracterización y
Calidad

Memoria presentada por Doña Carla Andrea Sánchez Gutiérrez
para optar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de
Sevilla.

Fdo.: Carla Andrea Sánchez Gutiérrez

Vº Bº Las directoras de la Tesis Doctoral

Fdo.: Prof. Dra. M^a Jesús Lucero Muñoz
Prof. Titular
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla

Fdo.: Dra. M^a Victoria Ruiz Méndez
Científica Titular
Instituto de la Grasa. CSIC



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



Instituto de la Grasa

Lab. Plantas Pilotos
Dept. Caracterización y
Calidad

MARIA JESÚS LUCERO MUÑOZ, Profesora Titular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, y **MARÍA VICTORIA RUIZ MÉNDEZ**, Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Sevilla

CERTIFICAN:

Que la memoria para optar al grado de Doctor, realizada por la Licenciada Dña. Carla Andrea Sánchez Gutiérrez, cuyo título es **“Aceite de orujo de oliva refinado. Nueva materia prima para formulaciones dermatológicas”**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y, reúne los requisitos necesarios para su defensa y calificación.

Para que conste firmamos el presente en Sevilla, a marzo de dos mil diecisiete.

M^a Jesús Lucero Muñoz

M^a Victoria Ruiz Méndez



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



D^a María Luisa González Rodríguez, Profesora Titular de Universidad y Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral elaborada por la Licenciada en Farmacia D^a Carla Andrea Sánchez Gutiérrez, ha sido dirigida por la Dra. María Jesús Lucero Muñoz y la Dra. María Victoria Ruiz Méndez, habiéndose realizado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, cumpliendo todas las normas vigentes.

Para que conste, y a petición de la interesada, firmo el presente en Sevilla, a marzo de dos mil diecisiete.

D^a María Luisa González Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer de todo corazón por el desarrollo de esta Tesis Doctoral

A mis directoras de Tesis la Dra. M^a Jesús Lucero Muñoz y la Dra. M^a Victoria Ruiz Méndez por haber confiado en mi, sus consejos y sobre todo, porque con ellas he crecido no solo profesionalmente sino también como persona, aportándome cada una de ellas unos valores, con los cuales he aprendido a afrontar los obstáculos de la vida y confiar en que puedo conseguir todos mis objetivos.

A la Dra. M^a Rosa Jiménez-Castellanos Ballesteros por haberse involucrado en esta Tesis, por su ayuda durante toda esta etapa, por escucharme, aconsejarme y darme fuerzas para afrontar los duros momentos.

A mis compañeros de laboratorio tanto del Instituto de la Grasa (CSIC) en especial a Irene, Pablo y Arturo como del departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, en especial a Paloma y César, por escucharme, apoyarme y compartir risas y alegrías.

A las empresas Oleícola El Tejar SCA, Gattefossé, Evonic Industries, Industrial Química y Clariant International por facilitarme las muestras e ingredientes necesarios para el desarrollo de las fórmulas de esta Tesis.

A mis padres, por su apoyo incondicional en todo momento, por escucharme y aconsejarme durante los momentos mas difíciles y alegrarse como nadie con los mas dulces. Porque me han enseñado todos los valores realmente importantes de la vida y me han demostrado cada día que juntos somos mas fuertes.

Por ultimo a Juan, mi compañero de viaje, quien me alegra todos los días y me hace confiar en mi misma para afrontar todos los obstáculos que se presenten. Porque sabe sacar lo mejor de mi y soy la mejor versión de mi misma cuando estoy con él.

Gracias a todos.

ÍNDICE

Agradecimientos	ix
Índice	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS	29
CAPÍTULO I	35
<i>I.1. INTRODUCCIÓN</i>	37
<i>I.2. OBJETIVO</i>	39
<i>I.3. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	39
I.3.1. Materiales	39
I.3.2. Métodos	40
<i>I.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	42
I.4.1. Características químicas de los aceite de orujo de oliva	42
I.4.2. Caracterizaciones reológica y de textura de los aceites de orujo de oliva	45
<i>I.5. CONCLUSIONES</i>	50
<i>I.6. REFERENCIAS</i>	51
CAPÍTULO II	55
<i>II.1. INTRODUCCIÓN</i>	57
<i>II.2. OBJETIVO</i>	59
<i>II.3. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	60
II.3.1. Materiales	60
II.3.2. Métodos	61
<i>II.4. RESULTADOS y DISCUSIÓN</i>	69
II.4.1. Caracterización química de OPOCs y OPODs obtenidos por los procesos de refinado químico y físico.	69
II.4.2. Caracterización reológica	76
II.4.3. Análisis de los perfiles de textura (TPA)	83
<i>II.5. CONCLUSIONES</i>	85
<i>II.6. REFERENCIAS</i>	87
CAPÍTULO III	91
CAPÍTULO IV	93
CONCLUSIÓN FINAL	95
ANEXO	99

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

El olivo y sus componentes

Los orígenes del olivo se remontan muy atrás en la historia. Así se considera un árbol milenario cuyo cultivo se extendió ampliamente por toda la zona mediterránea, abarcando Europa, África y Asia Menor, adquiriendo gran importancia para los pueblos fenicio, romano y árabe. La expansión de su cultivo a América se produjo en el siglo XVI gracias a los colonizadores españoles.

La aceituna, fruto del olivo, se utilizó inicialmente para la extracción de aceite, sin embargo, existen referencias que datan del siglo I en las que ya se cita su consumo directo. Ha sido un alimento importante dentro de la dieta mediterránea. De hecho, fue un componente básico en el sustento diario de los jornaleros de los campos andaluz y extremeño durante los siglos XIX y XX.

La preparación a escala industrial de las primeras aceitunas de mesa en España, "verdes al estilo español o sevillano" comenzó a finales del siglo XIX en la provincia de Sevilla, en las localidades de Dos Hermanas, Alcalá de Guadaíra, Morón de la Frontera y el Arahál, entre otras (Asociación Española de Exportaciones e Industriales de Aceitunas de MESA, ASEMESSA).

Según el Consejo Oleícola Internacional, España es el primer país productor de aceitunas de mesa del mundo (1.311.300 toneladas en la cosecha 2016-2017 aproximadamente), seguido a mucha distancia de otros países como Grecia (260.000 toneladas), Italia (243.000 toneladas), Turquía (177.000 toneladas), Marruecos

INTRODUCCIÓN GENERAL

(110.000 toneladas) o Túnez (100.000 toneladas). La producción media mundial desde la campaña de 2010 asciende a 2.708.900 toneladas, de las cuales 1.275.100 se produjeron en España, es decir, el 62,2% del total.

En la campaña 2016-2017 la producción nacional de aceituna de mesa fue de 745.040 toneladas (Agencia de Información y Control Alimentarios, AICA), alcanzando en Andalucía un total de 590.595,15 toneladas, lo que supone el 79% de la producción nacional. En este sentido, Sevilla con 451.700 toneladas, seguida de Córdoba con 82.660 y Málaga con 49.939, fueron las provincias con mayor producción.

En la actualidad, de todos los procesos del olivar y del aceite, el único residuo que no se aprovecha es la aceituna no recogida. El resto de subproductos (hojín, alperujo, alpechín, hueso y orujos) se reutiliza para algún fin.

El **hojín**, restos de hojas y ramas finas, se genera como resultado de la limpieza de la aceituna antes de su procesado. Se ha utilizado tradicionalmente para alimentación animal y, más recientemente, para producir “compost” (abono natural para la tierra) junto con otros residuos orgánicos. Sin embargo, en una buena parte de los casos constituye un residuo del que su productor se tiene que deshacer. Actualmente, se está promoviendo su uso en plantas de generación eléctrica a partir de biomasa, si bien su contenido en humedad, en torno al 40% supone

un inconveniente para su uso energético. Su poder calorífico se encuentra en torno a 4.378 kcal/kg de materia seca (Comas, 2012).

Las **hojas de olivo** se consideran como una materia prima barata. Históricamente, se han utilizado como un remedio popular para combatir enfermedades, como la malaria (Khalil y col., 2014). Más recientemente, García y col. (2000) demostraron que el extracto de hoja de olivo tiene la capacidad de bajar la presión arterial en animales y aumentar el flujo sanguíneo en las arterias coronarias, aliviar la arritmia y prevenir espasmos musculares intestinales. Micol y col. (2005) señalan la actividad antiviral del extracto obtenido de las hojas del olivo, Bouaziz y col. (2008) evidencian sus efectos antioxidantes y Furneri y col. (2002) su actividad antimicrobiana.

El **alperujo** es un subproducto de las almazaras que se genera durante la extracción de aceite de oliva por el sistema de dos fases. Se define como todo aquello que resta de la aceituna molturada si se elimina el aceite de oliva (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural Marino). Presenta una parte sólida, el orujo, y otra líquida, el alpechín, las cuales pueden ser separadas para su aprovechamiento o bien se pueden utilizar directamente (Nunes y col., 2016). En el caso del aprovechamiento del alperujo, este puede ser empleado en alimentación animal. Otras alternativas, a la solución del problema que plantea el alperujo, son su uso en técnicas de cogeneración energética o como fertilizante de suelos

agrícolas tras su conversión en “compost”. La normativa a la que está sujeta la producción de alperujo es tanto comunitaria como nacional (Reglamento 834/07 y el 889/08; Real Decreto 824/2005, de 8 de julio; Orden, de 20 de julio de 2007). Otro aprovechamiento interesante del alperujo es la producción de bioplásticos (Cerrone, 2011). Así, por ejemplo, los polihidroxi-alcanoatos (PHAs) se usan como material para fabricar envases de productos farmacéuticos, para la obtención de microcápsulas o nanocápsulas, o por su utilidad en ingeniería tisular (Ramos Comerzana y Monteoliva Sanchez, 2000).

El **alpechín** se caracteriza por ser un líquido acuoso, maloliente, poco biodegradable y muy contaminante, tanto por su elevada carga orgánica como por su contenido graso. Está compuesto por el agua de constitución de la aceituna, el agua adicionada de lavado y un porcentaje variable de sólido. Actualmente y tras su depuración se le está dando utilidad como fuente de calor y electricidad (Comisión Europea, CORDIS), como fertilizante (Pozzi y col., 2010). También puede emplearse para obtener levaduras y como componente en la elaboración de biocombustibles (Grupo Prof. Jiménez-Sanchidrián).

El **hueso** generado en los procesos de obtención de aceite de oliva es un combustible muy adecuado para usos térmicos, debido a su reducida humedad y elevado poder calorífico. Por otra parte, Fernández-Bolaños y col. (1990) lo proponen como fuente de

material lignocelulósico. El hueso, como subproducto del proceso de elaboración del aceite de oliva, también puede destinarse a usos cosméticos, al poder ser empleado en la elaboración de productos exfoliantes destinados a la regeneración celular de la piel por eliminación de las capas superficiales compuestas por células muertas. También se ha propuesto su uso para eliminar el hierro del agua usando filtros de hueso de aceituna (Alami, 2010).

El **orujo** es el residuo sólido obtenido durante el proceso de extracción mecánica del aceite de oliva virgen extra (EVOO, se corresponde con la denominación en inglés). Esta constituido principalmente del residuo sólido de la pulpa, la piel y el hueso, semilla de las aceitunas, el aceite retenido en dichos residuos sólidos y agua (Alba Mendoza, 1995; Sánchez-Moral y Ruiz-Méndez, 2006).

Rodrigues y col. (2015), realizaron una excelente revisión del aprovechamiento de estos subproductos para la obtención de compuestos bioactivos de interés en el cuidado de la piel y cosméticos.

Con respecto al aceite, actualmente hay dos tipos de **aceites de orujo de oliva (OPOC)** en el mercado, dependiendo del procedimiento utilizado en su extracción, es decir, centrifugación o extracción (Sánchez-Moral y Ruiz-Méndez, 2006).

Los procedimientos de extracción pueden ser químicos y mecánicos. El proceso tradicional de extracción del OPOC es

INTRODUCCIÓN GENERAL

utilizando hexano, un hidrocarburo ligero derivado del petróleo, inmisible con agua. Sin embargo, si los OPOCs se extraen siguiendo el método tradicional tiene dos inconvenientes importantes. El primero, que los aceites extraídos tienen una mayor cantidad de fosfolípidos, ceras y una gran cantidad de compuestos anómalos, tales como jabones y esteroides. En segundo lugar, es necesario realizar un secado posterior del orujo a muy altas temperaturas, por lo que, debido a estas condiciones drásticas, los OPOCs obtenidos contienen altas cantidades de hidrocarburos aromáticos policíclicos no usuales (León-Camacho y col., 2003).

Con objeto de prevenir y/o reducir la presencia de todos estos componentes en los OPOCs, Artacho (1994) propuso un método alternativo al uso del solvente, el cual también previene el secado del orujo. Este método alternativo consiste en una segunda centrifugación, después de la separación inicial de EVOO. La principal ventaja resultante de esta extracción mecánica es que el OPOC contiene altas cantidades de compuestos bioactivos y funcionales de enorme interés farmacéutico y cosmético. Además, estos OPOCs presentan mínimas cantidades de PAHs y fosfolípidos, dado que no se usan en el proceso de producción, ni solventes, ni etapa de secado posterior.

En los últimos años, el interés del aceite de orujo de oliva ha crecido enormemente debido a que, además de poseer todos los

componentes funcionales del EVOO, contiene una mayor concentración de algunos componentes bioactivos presentes en menor cantidad y que poseen interesantes propiedades para la salud (Pérez-Camino y Cert, 1999). Entre ellos cabe destacar, de mayor a menor concentración:

a) Triacilglicerolos. Componente principal (> 95%).

b) Ácidos grasos. Oleico, usado en formulaciones farmacéuticas y cosméticas; y linoleico y linolénico, implicados en procesos metabólicos de la piel, promotores de la formación de ceramidas (Rabionet y col., 2014) y de la actividad de las vitaminas A y E (Rabasco y González, 2000).

c) Ácidos triterpénicos. Destacando maslínico y oleanólico con actividades antimicrobiana y antihiper glucémica (Horiuchi y col., 2007; Sato y col., 2007) y actividades antitumorales y antiinflamatorias (Márquez-Martín y col., 2006; Braga y col., 2007; Martín y col., 2007; Sun y col., 2015). Ya que éstos últimos compuestos se encuentran en la piel de la aceituna, no se presentan en cantidades apreciables en el EVOO (Pérez-Camino y Cert, 1999).

d) Materia insaponificable. Está constituida por:

a. Escualeno. Es uno de los mejores emolientes naturales que posee propiedades antioxidantes debido a su estructura isopreno (Reddy y Couvreur, 2009) y, además, incrementa la hidratación de la piel, disminuyendo la pérdida de

agua (Huang y col., 2009).

b. Alcoholes alifáticos. Impiden la liberación de varios mediadores inflamatorios (Fernández-Arche y col., 2009).

c. Esteroles y alcoholes terpénicos, entre ellos el eritrodiol y el uvaol. Tienen efectos positivos en los procesos inflamatorios (Márquez-Martín y col., 2006).

Sin embargo, debido a la alta acidez del OPOC, éste no puede ser utilizado como tal en el campo farmacéutico. Esta es la razón por la que tiene que someterse a un proceso de refinado para eliminar los componentes menores o compuestos que afectan a la estabilidad del aceite (De Greyt y Kellens, 2000), intentando al mismo tiempo que haya las pérdidas más pequeñas de los compuestos bioactivos (Ruiz-Méndez y col, 2013).

Existen dos tipos de refinado: el químico (Q) y el físico (F). en la actualidad, el proceso de refinado químico es el método común de refinado de los OPOCs. Se lleva a cabo en varias etapas: desgomado, neutralización, winterización, decoloración y desodorización (Antonopoulos y col., 2006). El principal inconveniente del refinado químico es la etapa de neutralización ya que al ser necesario usar sosa caustica, ésta elimina, además de los ácidos grasos libres, los compuestos bioactivos, como ácidos triterpénicos, presentes en el aceite (Servege, 1983).

Es por ello que, Ruiz-Méndez y col. (2010) propusieron los procedimientos de refinado físicos ya que las pérdidas de

compuestos bioactivos son mínimas. En el refinado físico, los aceites vegetales pueden ser neutralizados por destilación de ácidos grasos libres a altas temperaturas, bajas presiones y con corriente de vapor. Esto permite mantener en el aceite desodorizado (OPOD) los compuestos bioactivos de baja volatilidad y de ese modo obtener aceite con gran interés farmacéutico y cosmético. Sin embargo, el refinado físico solo se puede aplicar después de la extracción mecánica, debido a que el OPOC obtenido por extracción química tiene alto contenido en clorofila, fosfátidos, carotenos y otros contaminantes, los cuales no se pueden eliminar por simples medios físicos (Amelotti, 1987).

Enfermedades inflamatorias crónicas de la piel

Las enfermedades inflamatorias crónicas de la piel constituyen un grupo importante de afecciones dermatológicas, siendo de naturaleza y características muy diferentes. Las que más prevalencia tienen en la población son: la psoriasis, la dermatitis atópica, la dermatitis seborreica, la xerosis y la dermatitis alérgica de contacto.

La **psoriasis** es una enfermedad común de la piel, crónica, recidivante y caracterizada por la participación predominante de la piel, las uñas y las articulaciones (El-Gharabawy y col., 2017). Se considera una enfermedad inflamatoria crónica, mediada por el sistema inmunitario de la piel, si bien estudios recientes sobre su

INTRODUCCIÓN GENERAL

fisiopatología han desplazado la idea de que la psoriasis es una "enfermedad de la piel" por la de una "enfermedad sistémica mediada por células T" (El-Gharabawy y col., 2017). Presenta una prevalencia del 0,2-2% dependiendo de la población de origen (Parisi et al., 2013), aceptándose una serie de factores de riesgo como: antecedentes familiares y ambientales, tabaquismo, estrés, obesidad y consumo de alcohol (Huerta et al., 2007). Los síntomas que presentan varían desde la aparición de pocas escamas dispersas de color rojo hasta placas en casi toda la superficie corporal. El grado de gravedad depende de factores hereditarios y ambientales, y puede empeorar progresivamente con la edad (Lebwohl, 2003). La psoriasis causa considerable discapacidad psicosocial y tiene un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes (Feldman y col., 1997; Rapp y col., 1999), asociándose incluso con enfermedades depresivas, cardiovasculares y una artritis seronegativa conocida como artritis psoriásica (Griffiths y Barker, 2007). Por todo ello, el costo es alto tanto para los pacientes como para los sistemas de salud (Javitz y col., 2002), haciéndose incluso eco de ello muy recientemente la prensa (Emergen Andalucía, 2016).



Figura 1.- Ejemplo de psoriasis

La **dermatitis atópica** (DA) (también conocida como eczema atópico) es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que se caracteriza por prurito intenso y lesiones eczematosas recurrentes (Levy et al., 2015). Aunque a menudo comienza en la infancia y afecta a 2 de cada 10 niños, también es muy frecuente en adultos. Es la principal carga de salud no mortal atribuible a enfermedades de la piel, ya que inflige una carga psicosocial sustancial en los pacientes y en sus familiares, y aumenta el riesgo de alergia a los alimentos, asma, rinitis alérgica, otras enfermedades inflamatorias inmunitarias y trastornos de salud mental (Weidinger y Novak, 2016). La etiopatogenia de la DA no es del todo conocida (Engebretsen y col., 2016). Además de factores genéticos, los de estrés exógenos de la piel pueden comprometer la función de barrera de la piel y aumentar el riesgo de DA. Por ejemplo, las condiciones climáticas tales como baja humedad ambiental, baja temperatura y una reducción de la radiación ultravioleta (UV) afectan negativamente a la barrera cutánea y aumentan el riesgo

INTRODUCCIÓN GENERAL

de padecer DA (Thyssen y col., 2015; Engebretsen y col., 2016; Engebretsen y col., 2017). La DA afecta del 10 al 30% de la población pediátrica y del 1 al 3% de la población adulta. Además, los pacientes que aparentemente han superado la enfermedad continúan teniendo la denominada “piel hiperreactiva sensible” y pueden tener recurrencias después de largos periodos sin síntomas (Garmhausen y col., 2013).



Figura 2.- Ejemplo de dermatitis atópica

La **Xerosis** o la piel extremadamente seca es un trastorno cutáneo de alta prevalencia en la población general, incluidos los pacientes con terapias contra el cáncer (Valentine et al., 2015). Se caracteriza clínicamente por una piel áspera, descamativa y habitualmente pruriginosa. Un estrato córneo sano contiene, en condiciones normales, un 15-20 % de agua. Cuando esta cantidad es inferior al 10 % se forman escamas visibles y la piel adquiere un aspecto xerótico o de piel seca (Barco y Giménez-Arnau, 2008). Es por ello que, tradicionalmente, las sustancias humectantes, las oclusivas y los emolientes han sido, y seguirán siendo, el pilar de los

tratamientos médicos y cosméticos para la piel xerótica (Rawlings y col., 2008). Thyssen y Elias (2012), en un estudio realizado en Australia, señalan que la xerosis es dependiente de la latitud del lugar de residencia y que la prevalencia es mayor en un clima más fresco y templado. Además, ciertas dermatosis como la dermatitis atópica cursan con este trastorno, aunque puede presentarse en individuos sanos (Barco y Giménez-Arnau, 2008). Se estima que la xerosis, piel extremadamente seca generalizada o difusa, afecta al 75 % de los individuos mayores de 75 años y que es la causa más frecuente de prurito. Esta sequedad cutánea afecta a la calidad de vida del paciente y, cuando es grave, puede interferir en la productividad laboral, en especial cuando se localiza en las manos (Burdette-Taylor, 1995).



Figura 3.- Ejemplo de xerosis

La **dermatitis seborreica** (SD) es denominada “*kabaala kuttam*” en la India (Thambyayah y Amuthan, 2015). Se trata de una enfermedad inflamatoria crónica y recidivante con una prevalencia del 3 al 5%, afectando más a hombres adultos que a mujeres y es

frecuente que se presente después de los 50 años de edad (Plewig y col., 2008; Kawasaki y Kawana, 2014). Su aparición en etapa infantil es transitoria y, a menudo, se resuelve dentro de los primeros 3 ó 4 meses de vida (Chang y col., 2014). Se distribuye principalmente de forma simétrica en áreas ricas en glándulas sebáceas, siendo la cara, las orejas, el cuero cabelludo y la parte superior del tronco, las áreas más comúnmente afectadas (Balighi y col., 2016). El tratamiento para SD depende de muchos factores incluyendo la localización en el cuerpo, si bien, se ha demostrado que incluir sustancias antiinflamatorias tópicas, son eficaces en el tratamiento (Ramos y col., 2014; Balighi y col., 2016). Así, se han utilizado diferentes compuestos antiinflamatorios, antifúngicos y queratolíticos, sólo o en combinación (Tehrani y col., 2014).



Figura 4.- Ejemplo de dermatitis seborreica

La **dermatitis alérgica de contacto** Se encuadra en una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado, que afecta entre el 15 y el 20% de la población general en todo el mundo (Honda et al., 2013; Kostner et al., 2017).

En consecuencia, aunque todas estas enfermedades inflamatorias de la piel no son afecciones graves, sí que comprometen en gran medida la calidad de vida de los pacientes durante años, creando además serios problemas socioeconómicos.



Figura 5.- Ejemplo de dermatitis alérgica de contacto

REFERENCIAS

Agencia de Información y Control Alimentarios (AICA). https://servicio.magrama.gob.es/InformacionMercado_Aica/DeclaracionesCursoEntInf.aao?Aplic=IMT&OpcMenu=DCENT (Consultado en febrero 2017).

Alami SBD (2010). Aprovechamiento de hueso de aceituna. Biosorción de iones metálicos. Tesis Doctoral Europea. Universidad de Granada.

Alba Mendoza J (1995). El orujo de aceituna. Evolución, estado actual y perspectivas. *Agricultura*, LXIII: 84-86.

Amelotti G (1987). Effects of the interesterification for physical refining of some olive oils. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 64: 223-226.

Antonopoulos K, Valet N, Spiratos D, Siragakis G (2006). Procesado de aceite de oliva y aceite de orujo. *Grasas Aceite*, 57: 56-67.

Artacho A (1994). Procedimiento para la extracción de aceite de orujo de oliva sin utilización de disolventes orgánicos. Patente ES 2048667.

Asociación Española de Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa, ASEMESA. La Aceituna, Historia y Curiosidades. <http://www.asesmesa.es/content/aceitunacuriosidades> (Consultado en febrero 2017).

Balighi K, Ghodsi SZ, Daneshpazhooh M, Ghale-Baghi S, Nasimi M, Azizpour A (2016). Hydrocortisone 1% cream and sertaconazole

2% cream to treat facial seborrheic dermatitis: A double-blind, randomized clinical trial. *Int J Womens Dermatol.*, DOI: 10.1016/j.ijwd.2016.11.008.

Barco D, Giménez-Arnau A (2008). Xerosis: una disfunción de la barrera epidérmica. *Actas Dermosifiliográficas*, 99: 671-682.

Braga F, Ayres-Saraiva D, Gatas CR, Capella MAM (2007). Oleonic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (p-glycoprotein): Possible use in cancer therapy. *Cancer Letters*, 248: 147-152.

Bouaziz M, Fki I, Jemai H, Ayadi M, Sami Sayadi S (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chem.*, 108: 253–262.

Burdette-Taylor SR (1995). Eczema, ichthyosis, psoriasis: conditions of cornification. *Ostomy Wound Manage*, 41: 36-38.

Cerrone F (2011). Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alperujos por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Chang YY, Lu PH, Yang ChH (2014). Unilateral seborrheic dermatitis following the excision of the trigeminal schwannoma. *Dermatol Sin.*, 32: 110–112.

Comas V (2012). Cómo producir aceite de oliva y aprovechar todo lo que genera. <http://www.interempresas.net/Produccion-Aceite/Articulos/101786-Como-producir-aceite-de-oliva-y->

[aprovechar-todo-lo-que-genera.html](#) (Consultado en febrero 2017).

Comisión Europea. Servicio de Información Comunitario sobre Investigación y Desarrollo (CORDIS). Los alpechines: de residuo a combustible en beneficio de las economías rurales. http://cordis.europa.eu/news/rcn/122198_es.html (Consultado en febrero 2017).

Consejo Oleícola Internacional. Cifras Aceites de Oliva. http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/100-mission-statement?lang=es_ES (Consultado en febrero 2017).

De Greyt W, Kellens M (2000). Refining Practice. In: Hamm W, Hamilton RJ (Edit) Edible oil Processing. Sheffield academic press, England, pp. 90-105.

El-Gharabawy RM, Ahmed AS, Al-Najjar AH (2017). Mechanism of action and effect of immune-modulating agents in the Treatment of psoriasis. *Biomed Pharmacother.*, 85: 141-147.

Emergen Andalucía, Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (2016). Diario de Sevilla, 31 de Diciembre, pp. 46-47.

Engbretsen KA, Johansen JD, Kezic S, Linneberg A, Thyssen JP (2016). The effect of environmental humidity and temperature on skin barrier function and dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 3: 223-249.

Engbretsen KA, Bager P, Wohlfahrt J, Skov L, Zachariae C, Nybo Andersen AM, Melbye M, Thyssen JP (2017). Prevalence of atopic

dermatitis in infants by domestic water hardness and season of birth. In press DOI: 10.1016/j.jaci.2016.11.021

Feldman SR, Fleischer AB, Reboussin DM, Rapp SR, Bradham DD, Exum ML, Clark AR (1997). The economic impact of psoriasis increases with psoriasis severity. *J Am Acad Dermatol*, 37: 564-569.

Fernández-Arche A, Márquez-Martín A, de la Puerta Vázquez R, Perona J, Terencio C, Pérez-Camino C, Ruiz-Gutiérrez V (2009). Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *J Nutr Biochem*, 20: 155-162.

Fernández-Bolaños J, Guillen R., Heredia A, Jiménez A, Sánchez C (1990). El hueso de aceituna como fuente de material lignocelulósico. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 9 (5): 109-115.

Furneri PM, Marino A, Uccella ASN, Bisignano G (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int J Antimicrob Agents*, 20: 293- 296.

Garcia OB, Castillo J, Lorente J, Ortuno A., Del Rio JA (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*, 68: 457--462.

Garmhausen D, Hagemann T, Bieber T, Dimitriou I, Fimmers R, Diepgen T, Novak N (2013). Characterization of different courses of atopic dermatitis in adolescent and adult patients. *Allergy*, 68: 498–506.

Griffiths CEM, Barker JNWN (2007). Pathogenesis and clinical

features of psoriasis. *Lancet*, 370: 263–71.

Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K (2013). Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*, 133 (2): 303-315.

Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsuchiya T (2007). Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull*, 30: 1147-1149.

Huang ZR, Lin YK, Fang JY (2009). Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, 14: 540-554.

Huerta C, Rivero E, Rodríguez LAG (2007) Incidence and risk factors for psoriasis in the general population. *Arch Dermatol*, 143 (12): 1559-1565.

Javitz HS, Ward MM, Farber E, Nail L, Vallow SG (2002). The direct cost of care for psoriasis and psoriatic arthritis in the United States. *J Invest Dermatol*, 46: 850–860.

Kawasaki Y, Kawana S (2014). Efficacy and safety of a topical carbon suspension photoenhancer adjunctive to intense pulsed light treatment for pigmented lesions in Japanese patients: A pilot study. *Laser Ther*, 23: 13–19.

Khalil MMH, Ismail EH, El-Baghdady KZ, Mohamed D (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and

its antibacterial activity. *Arab J Chem*, 7: 1131–1139.

Kostner L, Anzengruber F, Guillod C, Recher M, Schmid-Grendelmeier P, Alexander A, Navarini SA (2017). Allergic Contact Dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am*, 37 (1): 141-152.

Lebwohl M (2003). Psoriasis. *Lancet*, 361: 1197–204.

León-Camacho M, Viera-Alcaide I, Ruiz-Méndez MV (2003). Elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons by bleaching of olive pomace oil. *Eur J Lipid Sci Technol*, 105: 9-16.

Levy LL, Urban J, King BA (2015). Treatment of recalcitrant atopic dermatitis with the oral Janus kinase inhibitor tofacitinib citrate. *J Am Acad Dermatol*, 73 (3): 395-399.

Márquez-Martín A, De la Puerta R, Fernández-Arche A, Ruiz-Gutiérrez V, Yaqoob P (2006). Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil human mononuclear cells. *Cytokine*, 36: 211-217.

Martín R, Carvalho J, Ibeas E, Hernández M, Ruiz-Gutiérrez V, Nieto ML (2007). Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cáncer Research*, 67: 3741-3751.

Micol V, Caturla N, Pérez-Fons L, Más V, Pérez L, Estepa A (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research*, 66: 129–136.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Inventario de tecnologías disponibles en España para la lucha contra la desertización. Utilización de alperujo como enmienda para la recuperación de los suelos. http://www.mapama.gob.es/es/desarrollorural/temas/politica-forestal/0904712280144da2_tcm7-19613.pdf (Consultado en febrero 2017).

Nunes MA, Pimentel FB, Costa AS, Alves RC, Oliveira MBP (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 35: 139-148.

Orden de 20 de julio de 2007, por la que se regula la Acreditación Ambiental de Calidad del Compost. BOJA nº 156 p. 31. <http://www.juntadeandalucia.es/boja/2007/156/fasciculo1.pdf> (Consultado en febrero 2017).

Parisi R, Symmons DPM, Griffiths ChEM, Darren M. Ashcroft DM (2013). Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J Invest Dermatol*, 133: 377–385.

Pérez-Camino MC, Cert A (1999). Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J Agric Food Chem*, 47: 1558–1562.

Plewig G, Jansen T (2008). Seborrheic dermatitis. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ (Edit) Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 7th ed, McGraw-Hill, New York, pp. 219–225.

Pozzi MT, Filippín AJ, Matías C, Hammann A (2010). Posibilidad de uso del Alpechín en Fertilización de Tierras Agrícolas. *Información Tecnológica*, 21: 117-123.

Rabasco A, González M (2000). Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas Aceites*, 51: 74-96.

Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R (2014). Ceramide synthesis in the epidermis. *BBA-Mol Cell Biol L J*, 1841: 422-434.

Ramos Comerzana A, Monteoliva Sanchez M (2000). Potencial biofarmacéutico de los residuos de la industria oleícola. *Ars Pharmaceutica*, 41: 129-136.

Ramos-e-Silva M, Sampaio AL, Carneiro S (2014). Red face revisited: Endogenous dermatitis in the form of atopic dermatitis and seborrheic dermatitis. *Clin Dermatol*, 32: 109–115.

Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer AB, Reboussin DM (1999). Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol*, 41: 401–407.

Rawlings AV, Matts PJ, Anderson CD, M.S. Roberts MS (2008). Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 5: 128-136.

Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes. (BOE nº 171, de 19 de Julio 2005). <https://www.boe.es/boe/dias/2005/07/19/pdfs/A2559225669.pdf> (Consultado en febrero 2017).

Reddy LH, Couvreur P (2009). Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 1412-1426.

Reglamento Europeo (CE) nº 889/2008 de la Comisión de 5 de septiembre de 2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento Europeo (CE) nº 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control. Diario Oficial de la Unión Europea. [http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/laagricultura-ecologica/R\(CE\)889-2008_tcm7-220467.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/laagricultura-ecologica/R(CE)889-2008_tcm7-220467.pdf) (Consultado en febrero 2017).

Rodrigues F, Pimentel FB, Oliveira MBP (2015). Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. *Ind Crops Prod*, 70: 116-124.

Ruiz-Méndez MV, Dobarganes MC, Sánchez-Moral P (2010). Edible olive pomace oil concentrated in triterpenic acids, procedure of physical refining utilized for obtainment thereof and recovery of functional components present in the crude oil. Patent ES 2332977 (A1).

Ruiz-Méndez MV, Aguirre-González MR, Marmesat S (2013). Olive Oil Refining Process. In: Aparicio, R., Harwood, J. (Eds.), *Handbook of Olive Oil*. Springer, New York, pp. 715-738.

Sánchez-Moral P, Ruiz-Méndez MV (2006). Production of pomace olive oil. *Grasas Aceites*, 57: 47–55.

Sato H, Genet C, Strehle A, Thomas C, Lobstein A, Wagner A, Mioskowski C, Auwerx J, Saladin R (2007). Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem Biophys Res Commun*, 362: 793-798.

Servege A (1983). Difficulties in physical refining of olive oil due to presence of triterpene oleanolic acid. *J Am Oil Chem Soc*, 60: 584-587.

Sun M, Tang Y, Ding T, Liu M, Wang X (2015). Investigation of cytochrome P450 inhibitory properties of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea L.*, and its structure–activity relationship. *Phytomedicine*, 22: 56-65.

Thambyayah M, Amuthan A. (2015). Infantile seborrheic dermatitis: A pediatric siddha medicine treatise. *Clin Dermatol*, 33: 355–361.

Thyssen JP, Elias PM (2012). Xerosis is latitude dependent and affects the propensity to develop atopic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 130: 820-821.

Thyssen JP, Zirwas MJ, Elias MP (2015). Potential role of reduced environmental UV exposure as a driver of the current epidemic of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 136: 1163-1169.

Valentine J, Belum VR, Duran J, Ciccolini K, Schindler K, Wu S, Lacouture ME (2015). Incidence and risk of xerosis with targeted anticancer therapies. *J Am Acad Dermatol*, 72 (4): 656-667.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Weidinger S, Novak N (2016). Atopic dermatitis. *Lancet*, 387: 1109-1122.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La obtención de nuevas formulaciones dermatológicas para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias de la piel, constituye un importante reto, dado la repercusión social y económica que esto conlleva. Además, el uso del aceite de orujo de oliva como materia prima para tal fin, representa una importante novedad tanto en el campo farmacéutico como cosmético. Por ello y teniendo en cuenta lo antes mencionado, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido la evaluación del aceite de orujo para su uso en formulaciones dermatológicas. Para ello, se procedió a la obtención de diferentes aceites de orujo de oliva por distintos procedimientos de extracción y refinación. A continuación, fueron caracterizados y comparados con el fin de seleccionar el método de procesado que conlleve las menores pérdidas de compuestos bioactivos. Posteriormente, se seleccionó como materia prima el aceite con mayor contenido en compuestos bioactivos para diseñar y desarrollar las formulaciones dermatológicas más adecuada para el estado y tipo de piel en estudio. Además, se realizaron las caracterizaciones reológicas, los análisis de los perfiles de textura (TPA) y el estudio de la liberación y la determinación del contenido de compuestos bioactivos. Igualmente, se determinó la estabilidad durante 90 días de almacenamiento a distintas temperaturas, realizándose nuevamente todos los estudios, con la finalidad de seleccionar las mejores formulaciones para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas de la piel.

OBJETIVOS

Para ello, esta Tesis Doctoral se ha estructurado en cuatro capítulos con el objetivo de favorecer la comprensión del trabajo realizado.

CAPÍTULO I. Caracterización físico-química y reológica de los aceites de orujo de oliva.

Dado que no se encontraron referencias bibliográficas sobre este tema, se comienza esta Tesis, como no podía ser de otra forma, con el estudio de las características y el comportamiento reológico del aceite de orujo de oliva crudo extraído por procedimientos químicos y mecánicos durante un período de cosecha determinado.

CAPÍTULO II. Influencia de los procesos de refinado sobre la composición cuantitativa de compuestos bioactivos, reología y textura del aceite de orujo de oliva para formulaciones dermatológicas.

En este capítulo se lleva a cabo el estudio de la influencia de tres procesos de refinado, químico, físico clásico y físico por destilación molecular a diferentes temperaturas, en la composición de los compuestos bioactivos de dos tipos de aceite de orujo de oliva, uno procedente de extracción química y otro de la mecánica. La selección del mejor método de refinado se hizo después de una determinación analítica de los compuestos bioactivos. Además, se

realizaron los análisis reológico y de textura de los aceites obtenidos, con el fin de caracterizarlos mecánicamente para uso en alteraciones dermatológicas.

CAPÍTULO III. Influencia de las condiciones de los procesos de refinado físico para el enriquecimiento de los compuestos bioactivos del aceite de orujo de oliva.

En el capítulo anterior se concluyó que el mejor método de refinado es el físico por destilación molecular; sin embargo, se observó que era necesario mejorar las condiciones de trabajo del proceso de refinado por destilación molecular para reducir la acidez y conseguir las menores pérdidas de los compuestos bioactivos. Por ello en este capítulo, el aceite de orujo de oliva obtenido por extracción mecánica se sometió a un proceso de refinado físico mediante dos procedimientos: a) destilación molecular en vacío y a distintas temperaturas (190 a 265°C) y b) destilación por película descendente (a escala industrial). Igualmente, la selección del mejor proceso de refinado se realizó en base a la determinación analítica de los compuestos bioactivos por cromatografía de gases. Finalmente, la caracterización reológica y el análisis de los perfiles de textura se estudiaron para la caracterización mecánica de los aceites de orujo de oliva.

CAPÍTULO IV.- Aceite de orujo de oliva. Nueva materia prima para el diseño y desarrollo de formulaciones dermatológicas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas de la piel.

En el capítulo anterior se obtuvieron dos aceites de orujo de oliva, uno por destilación molecular (OPOD MD) y otro por destilación en película descendente (OPOD FF), ambos con una alta cantidad en compuestos bioactivos. Por ello, el objetivo de este capítulo fue el diseño y desarrollo de dos formulaciones dermatológicas (aceites secos y emulsiones O/A) con cada uno de los aceites, OPOD MD y OPOD FF. Seguidamente, se compararon con el fin de elegir las mejores formulaciones para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas de la piel.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y REOLÓGICA DE LOS ACEITES DE ORUJO DE OLIVA

European Journal of Lipid Science and Technology.

2015, 117: 87-91

C.A. Sánchez-Gutiérrez, M. Casas, M.J. Lucero and

M.V. Ruiz-Méndez

CAPÍTULO I

I.1. INTRODUCCIÓN

La caracterización reológica de los aceites es de gran importancia para poder ampliar su ámbito de aplicación. La reología es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de los materiales y describe la relación entre los parámetros fuerza, deformación y tiempo (Barnes y col., 1989). Así, con los estudios en cizalla oscilatoria se puede determinar la región viscoelástica lineal de la muestra, lo cual es necesario para asegurar las condiciones no destructivas de la muestra y, con ello mediante barridos de frecuencia, poder separar las componentes elástica y viscosa de este tipo de fluidos. Además, realizando los estudios reológicos en cizalla rotacional se pueden obtener información de la viscosidad y del comportamiento de flujo del material. A partir de las representaciones gráficas de las curvas de flujo o de viscosidad (esfuerzo de cizalla (Pa) *versus* velocidad de cizalla (1/s) o viscosidad (Pa.s) *versus* velocidad de cizalla (1/s)) se pueden aplicar modelos matemático teóricos que proporcionan parámetros que identifican el comportamiento reológico de los materiales (Schramm, 1994).

La caracterización reológica de los aceites vegetales es necesaria para su aplicación en diferentes sectores. Así por ejemplo, es de destacar, dentro del campo de la Bromatología, los estudios de las grasas sólidas y de cristalización del aceite de palma con respecto a la temperatura (De Graef y col., 2008) o la absorción

CAPÍTULO I

de aceite durante el proceso de fritura (Maskan, 2003; Santos y col., 2004; Kim y col., 2010;). Pero también, son importantes para usos no alimenticios, tal como en biocombustibles biodegradables (Doll y col., 2008), y en el campo farmacéutico para el diseño, desarrollo, optimización y control de calidad de nuevas formulaciones (Jiménez-Kairuz y col., 2002; Chouaibi y col., 2012).

El aceite de oliva es el zumo extraído por medios mecánicos, que separan las diferentes partes que conforman su estructura: sólido (orujo), aceite y agua de vegetación. El aceite obtenido a partir del residuo sólido, constituido principalmente por pulpa, cáscara, semilla y el olivo, se llama aceite de orujo de oliva. El aceite de orujo se almacena en grandes tanques, donde su deterioro aumenta con el tiempo de almacenamiento (Ramos Hinojosa y Ruiz Méndez, 2004).

Actualmente, existen dos tipos de aceites de orujo de oliva en el mercado, dependiendo del procedimiento utilizado en su extracción, es decir, si es por centrifugación o por extracción con disolvente (Sánchez-Moral y Ruiz-Méndez, 2006). El interés generado por este aceite está creciendo gradualmente por su valor económico y porque contiene todos los compuestos funcionales presentes en el aceite de oliva virgen (Rodríguez-Rodríguez y col., 2009; Valero Muñoz y col., 2014). Algunos de los componentes menores del aceite de oliva están presentes incluso en concentraciones más altas en el de orujo, tal es el caso de los

triterpénicos (Pérez-Camino y Cert, 1999) con aplicación directa en sectores tan diversos como el de Alimentación, Cosmética y Farmacia.

I.2. OBJETIVO

Dado que no se han encontrado referencias bibliográficas sobre este tipo de caracterización física del aceite de orujo de oliva, el objetivo de este Capítulo se centró en la caracterización química y reológica del aceite de orujo de oliva crudo, extraído por medios mecánicos y químicos.

I.3. MATERIALES Y MÉTODOS

I.3.1. Materiales

Los aceites de orujo de oliva (OPOC) objeto de estudio se obtuvieron durante el período de cosecha 2012/2013:

- 5 muestras obtenidas por centrifugación (febrero, abril, julio y diciembre de 2012 y marzo de 2013).

- 5 muestras obtenidas por extracción con disolventes (febrero, abril, julio y diciembre de 2012 y marzo de 2013).

También se utilizaron los siguientes reactivos y solventes de calidad analítica: acetona, acetonitrilo de grado HPLC, dietil éter, etanol e hidróxido sódico (Panreac SA, Barcelona, España).

I.3.2. Métodos

I.3.2.1. Caracterización química

La acidez y la composición de los triglicéridos (TAG) se determinaron por triplicado siguiendo los métodos del Reglamento CEE Nº 2568/91 (Regulación Europea (EU) Nº 1348/2013).

I.3.2.2. Caracterización reológica

Los ensayos reológicos se realizaron mediante un reómetro de estrés controlado (AR-2000, TA Instruments, New Castle, USA) y un sensor con geometría plana de 60 mm de diámetro y superficie lisa. La temperatura del ensayo se mantuvo constante mediante una placa Peltier ($25 \pm 0.1^\circ\text{C}$). Los OPOC se sometieron a un protocolo experimental que se inició con el estudio en cizalla oscilatoria dinámica. En primer lugar, se determinó la región viscoelástica lineal a través de los barridos de estrés oscilatorio a 1 Hz de frecuencia y con un porcentaje de tolerancia del 1% y tiempo máximo de adquisición de datos de 120 s. Así se determinó un estrés oscilatorio, dentro de la zona *plateau*, y el estrés crítico (τ_c) por encima del cual se pierden las condiciones no destructivas y, por tanto, la muestra se deforma reológicamente. A continuación, se llevó a cabo un barrido de frecuencia, al esfuerzo oscilatorio seleccionado, en el rango de 0.01 a 628.3 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. El análisis de los resultados se basó en el perfil de las componentes elástica (G') y viscosa (G''), también llamadas módulos de almacenamiento y de

pérdida, respectivamente.

Por otra parte, se realizaron los ensayos en cizalla rotaciones para obtener las curvas de flujo y/o de viscosidad y así poder identificar y cuantificar el comportamiento de flujo de los aceites.

Las curvas se ajustaron a los diferentes modelos teóricos reológicos, en concreto a los de Ostwald-De Waele o Power Law (Ecuación. I.1) y Herschel-Bulkley (Ecuación. I.2) (Schramm, 1994).

$$\tau = K.\dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación I.1}$$

$$\tau = \tau_0 + K.\dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación I.2}$$

Donde τ es el esfuerzo de cizalla, τ_0 representa el esfuerzo umbral plástico, K es el índice de consistencia y n es el índice de flujo ($n=1$ para los fluidos Newtonianos y $n \neq 1$ para fluidos no-Newtonianos, los cuales serán pseudoplásticos si $n < 1$ y dilatantes si $n > 1$).

En todos los ensayos, cada medida se realizó por triplicado, dando su validez cuando las curvas eran superponibles.

I.3.2.3. Análisis del perfil de textura (TPA)

Las propiedades de textura de los OPOC se determinaron con el analizador de textura TA.XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, Reino Unido) controlado mediante un software. El protocolo de trabajo comienza aplicando una compresión uniaxial generada por una célula de carga de 5 kg, con el fin de insertar una sonda cónica (HDP/SR, Stable Micro Systems) en el receptor complementario de

la misma que contenía 8 ± 0.1 g de cada uno de aceites. La sonda se colocó a una altura de 17 mm y, en el momento de contactar con la muestra dentro del receptor, penetró a una velocidad de 2 mms^{-1} . A partir de las gráficas fuerza-distancia o fuerza-tiempo obtenidas, se determinaron la firmeza (fuerza máxima requerida para evacuar el contenido del receptor y que se acoplen las dos parte de la sonda), cohesividad (área bajo la curva positiva que refleja el trabajo requerido para deformar el producto durante la penetración de la sonda) y adhesividad (área bajo la curva negativa que recoge el trabajo necesario para superar las fuerzas de atracción entre las superficie del aceite y de la sonda) (Lucero y col., 2011).

I.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.4.1. Características químicas de los aceite de orujo de oliva

Los aceites vegetales están constituidos principalmente por TAG, en concentraciones de prácticamente el 99%. La composición y distribución de los ácidos grasos en las estructuras de los TAG influyen en el comportamiento tecnológico de las grasas y de los aceites. La Tabla I.1 muestra la acidez y la composición de triglicéridos expresada en el número de carbonos equivalente (ECN) de los OPOC extraídos por medios tanto mecánicos como químicos.

Como era de esperar, la acidez aumentó con el tiempo de

almacenamiento (Ramos Hinojosa y Ruiz Méndez, 2004), aunque sorprendentemente, las muestras del 12 de diciembre mostraron menor acidez que las del 13 de marzo.

Los OPOC extraídos por disolvente presentaron mayor proporción de TAG de ácidos grasos insaturados, como LLL, OLnL, LOL, PLO y POL (P, palmítico; Po, palmitoleico; S, esteárico; O, oleico; L, linoleico; Ln, linolénico; y A, araquídico), mientras que los OPOC extraídos por centrifugación mostraron mayores contenidos de OOO, siendo el incremento promedio del 6.9%. Sin embargo, de febrero a marzo, se produjo un aumento gradual del contenido de OOO, siendo el incremento del 9.7% en las muestras de OPOC extraídas por medios mecánicos y, aún más, en los OPOC extraídos con disolvente (13.5%). De acuerdo con Fuentes de Mendoza y col., (2013), estas diferencias pueden atribuirse a la madurez de la aceituna. Sus hallazgos indican diferencias significativas en la composición de ácidos grasos con la madurez de los frutos, con una clara tendencia a aumentar la concentración de ácidos grasos monoinsaturados totales (MUFA) con el índice de madurez y, al mismo tiempo, una tendencia a la disminución de los contenidos en ácidos grasos poliinsaturados totales (PUFA).

CAPÍTULO I

Tabla 1.1.- Acidez (% de ácido oléico) y composición de triglicéridos (% TAG) de las muestras de aceite de orujo de oliva durante todo el periodo de cosecha 2012/2013 (P, palmítico; Po, palmitoleico; S, esteárico; O, oleico; L, linoleico; Ln, linolénico; y A, araquídico).

OPOC	Febrero 12	Abril 12	Julio 12	Diciembre 12	Marzo 13
Extracción mecánica					
Acidez (%)	2.41	6.33	11.76	2.81	6.08
LLL*	0.36	0.42	0.66	0.36	0.46
OLnL	0.33	0.30	0.40	0.25	0.28
PLnL	0.06	0.14	0.21	0.12	0.12
LOL+OLnO	2.80	2.94	2.13	1.86	2.39
PLL	1.94	1.91	1.98	1.87	1.84
PLnO	0.47	0.47	0.49	0.55	0.47
LOL	15.33	15.59	11.97	11.46	13.98
PLO	5.31	5.57	5.37	5.01	5.04
OOO	43.72	44.00	42.40	45.71	47.97
SLO+POO	20.16	19.51	23.52	22.96	18.30
POL	2.07	2.00	2.87	2.60	1.64
SOO	6.25	6.09	6.49	6.00	6.54
SLS+POS	1.19	1.08	1.51	1.24	0.97
Extracción química					
Acidez (%)	6.31	11.83	12.49	6.03	20.70
LLL	0.74	0.79	0.85	0.69	0.91
OLnL	0.33	0.39	0.40	0.41	0.51
PLnL	0.10	0.17	0.14	0.02	0.22
LOL+OLnO	3.78	3.77	3.20	2.95	2.23
PLL	2.17	2.11	2.04	2.02	1.56
PLnO	0.48	0.44	0.49	0.50	0.57
LOL	15.32	15.54	13.86	12.88	11.15
PLO	6.92	6.44	6.09	6.12	4.07
OOO	39.55	40.62	41.27	42.00	44.91
SLO+POO	21.21	20.41	21.93	22.85	22.97
POL	2.62	2.33	2.64	2.87	2.74
SOO	5.58	5.82	5.83	5.47	6.62
SLS+POS	1.20	1.16	1.27	1.21	1.54

I.4.2. Caracterizaciones reológica y de textura de los aceites de orujo de oliva

La Figura I.1 muestra los resultados obtenidos en el ensayo de cizalla oscilatoria de los OPOC. El barrido de esfuerzo oscilatorio está diseñado para determinar la región viscoelástica lineal en donde los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') tienen que tener una zona *plateau* con valores constantes e independientes de la tensión oscilatoria aplicada a la frecuencia de 1 Hz (Pérez-Camino y Cert, 1999). Después de seleccionar un esfuerzo oscilatorio de 0.03 Pa en esta región, se realizaron los consiguientes barridos de frecuencia. En todas los OPOC, las componentes elásticas (G') y viscosas (G'') aumentaron con la frecuencia aplicada en el rango ensayado, siendo G'' siempre superior a G' . Por lo tanto, todos los OPOC fueron fluidos viscoelásticos con predominio de la componente viscosa. Sin embargo, hubo una excepción en los OPOC extraídos por centrifugación. En concreto, la muestra recogida el 12 de julio presenta una componente elástica (G'), que estaba por encima de la viscosa (G''). Esta muestra, además, mostró un punto de corte de las curvas (conocido como punto de reticulación), a un valor de frecuencia de 1.909 rad/s y de $G'=G''$ de 1.925 Pa, a partir del cual comenzó el predominio de G'' .

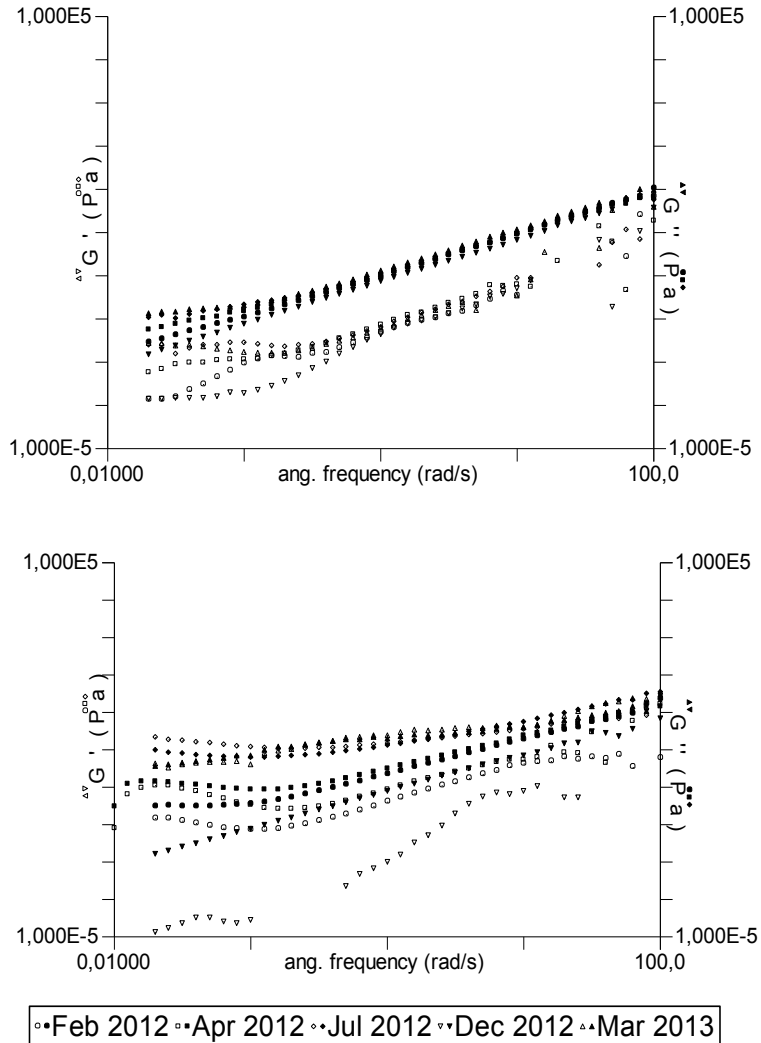
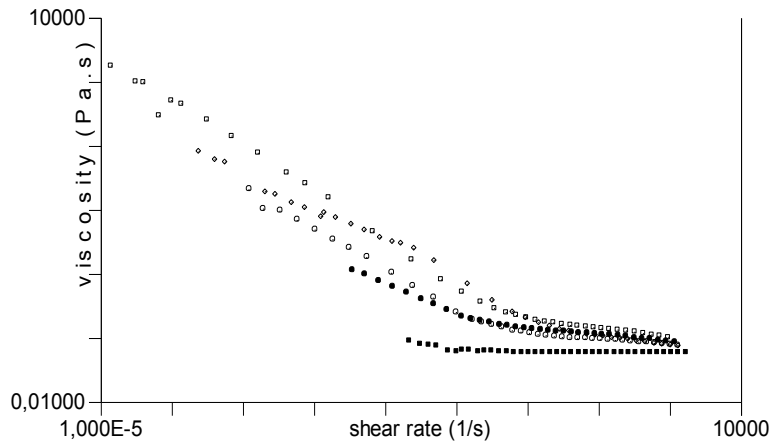


Figura 1.1.- Barrido de frecuencia del aceite de orujo de oliva crudo obtenido por extracción mecánica (A) y por extracción química (B).

A continuación, los OPOC se sometieron el estudio en cizalla rotacional. A través de las curvas de viscosidad, viscosidad frente a la velocidad de cizalla, se obtuvo información sobre el comportamiento del flujo de los aceites (Figura 1.2).



°Feb 2012 °Apr 2012 °Jul 2012 °Dec 2012 °Mar 2013

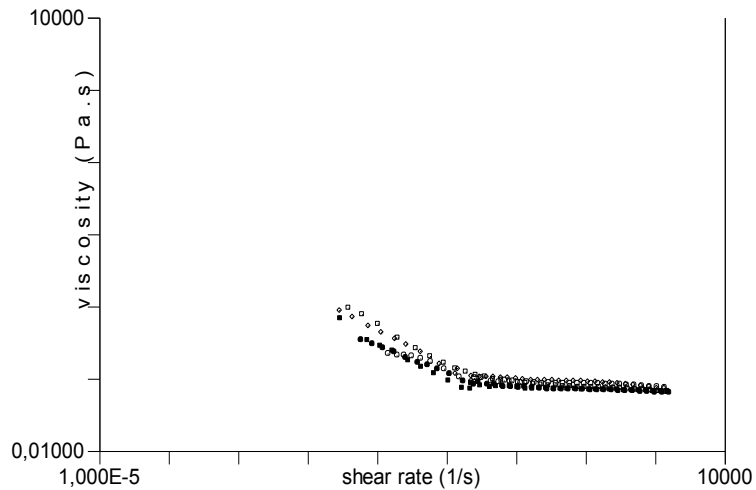


Figura I.2.- Curvas de viscosidad de los aceites de orujo de oliva crudo obtenidos por extracción mecánica (A) y por extracción química (B).

Se observa que todos los OPOC, tanto los obtenidos por medios mecánicos (Figura I.2A) como por medios químicos (figura I.2B) mostraron ser fluidos no Newtoniano y con flujo pseudoplástico, en donde la viscosidad disminuye con el aumento de la velocidad de

cizalla y consecuentemente el sistema se hace cada vez más fluido.

Tras aplicar los diferentes modelos teóricos reológicos, el comportamiento de los diferentes OPOC presentó buenos ajustes a los de Power Law y Herschel-Bulkley (Schramm, 1994), (Tabla I.2).

Tabla I.2.- Parámetros reológicos obtenidos para los aceites de orujo de oliva tras el ajuste a los modelos teóricos

OPOC	Parámetros reológicos			
	τ_0 (Pa)	K (Pa·s)	n	SE
Extracción mecánica	Modelo de Herschel-Bulkley			
feb-12	0.014	0.149	0.911	1.317
Apr-12	0.007	0.200	0.884	1.406
jul-12	0.064	0.299	0.849	2.197
Dec-12	0.009	0.058	0.998	0.865
mar-13	0.299	0.212	0.858	2.257
Extracción química	Modelo de Power Law			
feb-12		0.118	0.939	2.117
Apr-12		0.090	0.954	1.177
jul-12		0.113	0.928	1.962
Dec-12		0.081	0.977	1.402
mar-13		0.151	0.904	1.967

Ambos tipos de OPOC presentaron valores de $n < 1$, confirmando así su comportamiento pseudoplástico. La principal diferencia reológica observada entre los aceites fue que los obtenidos por extracción mecánica se ajustaron mejor al modelo de Herschel-Bulkley, mientras que los extraídos por disolvente lo hicieron al de Power Law. Ambos modelos son similares ya que el primero es una modificación del segundo, lo importante es que a

través de Herschel-Bulkley se puede determinar el esfuerzo umbral por encima del cual el OPOC comienza a fluir (τ_0), indicando el grado de plasticidad.

Este parámetro, por consiguiente, sólo se pudo cuantificar en los OPOC obtenidos por extracción mecánica.

De los resultados obtenidos a partir del índice de consistencia (K), se concluyó que los aceites obtenidos por extracción con disolvente fueron más uniformes y presentaron valores de viscosidad más bajos a lo largo del período estudiado que los aceites extraídos por centrifugación.

Tabla I.3.- Análisis de los perfiles de textura (TPA) de los aceite de orujo de oliva crudo

OPOC	Parámetros de TPA		
	Firmeza (N)	Cohesividad (Ns)	Adhesividad (Ns)
Extracción mecánica			
feb-12	1.69	0.54	0.29
Abr-12	1.00	0.36	0.15
Jul-12	0.33	0.16	0.20
Dic-12	2.08	0.55	0.16
Mar-13	1.45	0.49	0.21
Extracción química			
Feb-12	1.50	0.55	0.25
Abr-12	0.83	0.29	0.09
Jul-12	1.18	0.30	0.17
Dic-12	0.93	0.35	0.19
Mar-13	0.06	0.08	0.04

La Tabla I.3 muestra los resultados obtenidos en el análisis de los perfiles de textura de todos los OPOC. Las fuerzas de cohesión y adhesión fueron, en general, superiores para los aceites extraídos

por centrifugación, además de ser independientes del período de recolección.

I.5. CONCLUSIONES

Es la primera vez que se realiza un estudio de caracterización reológica al aceite de orujo de oliva crudo. El tipo de extracción del aceite (por centrifugación o por extracción con disolventes) mostró un gran impacto en el comportamiento reológico. Ambos tipos de aceites fueron fluidos viscoelásticos, con predominio de la componente viscosa, y tuvieron un comportamiento de flujo pseudoplástico. Sin embargo, los aceites extraídos por centrifugación mostraron un cierto grado de plasticidad determinada por el mejor ajuste al modelo de Herschel-Bulkley, mientras que los aceites obtenidos mediante extracción con disolventes se ajustaron mejor al modelo de Power Law. Por consiguiente, se pudo concluir que el proceso de extracción afecta a la plasticidad de los aceites de orujo de oliva.

Se ha demostrado que el aceite de orujo de oliva obtenido por extracción mecánica tiene un mayor porcentaje de los compuestos bioactivos principales (triacilglicérols), pero que debido a su elevada acidez no se puede utilizar como materia prima en el campo farmacéutico.

I.6. REFERENCIAS

Barnes HA, Hutton JF, Walters K (1989). In: An Introduction to Rheology, (vol. 3), Elsevier Ltd., London, UK, p. 1.

Chouaibi M, Mahfoudhi N, Rezig L, Donsi F, Ferrari G, Hamdi S (2012). A comparative study on physicochemical, rheological and surface tension properties of Tunisian Jujube (*Zizyphus lotus* L.) seed and vegetable oils. *Intern J Food Eng.*, 8: 11–18.

De Graef V, Goderis B, Van Puyvelde P, Foubert I, Dewettinck K (2008). Development of a rheological method to characterize palm oil crystallizing under shear. *Eur J Lipid Sci Technol.*, 110: 521–529.

Doll KM, Sharma BK, Suarez PA, Erhan SZ (2008). Comparing biofuels obtained from pyrolysis, of soybean oil or soapstock, with traditional soybean biodiesel: Density, kinematic viscosity, and surface tensions. *Energy Fuels*, 22: 2061–2066.

Fuentes de Mendoza M, De Miguel Gordillo C, Marín Expósito J, Sánchez Casas J, Vertedor D, Baltasar M (2013). Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives. *Food Chem*, 141: 2575–2581.

Jiménez-Kairuz A, Allemandi D, Manzo RH (2002). Mechanism of lidocaine release from carbomer-lidocaine hydrogels. *J Pharm Sci*, 91: 267–272.

Kim J, Kim DN, Lee SH, Yoo SH, Lee S (2010). Correlation of fatty acid composition of vegetable oils with rheological behaviour and oil uptake. *Food Chem*, 118: 398–402.

Lucero MJ, Claro C, Casas M, Jiménez-Castellanos MR (2011). Rheological and mechanical properties of hydrophilic dispersions using a new hydrophobically modified polymer and Igepal® CO520. *Carbohydr Polym.*, 86: 891-896.

Maskan M (2003). Change in colour and rheological behaviour of sunflower seed oil during frying and after adsorbent treatment of used oil. *Eur Food Res Technol.*, 218: 20–25.

Pérez-Camino MC, Cert A (1999). Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J Agric Food Chem.*, 47: 1558–1562.

Ramos Hinojosa AE, Ruiz Méndez M (2004). Orujos de dos fases almacenados en balsas. *Grasas Aceites*, 55: 251– 258.

Regulación Europea Europa (EU) N° 1348/2013 amending Regulación Europea (EEC) N° 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive residue oil and on the relevant methods of analysis. *Off. J. Eur. Union*, 2013, L338, 31–67.

Rodríguez-Rodríguez R, Herrera MD, de Sotomayor MA, Ruiz-Gutiérrez V (2009). Effects of pomace olive oil-enriched diets on endothelial function of small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr.*, 102: 1435–1444.

Sánchez-Moral P, Ruiz-Méndez MV (2006). Production of pomace olive oil. *Grasas Aceites*, 57: 47–55.

Santos JC, Santos IM, Conceição MM, Porto SL, Trindade M, Souza A, Araujo A (2004). Thermoanalytical, kinetic and rheological

parameters of commercial edible vegetable oils. *J Therm Anal Cal.*, 75: 419–428.

Schramm G (1994). In: A practical Approach to Rheology and Rheometry. vol. 1, Haake, Karlsruhe, Germany, pp. 1–291.

Valero Muñoz M, Martín Fernández B, Ballesteros S, Quintela JC, Lahera V, Las Heras N (2014). Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: Mechanisms involved. *Mol Nutr Food Res.*, 58: 376–383.

CAPÍTULO II

**INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE REFINADO SOBRE LA
COMPOSICIÓN CUANTITATIVA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS,
REOLOGÍA Y TEXTURA DEL ACEITE DE ORUJO DE OLIVA PARA
FORMULACIONES DERMATOLÓGICAS**

European Journal of Lipid Science and Technology.

In press, DOI: 10.1002/ejlt.201600408

C.A. Sánchez-Gutiérrez, M.V Ruiz-Méndez, M.R. Jiménez-

Castellanos Ballesteros and M.J. Lucero

CAPÍTULO II

II.1. INTRODUCCIÓN

La aceituna, fruto del olivo, se somete a procesos de extracción mecánica con el fin de separar los diferentes componentes que la constituyen: fruto, residuo sólido (denominado orujo), aceite de oliva virgen extra (EVOO) y agua vegetal. Desde muy antiguo, el EVOO se ha usado como producto natural en formulaciones tanto para el cuidado de la piel como en Cosmética (Draelos, 2011). Por el contrario, el aceite crudo obtenido del orujo de la oliva (OPOC) o bien se descarta o, como mucho, se usa en otros campos tecnológicos. Sin embargo, en los últimos años, el interés de este aceite ha crecido enormemente debido a que, además de poseer todos los componentes funcionales del EVOO, contiene una mayor concentración de algunos compuestos menores (Pérez-Camino y Cert, 1999).

De entre ellos cabe destacar, de mayor a menor concentración:

- Triacilgliceroles como componente principal (> 95%).
- Ácidos grasos. El oleico que es usado en formulaciones farmacéuticas y cosméticas y los ácidos linoléico y linolénico que influyen en los procesos metabólicos de la piel, promueven la formación de ceramidas (Rabionet y col., 2014) y la actividad de las vitaminas A y E (Rabasco y González, 2000).
- Ácidos triterpénicos, en particular el maslínico y el oleanólico, ya que poseen actividades antitumorales, antiinflamatorias y bactericidas (Sun y col., 2015).

CAPÍTULO II

➤ Materia insaponificable constituida por el escualeno que es usado como emoliente para mantener la piel suave y, además, tiene propiedades antioxidantes debido a su estructura isopreno (Reddy y Couvreur, 2009). Los alcoholes alifáticos reducen la liberación de varios mediadores inflamatorios (Fernández-Arche y col., 2009); y finalmente, los esteroides y alcoholes terpénicos (eritrodiool y uvaol) con efectos positivos en los procesos inflamatorios (Márquez-Martín y col., 2006).

Para obtener el aceite de orujo de oliva (OPOC) se usan procedimientos de extracción mecánicos y químicos. En el capítulo anterior de esta Tesis Doctoral (Sánchez-Gutiérrez y col., 2015) se demostró que la extracción mecánica proporcionó un mayor porcentaje de los compuestos principales (triacilglicéridos). Sin embargo, debido a la alta acidez del OPOC, éste no puede ser utilizado como materia prima en el campo farmacéutico. Esta es la razón por la que el OPOC tiene que someterse a un proceso posterior de refinado, intentando al mismo tiempo que haya las mínimas pérdidas de los compuestos bioactivos (Ruiz-Méndez y col., 2013).

Existen dos tipos de refinado: químico (Q) y físico (F), ambos con diferentes etapas. El método más común de refinación del aceite es mediante una reacción con una solución alcalina, ya que se neutralizan los ácidos grasos libres (refinado químico). Ruiz-Méndez y col. (2010) demostraron que, con los procedimientos

físicos, las pérdidas de compuestos bioactivos (ácidos triterpénicos en el OPOC) eran muy pequeñas. En el refinado físico, los aceites vegetales pueden ser neutralizados por destilación de ácidos grasos libres a altas temperaturas, bajas presiones y con corriente de vapor. Sin embargo, el refinado físico sólo se puede aplicar después de la extracción mecánica, debido a que el OPOC obtenido por extracción química tiene un alto contenido en clorofila, fosfátidos, carotenos y otros contaminantes, los cuales no se pueden eliminar por simples medios físicos (Amelotti, 1987).

II.2. OBJETIVO

En este Capítulo se ha llevado a cabo el estudio de la influencia que tienen tres procesos de refinado distintos (químico, físico clásico y físico por destilación molecular a diferentes temperaturas) sobre la composición de los compuestos bioactivos de dos tipos de aceite de orujo de oliva, uno procedente de extracción mecánica y otra de extracción química. Tras la determinación analítica de los compuestos bioactivos se llevó a cabo la selección del mejor método de refinado. Además, se realizaron los análisis reológico y de textura de los aceites obtenidos con el fin de su caracterización mecánica para uso en aplicaciones dermatológicas.

II.3. MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1. Materiales

Se utilizaron como materias primas tres aceites de orujo de oliva crudo (OPOC), de la campaña 2012-2013 (Figura II.1), y se han denominado de la siguiente manera: OPOC C, aceite de orujo de oliva obtenido por extracción química, y OPOC MA y OPOC MB, aceites de orujo de oliva obtenidos por extracción mecánica. Para su refinado, OPOC C y OPOC MA se sometieron a un proceso químico obteniendo un desodorizado, OPOD CC and OPOD MAC, respectivamente. Por otra parte, OPOC MA y OPOC MB se sometieron a un proceso de refinado físico clásico y refinado físico por destilación molecular a diferentes temperaturas, respectivamente, obteniendo los correspondientes desodorizados, OPOD MAP y OPOD MBP. Todos los procesos de refinado se llevaron a cabo a escala laboratorio.

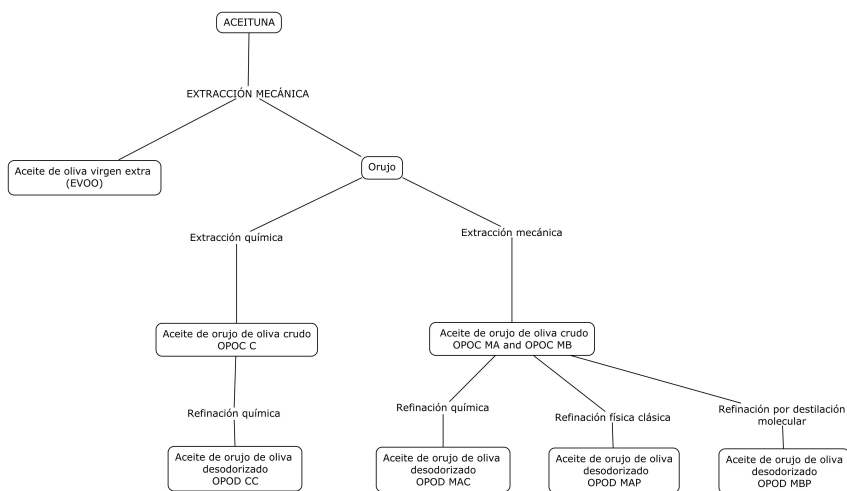


Figura II.1- Procesos de extracción y refinado del aceite de orujo de oliva obtenido del orujo.

Se utilizaron los siguientes reactivos y solventes de calidad analítica: acetona, acetonitrilo (grado HPLC), ácido acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, cloroformo, diclorometano, dietil éter, etanol, etil acetato, fenolftaleína, hexano, hidróxido potásico, hidróxido sódico, isopropil éter, metanol, metilato sódico y piridina (Panreac S.A. Barcelona, España). Hexametil disiloxano, trimetil clorosilano, y Sudán I (Sigma-Aldrich. Alemania). Filtros de dicalite (Bélgica) y Tonsil supreme 114 FF (Süd-Chemie, España).

Los compuestos estándar fueron: ácido betulínico, 5- α -cholestan-3-ol, lauril araquidato metil heptadecanoato y n-heicosanol (Sigma-Aldrich SA, USA) y escualeno (Merck, Alemania).

II.3.2. Métodos

II.3.2.1. Proceso de refinado químico

Este método de refinado se llevó a cabo siguiendo un protocolo con los pasos que se describen seguidamente:

Desgomado: Se pesó 500 g de OPOC C, o en su caso OPOC MA, en un vaso al que se añadió 0.3% en peso de aceite de ácido fosfórico. La mezcla se mantuvo en agitación durante 30 min a 25°C, con el fin de precipitar los fosfolípidos en el medio ácido.

Neutralización: Sin separar las gomas, se añadió la cantidad suficiente de NaOH (24° Be), además de un exceso del 10%. La incorporación se hizo a 40°C incrementando ésta hasta 80°C. La mezcla se mantuvo en agitación a esta temperatura durante 20

min. Seguidamente los jabones formados se separaron por centrifugación a 2500 rpm.

Winterización: Sin lavar, se añadió 5% de NaOH (4° Be) al aceite neutralizado manteniendo la temperatura a 5°C durante 18 h. Los precipitados se separaron por centrifugación.

Lavados: Con objeto de eliminar las trazas de jabón disuelto, el aceite winterizado se lavó tres veces con agua (10% p/p) durante 10 min. El agua de lavado se descartó.

Decoloración: El aceite lavado se secó al vacío (60 Torr) a 90°C durante 15 min. bajo agitación de 125 rpm. Seguidamente se añadieron 1.5% de Tonsil Supreme 114 y 0.15% de carbón activo, subiendo la temperatura hasta 110°C y manteniendo la agitación durante 10 min. La mezcla se enfrió bajo vacío y se filtró a 50°C.

Desodorización: Los aceites blanqueados se desodorizaron a 220°C durante 3 h bajo vacío (0.5-1 mbar). A continuación, se filtraron con papel de filtro y se almacenaron a -18°C hasta su análisis (OPOD CC y OPOD MAC).

II.3.2.2. Proceso de refinado físico

II.3.2.2.1. Refinado físico clásico

Los pasos de este proceso fueron los siguientes:

Desgomado: 500 g de OPOC MA se pesaron en un vaso y se añadió 0.5% del peso del aceite de ácido cítrico. La mezcla se mantuvo durante 10 min. a 80°C bajo agitación, con el fin de

precipitar los fosfolípidos en el medio ácido.

Lavados: Con el fin de eliminar las trazas de jabón disuelto, el aceite desgomado se lavó once veces con agua (10% p/p) durante 10 min a 80°C. Se descartó el agua de lavado.

Decoloración: El aceite lavado se secó bajo vacío (60 Torr) a 90°C durante 15 min con agitación a 125 rpm. Seguidamente, se añadió 1.5% de Tonsil Supreme 114, 0.1% de carbón activo, 1% de Trysil 300 y 0.1% de Dicalite, subiendo la temperatura 10°C y la agitación se mantuvo durante 10 min. Posteriormente, la mezcla se filtró.

Desodorización con neutralización: El aceite blanqueado se desodorizó a 250°C (OPOD MAP) durante 3 h a vacío (0.5-1 mbar). El gas portador fue vapor de agua que circuló a una velocidad de 6.24 ml/h. Una vez desodorizado el aceite, se filtró con papel de filtro y se almacenó a -18°C hasta su análisis.

II.3.2.2.2. Refinado por destilación molecular

Los pasos de este proceso fueron los siguientes:

Decoloración: se siguió el mismo procedimiento que en el proceso de refinado físico clásico.

Destilación molecular: el proceso de desodorización se llevó a cabo en un dispositivo Short-Path (mod. KDL5, UIC Gmb, Alemania). Las condiciones operatorias se fijaron como sigue: flujo de alimentación 1.44 l/h, velocidad de rotación de los rodillos 250

CAPÍTULO II

rpm, temperatura del condensador 50°C, vacío de 0.001 mbar. Los aceites desodorizados se obtuvieron a distintas temperaturas: 140°C (OPOD140 MBP), 165°C (OPOD165 MBP), 190°C (OPOD190 MBP) y 215°C (OPOD215 MBP).



Figura II.2.- Dispositivo Short-Path (mod. KDL5) perteneciente al Instituto de la Grasa. CSIC

II.3.2.3. Determinación analítica de los compuestos bioactivos

La determinación analítica de los compuestos bioactivos se realizó en los aceites de orujo de oliva crudos (OPOC C, OPOC MA y OPOC MB), así como en los aceites desodorizados obtenidos en los diferentes procesos de refinado (OPOD CC, OPOD MAC, OPOD MAP y diferentes OPOD MBP).

La acidez, la composición de ácidos grasos, el contenido de ceras, el escualeno y los alquil ésteres se determinaron por los métodos indicados en la Comunidad Económica Europea (EEC Regulación Europea N^o 2568/91).

El contenido de materia insaponificable se extrajo y cuantificó después de la saponificación del aceite con KOH/EtOH, siguiendo el método estándar español (UNE 55004). De estos extractos, los contenidos y composición de esteroides y alcoholes alifáticos se midieron de acuerdo a los métodos estándares propuestos (EEC Regulación Europea Nº 2568/91), usando 5- α -cholestan-3-ol y n-heneicosanol como patrones internos, respectivamente.

El contenido de ácidos triterpénicos se obtuvo siguiendo el método propuesto por Pérez-Camino y Cert (1999), consistente básicamente en el aislamiento de la fracción de los ácidos grasos mediante las columnas SPE-NH₂, obtención de derivados silanizados de los extractos y cuantificación por cromatografía de gases (Mod. 7890A, Agilent Technologies), usando ácido betulínico como estándar interno.

II.3.2.4. Caracterización reológica

Los ensayos reológicos se realizaron mediante un reómetro de estrés controlado (AR-2000, TA Instruments, New Castle, USA) y un sensor con geometría plana de 60 mm de diámetro y superficie lisa. La temperatura del ensayo se mantuvo constante mediante una placa Peltier (25 \pm 0.1°C). Los distintos OPOD se sometieron a un protocolo experimental que se inició con el estudio en cizalla oscilatoria dinámica. En primer lugar, se determinó la región viscoelástica lineal a través de los barridos de estrés oscilatorio a 1

CAPÍTULO II

Hz de frecuencia y con un porcentaje de tolerancia del 1% y tiempo máximo de adquisición de datos de 120 s. Así se determinó un estrés oscilatorio, dentro de la zona *plateau*, y el estrés crítico (t_c) por encima del cual se pierden las condiciones no destructivas y, por tanto, la muestra se deforma reológicamente. A continuación, se llevó a cabo un barrido de frecuencia, al esfuerzo oscilatorio seleccionado, en el rango de 0.01 a 628.3 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. El análisis de los resultados se basó en el perfil de las componentes elástica (G') y viscosa (G''), también llamadas módulos de almacenamiento y de pérdida, respectivamente.

Por otra parte, se realizaron los ensayos en cizalla rotaciones para obtener las curvas de flujo y/o de viscosidad y así poder identificar y cuantificar el comportamiento de flujo de los aceites.

En todos los casos, cada medida se realizó por triplicado, dando su validez cuando las curvas eran superponibles.

Para analizar los resultados reológicos se usaron diferentes modelos teóricos que relacionan el estrés de cizalla (τ) con la velocidad de cizalla ($\dot{\gamma}$) o la viscosidad (η) con la velocidad de cizalla ($\dot{\gamma}$). El menor error estándar se usó para la aplicabilidad de los modelos reológicos teóricos. En nuestro caso, se aplicó el modelo de Power Law (también llamado método de Ostwald-de Waele) (Ecuación II.1).

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación II.1}$$

Este modelo relaciona el estrés de cizalla (τ) con la velocidad de

cizalla (γ), donde K y n son los índices de consistencia y de flujo, respectivamente. Dependiendo del valor de n, se determinaron los tipos de flujo. Cuando $n = 1$ se trata de fluidos Newtonianos, y si $n \neq 1$ son fluidos no-Newtonianos. Así, si $n < 1$ se trata de flujo pseudoplástico y plástico (*shear-thinning*) y si $n > 1$ el flujo es dilatante (*shear-thickening*).

II.3.2.5. Análisis del perfil de textura (TPA)

La norma ISO 5492 (2010) define la textura como “una técnica instrumental que estudia el conjunto de propiedades reológicas y estructurales del producto percibidas por receptores mecano, de toque y en algunos casos visuales y auditivos”.

Actualmente, se considera que la textura es una importante propiedad de un producto ya que afecta a su manejo y determina la vida útil, así como la aceptación por parte de los consumidores y/o de los pacientes.

La extensibilidad, en términos pragmáticos, es la facilidad con la que un producto puede ser extendido en una capa delgada y uniforme sobre una superficie.

La firmeza puede ser medida como la fuerza requerida para obtener una deformación dada.

Aunque la extensibilidad es también una deformación bajo una carga externa, es una propiedad más dinámica que la firmeza. Las medidas de firmeza y capacidad para la extensibilidad están

CAPÍTULO II

bastante correlacionadas, pero esta relación no es normalmente perfecta.

Las propiedades de textura de los diferentes aceites, OPOCs y OPODs, se determinaron en un analizador de textura TA.XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, Reino Unido), controlado mediante un software, y con una sonda cónica (HDP/SR, Stable Micro Systems) con su receptor complementario. De esta manera se pudo medir la facilidad con la cual un producto puede ser aplicado en una capa delgada y uniforme. El texturómetro aplicó una compresión uniaxial, con una célula de carga de 5 kg, a través de la sonda para deformar 8 ± 0.1 g de cada uno de los aceites que contenía el receptor de la misma. Durante el ensayo, la fuerza se incrementaba hasta el punto de máxima profundidad que es cuando la sonda penetra completamente en su receptor. El valor de la fuerza máxima (F_{max}) se tomó como el valor de la firmeza. Cuanto más firme es la muestra mayor será el área bajo la curva positiva, la cual representa la cohesividad o fuerzas requeridas para realizar el proceso de ruptura de los enlaces generados en el interior de los aceites. Por su parte, las propiedades de adhesividad de los aceites se determinaron durante el movimiento de retirada de la sonda, cuantificándose por el área bajo la curva negativa (Aname, 2016).

II.4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

II.4.1. Caracterización química de OPOCs y OPODs obtenidos por los procesos de refinado químico y físico.

Como se mencionó anteriormente, los OPOCs fueron refinados para eliminar los componentes secundarios no deseados de los aceites, al tiempo que se pretendió causar las mínimas pérdidas de los compuestos bioactivos (Ruiz-Méndez y col., 2013). La Tabla II.1 muestra los resultados de las determinaciones analíticas de los aceites de orujo crudos obtenidos por las extracciones química (OPOC C) y mecánica (OPOC MA) y de los aceites de orujo desodorizados obtenidos por el proceso de refinado químico (OPOD CC y OPOD MAC). La Tabla II. 2 incluye los resultados correspondientes para los aceites de orujo obtenidos por extracción mecánica (OPOC MA y OPOC MB) y para los aceites desodorizados obtenidos por el proceso de refinado físico (OPOD MAP y OPOD MBP).

Acidez y ácidos triterpénicos. En relación con la acidez, se pudieron apreciar dos aspectos importantes. En primer lugar, se observó que el aceite obtenido por extracción mecánica (OPOC MA y OPOC MB) tuvo menor acidez que el obtenido por extracción química (OPOC C). Por lo tanto, parece ser que el proceso de centrifugación fue más adecuado que el proceso de extracción con disolvente. Esto se puede atribuir a dos causas: la extracción es secuencial, por tanto, por centrifugación se obtiene el aceite que

CAPÍTULO II

está suelto en la masa, compuesto en su mayoría por triacilgliceroles. A continuación el aceite retenido en la masa se extrae con disolvente. Para ello se requiere un secado preliminar bajo condiciones drásticas, produciendo reacciones de oxidación e hidrólisis y provocando así el incremento de los ácidos grasos libres. Por lo que el aceite residual extractado, presenta además más compuestos minoritarios y de degradación.

En segundo lugar, se apreció que la temperatura del proceso de refinado influyó de forma importante en la acidez. Así, se observó que al usar altas temperaturas, como en el caso del refinado químico (220°C) y el refinado físico clásico (250°C), la acidez disminuyó considerablemente frente a las temperaturas seleccionadas en el refinado por destilación molecular.

Sin embargo, estas altas temperaturas tuvieron, además, un impacto significativo en la concentración de compuestos bioactivos. Así, en el caso del refinado químico, los ácidos grasos libres y los ácidos triterpénicos se eliminaron por saponificación y la acidez se redujo por debajo de <0,1%, pese a que la calidad del aceite se degradó, debido a la desaparición de los ácidos triterpénicos. Un comportamiento similar se observó en el caso del refinado físico clásico (Tabla II.2). Por el contrario, los aceites que se sometieron a la destilación molecular tuvieron menor pérdida de acidez, pero retuvieron una mayor cantidad de compuestos bioactivos antiinflamatorios (ácidos triterpénicos) (Tabla II.2).

Tabla II.1.- Determinaciones analíticas de los aceite de orujo crudos obtenidos por extracciones química (OPOC C) o mecánica (OPOC MA) y de los aceites desodorizados obtenidos por el proceso de refinado químico (OPOD CC y OPOD MAC)

	Extracción mecánica y refinación física clásica		Extracción mecánica y refinación por destilación molecular				
	OPOC MA	OPOD MAP	OPOC MB	OPOD140 MBP	OPOD165 MBP	OPOD190 MBP	OPOD215 MBP
Acidez (%)	6.89	0.12	11.76	17.00	6.30	2.75	2.15
Ácidos triterpénicos (mg/Kg)	11141	49	38300	8275	7619	9856	8458
Ácido oleanólico	5027	29	12400	4681	4450	5450	4310
Ácido maslínico	6114	20	25900	3594	3169	4406	4148
Esteres alquílicos (%)	1.21	0.00	2.67	1.60	0.18	0.03	0.02
Ceras (mg/kg)	1798	2374	4633	7782	8806	8827	8866
Fracción insaponificable (%)	2.14	0.85	3.57	3.37	3.05	2.80	2.35
Escualeno (mg/kg)	6175	232	4516	2355	2061	310	85
Alcoholes alifáticos (mg/kg)	5263	2220	6595	6546	7690	5465	6954
Esteroles (mg/kg)	3406	2646	3979	3851	4284	4131	4359
• Colesterol (%)	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.20
• Campesterol	3,20	3,18	3.07	4.03	4.67	4.73	4.67
• Estigmasterol	1,29	2,01	1.43	1.39	1.36	1.26	1.25
• Clerosterol	1.42	1.83	1.34	1.50	1.41	1.22	1.95
• β -Sitosterol	88.04	87.47	88.49	87.71	87.90	88.03	86.62
• Sitostenol	2.36	2.34	2.05	2.04	1.90	2.01	2.46
• 5-Avenasterol	0.43	0.33	0.39	0.40	0.19	0.20	0.31
• 5,24-Estigmastadienol	2.18	2.02	2.12	2.08	1.75	1.78	2.02
• Δ -7-Estigmastenol	0.46	0.29	0.38	0.45	0.41	0.39	0.39
• Δ -7-Avenasterol	0.37	0.27	0.28	0.17	0.18	0.16	0.15
Alcoholes triterpénicos (mg/kg)	582	238	435	838	1221	1298	1393

CAPÍTULO II

El hecho de que la acidez no haya disminuido tanto pudo atribuirse a que no se introdujo una corriente de vapor en el destilador molecular para eliminar los ácidos grasos libres.

Tabla II.2.- Determinaciones analíticas de los aceites de orujo crudos obtenidos por extracción mecánica (OPOC MA y OPOC MB) y de los aceites desodorizados obtenidos por el proceso de refinado físico (OPOD MAP y OPOD MBP).

	Extracción química y refinación química		Extracción mecánica y refinación química	
	OPOC C	OPOD CC	OPOC MA	OPOD MAC
Acidez (%)	20.70	0.08	6,89	0,075
Ácidos triterpénicos (mg/Kg)	5121		11171	
Ácido oleanólico	4342	0	5027	0
Ácido maslínico	779	0	6114	0
Esteres alquílicos (%)	3.69	0.02	1,21	0,42
Ceras (mg/kg)	3510	5172	1798	2348
Fracción insaponificable (%)	2.64	2.43	2,14	1,51
Escualeno (mg/kg)	5048	3747	6175	4567
Alcoholes alifáticos (mg/kg)	5784	4744	5263	3081
Esteroles (mg/kg)	5435	3065	3406	2252
• Colesterol (%)	0.24	0.24	0.24	0,24
• Campesterol	3.20	3.54	3,20	2,81
• Stigmasterol	1.23	1.59	1,29	0,86
• Clerosterol	0.94	1.34	1.42	1,79
• β-Sitosterol	87.71	84.48	88.04	88.11
• Sitostenol	1.26	2.17	2.36	2,97
• 5-Avenasterol	3.98	3.60	0.43	0.38
• 5,24-Estigmastadienol	0.83	1.94	2.18	2.06
• Δ-7-Estigmastenol	0.38	0.89	0.46	0,45
• Δ-7-Avenasterol	0.23	0.21	0,37	0,33
Alcoholes triterpénicos (mg/kg)	568	511	582	376

Esteres alquílicos. Como se muestra en las Tablas II.1 y II.2, las concentraciones de ésteres alquílicos en todos los procesos de refinado disminuyeron. Sin embargo, hay que señalar que éstos son compuestos no bioactivos que aparecen debido a la fermentación de la materia vegetal en los tanques durante el almacenamiento del aceite de orujo de oliva (Ruiz-Méndez y Ramos Hinojosa, 2003). Coincidiendo con lo ya reseñado por Yuan y col. (2005), el aumento de la temperatura del proceso de refinado provocó una disminución de los ésteres de alquilo. Los aceites sometidos a la destilación molecular mostraron bajas concentraciones de estos componentes, debido a que son volátiles a temperaturas $> 165^{\circ}\text{C}$.

Ceras. En general, la presencia de ésteres de cadena larga, como es el caso de las ceras, en aceites vegetales se utiliza para determinar la pureza y la clasificación de los distintos grados del aceite de oliva (Regulación Europea (EU) Nº 1348/2013). Como se puede apreciar en las Tablas II.1 y II.2, el contenido de ceras aumentó durante los procesos de refinado químico y físico. De acuerdo con Tubaileh y col. (2002), esto puede ser debido a reacciones de esterificación entre ácidos grasos libres y alcoholes alifáticos presentes en el aceite a las temperaturas de la desodorización. Así, cuando esta temperatura aumentó, el contenido de ceras se incrementó, como se observa a partir de los aceites obtenidos por destilación molecular.

Materia insaponificable. Está compuesta por mezcla compleja

CAPÍTULO II

de sustancias distintas de los glicéridos. Sus principales compuestos bioactivos del aceite de orujo de oliva son: el escualeno, los esteroides y los alcoholes triterpénicos, eritrodiol y uvaol (Márquez-Martín y col., 2006). Como se muestra en las Tablas II.1 y II.2, el porcentaje de materia insaponificable disminuyó con el proceso de refinado. Esto podría atribuirse principalmente a la eliminación del escualeno por destilación en la desodorización. Sin embargo, en la destilación molecular, se recogió una concentración significativa de escualeno en algunos destilados de desodorización (OPOD140 MBP a OPOD215 MBP). Una posibilidad es, como indican Bondioli y col. (1993), agregar escualeno a nuestro aceite, enriqueciendo la concentración de este compuesto bioactivo.

Las Tablas II.1 y II.2 informan de las diferentes concentraciones obtenidas de los esteroides característicos del aceite de orujo de oliva. De acuerdo con Verleyen y col. (2002), la eliminación parcial de esteroides durante el proceso de refinado depende en gran medida de las condiciones aplicadas en las diversas etapas del proceso. Así, con el refinado químico y refinado físico clásico, la concentración de estos compuestos bioactivos disminuyó (40% y 20%, respectivamente); por el contrario, aumentó ligeramente en la destilación molecular. Un comportamiento similar puede observarse con los alcoholes triterpénicos.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, los procesos de refinado físico, especialmente la destilación molecular,

contribuyen a un mejor rendimiento de los compuestos bioactivos estudiados, los cuales pueden usarse en formulaciones dermatológicas por sus actividades terapéuticas. Además, de todos los aceites obtenidos por destilación molecular, se eligió OPOD190 MBP por ser el único que mostró simultáneamente baja acidez y menor pérdida de compuestos bioactivos. Por ello, se consideró oportuno comparar los resultados de composición de bioactivos obtenidos para OPOD190 MBP por destilación molecular respecto a los correspondientes del EVOO, al ser, como ya indicamos, una materia prima ampliamente utilizada en formulaciones dermatológicas.

Se aprecia en la Tabla II.3, que aunque OPOD190 MBP mostró mayor acidez que EVOO, sigue siendo adecuada para su uso dermofarmacéutico ya que, tras realizar un análisis de varios aceites cosméticos comercializados (por ejemplo: aceite de almendras dulces de Marnys® o aceite de almendras dulces de Acofarma®), se comprobó que la acidez de esos aceites estuvo entorno al 2%. En definitiva, se confirmó que nuestro aceite de orujo de oliva, objeto de estudio, contenía mayores cantidades de todos los compuestos bioactivos que el EVOO, excepto en el caso del escualeno.

Tabla II.3.- Estudio comparativo de la composición del aceite de orujo de oliva obtenido por extracción mecánica y destilación molecular (OPOD190 MBP) respecto al aceite de oliva virgen extra (EVOO).

	OPOD190 MBP	EVOO
Acidez (%)	2.75	< 0.8
Ácidos triterpénicos (mg/Kg)	9856	90 - 190
Ácido oleanólico	5450	30-80
Ácido maslínico	4406	60 - 110
Esteres alquílicos (%)	0.03	-
Ceras (mg/kg)	8827	< 250
Fracción insaponificable (%)	2.80	0.4 – 2
Escualeno (mg/kg)	310	9000
Alcoholes alifáticos (mg/kg)	5465	350
Esteroles (mg/kg)	4131	1500
Alcoholes triterpénicos (mg/kg)	1298	< 100

II.4.2. Caracterización reológica

La Figura II.3 muestra la caracterización reológica de los aceites tras extracción química y mecánica (OPOC C y OPOC MA), así como tras su refinado químico (OPOD CC y OPOD MAC). La Figura II.3A recoge el barrido de frecuencia oscilatoria para el estudio de la viscoelasticidad. En todos los casos se observó que G' y G'' dependen de la frecuencia aplicada. Además, existe un predominio de la componente viscosa en todos los OPOC y OPOD. Es de destacar que G' sólo fue estable a frecuencias inferiores a 5-10

rad.s⁻¹, indicando la poca influencia de la componente elástica en el comportamiento viscoelástico. Al mismo tiempo, se observó una separación importante entre los perfiles entre G'' y G' , lo que corrobora el gran predominio del comportamiento viscoso. Solamente OPOD CC evidencia poca diferencia entre las dos componentes (G'' y G'), que incluso se invirtieron a frecuencias inferiores a 0.1 rad.s⁻¹, lo que indica que G' tiene mayor repercusión en la estructura interna de este aceite.

La Figura II.3B recoge las curvas de flujo de OPOC C, OPOC MA, OPOD CC y OPOD MAC. Todos los aceites se comportan como fluidos no-Newtonianos con flujo pseudoplásticos (*shear-thinning*).

Por su parte, la Figura II.4 compara el comportamiento reológico de los aceites obtenidos por refinado químico respecto de los obtenidos por refinado físico clásico (OPOD MAC y OPOD MAP). Para todos los aceites, la componente viscosa (G'') aumentó con la frecuencia aplicada (Figura II.4A). Por lo tanto, OPOD MAC y OPOD MAP fueron fluidos viscoelásticos con predominio de la componente viscosa, similar al OPOC MA. Además, se aprecia que OPOD MAP mostró valores progresivamente más bajos de G' respecto a OPOD MAC.

El comportamiento de fluidez se puede observar en la Figura II.4B, la cual recoge a través de las curvas de flujo que todos los aceites son fluidos no-Newtonianos con flujo pseudoplástico.

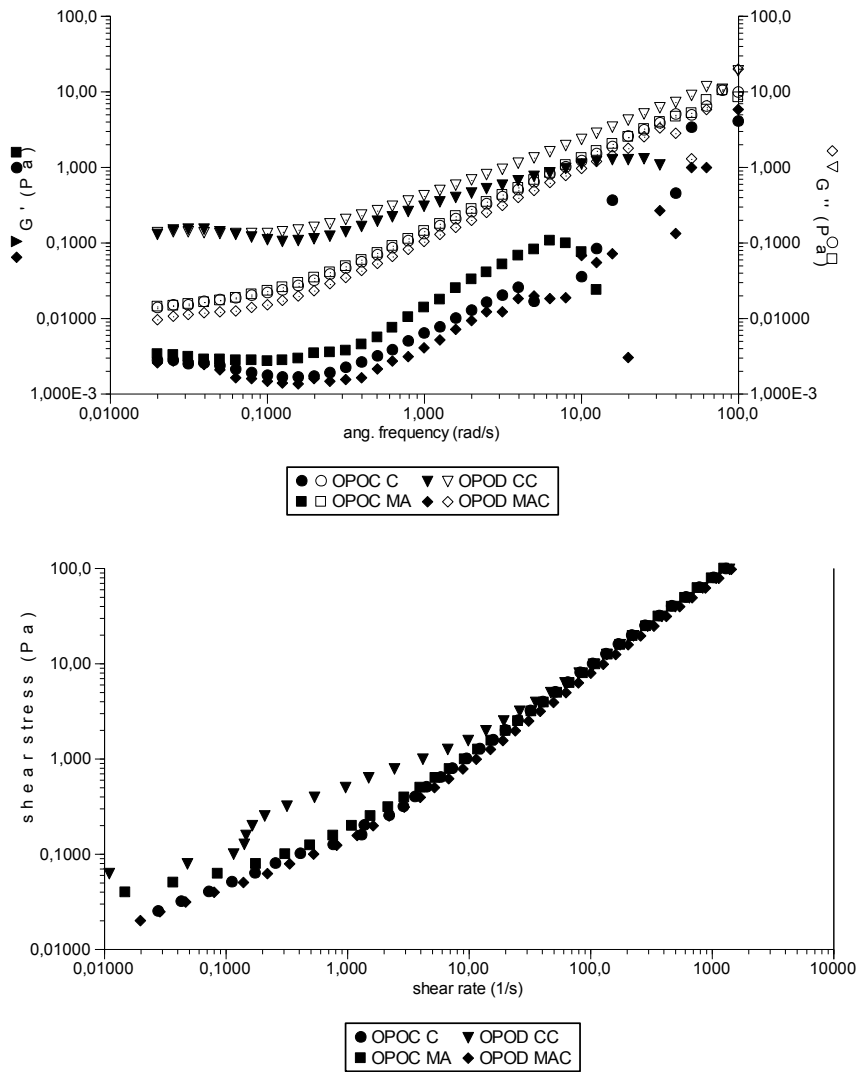


Figura II.3.- Caracterización reológica de los aceites de orujo de oliva obtenidos por extracción mecánica (OPOC C y OPOC MA) y refinación química (OPOD CC y OPOD MAC). A) Barrido de frecuencia oscilatoria. B) Curvas de flujo.

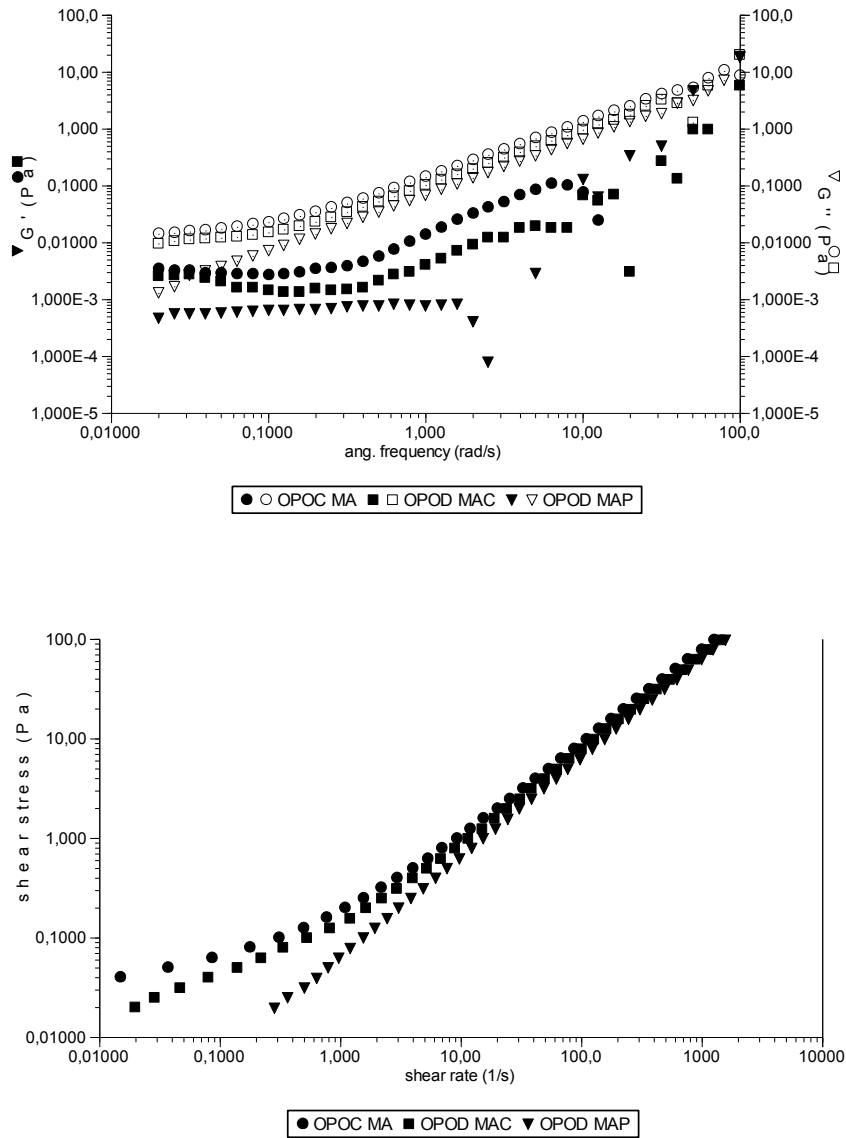


Figura II.4.- Caracterización reológica de los aceites de orujo de oliva obtenidos por extracción mecánica (OPOC MA) y por refinados químico y físico clásico (OPOD MAC y OPOD MAP). A) Barrido de frecuencia oscilatorio. B) Curvas de flujo.

CAPÍTULO II

La Figura II.5 recoge la comparación en el comportamiento reológico de los dos procesos de refinado físicos: clásico (OPOD MAP) y por destilación molecular (OPOD MBP). De nuevo, todos los aceites se comportaron como fluidos viscoelásticos con predominio de la componente viscosa, similar a los aceites de orujo de oliva crudos. No obstante, se observó que las fracciones sometidas a temperaturas por encima de 145°C en el proceso de refinado por destilación molecular (OPOD165 MBP, OPOD190 MBP y OPOD215 MBP) tuvieron valores progresivamente más bajos de G' , por lo que perdieron su capacidad elástica (Figura II.5A).

De nuevo, todos los aceites estudiados tuvieron un comportamiento de flujo no-Newtoniano y pseudoplástico (Figura II.5B).

Las curvas de flujo se ajustaron a diferentes modelos reológicos teóricos, siendo el mejor ajuste al modelo Power Law. La Tabla II.4 registra todos los parámetros obtenidos. Los resultados confirmaron que todos los aceites estudiados se comportaron como fluidos no-Newtonianos con un flujo pseudoplástico (*shear-thinning*) al ser $n < 1$. Sin embargo, los valores del índice de flujo cercanos a 1, indican que se podrían considerar fluidos casi Newtonianos.

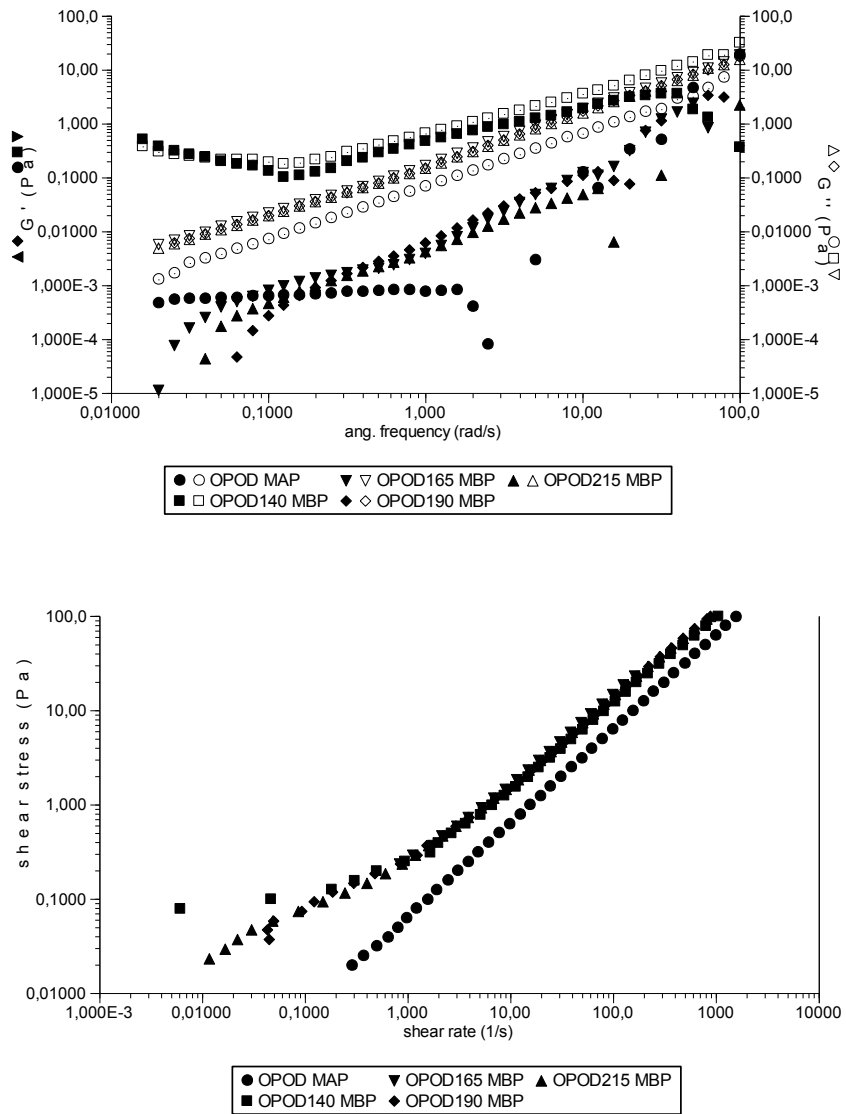


Figura II.5.- Caracterización reológica de los aceites de orujo de oliva desodorizados obtenidos por procesos de refinado físico clásico (OPOD MAP) y por destilación molecular (OPOD MBP). A) Barrido de frecuencia oscilatoria. B) Curvas de flujo.

CAPÍTULO II

Tabla II.4.- Parámetros obtenidos con el modelo Power Law para los aceites de orujo de oliva crudo y desodorizados estudiados (K , índice de consistencia; n , índice de flujo, SE , error estándar).

	K (Pa·s)	n	SE
Refinación química			
OPOC C	0.151	0.904	1.967
OPOD CC	0.158	0.889	2.414
OPOC MA	0.127	0.933	1.367
OPOD MAC	0.126	0.940	1.295
Refinación física			
OPOC MA	0.127	0.933	1.367
OPOD MAP	0.070	0.986	1.238
OPOC MB	0.298	0.849	2.220
OPOD140 MBP	0.211	0.886	2.704
OPOD165 MBP	0.186	0.954	3.357
OPOD190 MBP	0.227	0.899	4.510
OPOD215 MBP	0.257	0.880	4.150

Todos los valores del índice de consistencia (K) señalaron que la viscosidad de los aceites estudiados es muy pequeña y que el proceso de refinado químico no afectó a las características de flujo (OPOD CC con respecto a OPOC C y OPOD MAC con respecto a OPOC MA). Por tanto el proceso de extracción es el responsable de los resultados obtenidos para OPOD CC y OPOD MAC. Así, la extracción mecánica causó una pérdida de viscosidad, mientras que la extracción química promovió un aumento de la misma. De acuerdo con Cedeño González y col. (1999) esto podría estar relacionado con la acidez de los aceites. Así, se pudo apreciar que OPOC MA, con menor acidez, mostró una viscosidad más pequeña.

Por el contrario, OPOC C, aceite con la mayor acidez (obtenida por extracción con disolvente), presentó la viscosidad más elevada.

En relación con el proceso de refinado físico clásico, OPOD MAP revela menor viscosidad que OPOC MA, aunque ambos son fluidos casi Newtonianos. Además, mientras los valores del índice de consistencia fueron menores para las muestras obtenidas por refinado físico que para el aceite de orujo de oliva crudo, el proceso químico parece no modificar este parámetro.

Finalmente, el proceso de refinado por destilación molecular (OPOD MBP) afectó sólo ligeramente los valores del índice de consistencia, siendo en general mayores.

II.4.3. Análisis de los perfiles de textura (TPA)

La determinación de los parámetros de textura de los aceites indicó cuales eran sus propiedades mecánicas y sensoriales durante las etapas de manipulación por parte del consumidor, por ejemplo: capacidad de extensibilidad, cohesividad y adhesividad.

La firmeza se relaciona con la máxima fuerza positiva requerida para alcanzar una deformación dada. La cohesividad y la adhesividad corresponden a las áreas bajo la curva obtenida en la compresión y extracción de la sonda, respectivamente. Mientras, la cohesividad se relaciona con las fuerzas necesarias para romper los enlaces físicos/químicos establecidos entre las sustancias que componen cada aceite, la adhesividad indica las fuerzas requeridas

CAPÍTULO II

para separar el aceite de las paredes del recipiente que lo contiene.

Los resultados de TPA (Tabla II.5) indicaron que los procesos de refinado influyen en estos parámetros. Así y tras el proceso de refinado químico para obtener los aceites desodorizados (OPOD CC y OPOD MAC) se obtuvieron valores similares. La comparación entre los procesos de refinados químico y físico clásico, OPOD MAC y MAP OPOD, evidenció unos valores más bajos en todos los parámetros, lo que indicó la mayor influencia del refinado físico clásico. En el caso de la destilación molecular y teniendo en cuenta todas las temperaturas, los cambios en los valores de textura son menos marcados que en el caso del refinado físico clásico.

En resumen, OPOD CC y OPOD MAC se caracterizaron por una baja firmeza y cohesividad, lo que indicó que son fluidos y de alta capacidad de extensibilidad. Al mismo tiempo, tuvieron poca adhesividad lo que presupone que se retirarán de la piel fácilmente si no se hace un buen masaje sobre ella para que penetren. OPOD MAP presenta las mismas características de textura. Por su parte, la destilación molecular proporciona una batería de OPOD con características óptimas de textura respecto a la fluidez y capacidad de extensibilidad, lo que de nuevo presupone que se retirarán de la piel fácilmente si no se hace un buen masaje sobre ella para que penetren.

Tabla II.5.- Parámetros obtenidos en el análisis del perfil de textura (TPA) de los aceites de orujo de oliva crudos y desodorizados estudiados.

	Firmeza (N)	Cohesividad (N.s)	Adhesividad (N.s)
Refinación química			
OPOC C	0.28	0.22	0.04
OPOD CC	0.29	0.28	0.07
OPOC MA	0.42	0.26	0.05
OPOD MAC	0.30	0.24	0.04
Refinación física			
OPOC MA	0.42	0.26	0.05
OPOD MAP	0.17	0.16	0.01
OPOC MB	0.71	0.37	0.16
OPOD140 MBP	0.54	0.34	0.13
OPOD165 MBP	0.36	0.26	0.07
OPOD190 MBP	0.43	0.30	0.09
OPOD215 MBP	0.54	0.32	0.12

II.5. CONCLUSIONES

La temperatura y, en general, las condiciones de trabajo de los procesos de refinado tuvieron efectos importantes sobre el contenido de los compuestos bioactivos. Los procesos de refinado físico, especialmente la destilación molecular, contribuyeron a un mejor rendimiento en estos compuestos. Además, de todos los aceites obtenidos por destilación molecular, se eligió OPOD190 MBP por ser el único que tuvo simultáneamente baja acidez y menor pérdida de compuestos bioactivos. Sin embargo, este aceite

CAPÍTULO II

mostró mayor acidez que el aceite de oliva virgen extra, aunque también mayores cantidades de todos los compuestos bioactivos, excepto del escualeno.

Después del proceso de refinado, los aceites de orujo de oliva se ajustaron mejor al modelo reológico de Power Law. La pérdida de plasticidad puede ser justificada debido a la eliminación de los componentes menores durante el proceso. En el OPOC sometido a refinado por destilación molecular, la viscosidad disminuyó con el aumento de la temperatura de desodorización y con la reducción en la cantidad de ácidos grasos libres, afectando así, a la naturaleza de las muestras. Los parámetros de firmeza, cohesividad y adhesividad del análisis del perfil de textura evidenciaron que, en general, todos los OPODs tienen alta fluidez y extensibilidad, pero una baja adhesividad.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la destilación molecular fue el mejor proceso de refinado. Sin embargo, es necesario mejorar las condiciones de trabajo con el fin de reducir la acidez y lograr menores pérdidas, si es posible, de compuestos bioactivos. Por tanto, se deben realizar otros estudios modificando las condiciones de trabajo de la destilación molecular y utilizando otros nuevos procesos de refinación física.

II.6. REFERENCIAS

Amelotti G (1987). Effects of the interesterification for physical refining of some olive oils. *Riv Ital Sostanze Grasse*, 64: 223-226.

Aname Instrumentación Científica. <http:// analisisdetextura.blogspot.com.es/search/label/An%C3%A1lisis%20de%20Textura>. (Consultado en mayo 2016).

Bondioli P, Mariani C, Lanzani A, Fedeli E, Muller A (1993). Squalene recovery from olive oil deodorizer distillates. *J Am Oil Chem Soc.*, 70: 763-766.

Cedeño González FO, Prieto González MM, Bada Gancedo JC, Alonso Suárez R (1999). Estudio de la densidad y de la viscosidad de algunos ácidos grasos puros. *Grasas Aceites*, 50: 359-368.

Draeos ZD (2011). *Cosmetic dermatology: products and procedures* John Wiley and Sons, Oxford.

Fernández-Arche A, Márquez-Martín A, de la Puerta Vázquez R, Perona J, Terencio C, Pérez-Camino C, Ruiz-Gutiérrez V (2009). Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *J Nutr Biochem.*, 20: 155-162.

Márquez-Martín A, De la Puerta R, Fernández-Arche A, Ruiz-Gutiérrez V, Yaqoob P (2006). Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil human mononuclear cells. *Cytokine*, 36: 211-217.

Pérez-Camino MC, Cert A (1999). Quantitative determination of

hydroxypentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J Agric Food Chem*, 47: 1558-1562.

Rabasco A, González M (2000). Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas Aceites*, 51: 74-96.

Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R (2014). Ceramide synthesis in the epidermis. *BBA-Mol Cell Biol L*, 1841: 422-434.

Reddy LH, Couvreur P (2009). Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Adv Drug Deliver Rev*, 61: 1412-1426.

Regulation Europee (EU) Nº 1348/2013 amending Regulation Europee (EEC) Nº 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Off J Eur Union.*, L 338, 31-67.

Ruiz-Méndez MV, Aguirre-González MR, Marmesat S (2013). Olive Oil Refining Process. In: Aparicio, R., Harwood, J. (Eds.), *Handbook of Olive Oil*. Springer US, pp. 715-738.

Ruiz-Méndez MV, Ramos Hinojosa AE (2003). Fatty acid esters with short chain alcohols in two phase olive pomace oils. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 105: 346-350.

Ruiz-Méndez MV, Dobarganes MC, Sánchez Moral P (2010). Edible olive pomace oil concentrated in triterpenic acids, procedure of physical refining utilized for obtainment thereof and recovery of functional components present in the crude oil. Patent ES 2332977 (A1).

Sánchez-Gutiérrez CA, Casas M, Lucero MJ, Ruiz-Méndez MV (2015). Physico-chemical and rheological characterization of olive-pomace oils. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 117: 87-91.

Standard Method UNE 55004 (2001). Quantitative determination of unsaponifiable matter. AENOR (Asociación Española de Normalización y Racionalización). Madrid.

Sun M, Tang Y, Ding T, Liu M, Wang X (2015). Investigation of cytochrome P450 inhibitory properties of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L., and its structure activity relationship. *Phytomed.*, 22: 56-65.

Tubaileh RM, Garrido-Fernández A, Ruiz Méndez MV, León-Camacho M, Graciani-Constante E (2002). Effects of deodorization/physical refining variables in wax and fatty alcohols content of refined olive oil. *J Am Oil Chem Soc.*, 79: 67-71.

UNE-EN ISO 5492 (2010). Análisis sensorial. Vocabulario. (ISO 5492:2008). AENOR. (Asociación Española de Normalización y Racionalización). Madrid.

Verleyen T, Sosinska U, Verhé R, Dewettinck K, Huyghebaert A, De Greyt W (2002). Influence of the vegetable oil refining process on free and esterified sterols. *J Am Oil Chem Soc.*, 79: 947-953.

Yuan W, Hansen AC, Zhang Q (2005). Vapor pressure and normal boiling point predictions for pure methyl esters and biodiesel fuels. *Fuel.*, 84: 943-950.

CAPÍTULO III

**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE LOS PROCESOS DE
REFINADO FÍSICO PARA EL ENRIQUECIMIENTO DE LOS
COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL ACEITE DE ORUJO DE OLIVA.**

CAPÍTULO III

CAPÍTULO IV

**ACEITE DE ORUJO DE OLIVA. UNA NUEVA MATERIA PRIMA
PARA EL DISEÑO Y DESARROLLO DE FORMULACIONES
DERMATOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
INFLAMATORIAS CRÓNICAS DE LA PIEL**

CAPÍTULO IV

CONCLUSIÓN FINAL

CONCLUSIÓN FINAL

En base a todos los estudios realizados se puede concluir que, desde el punto de vista tecnológico, las formulaciones que contienen los aceites de orujo de oliva como base (obtenidos por destilación molecular o por destilación en película descendente) han mostrado resultados *in vitro* similares. Sin embargo, se seleccionó el aceite obtenido por destilación en película descendente, en base a que se ha demostrado que posee mayor cantidad de los compuestos bioactivos, lo que implicaría una mayor eficacia terapéutica para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias crónicas de la piel.

Se proponen, para futuros estudios *in vivo*, las formulaciones en aceite seco (O OPOD FF) y en emulsión O/A (E OPOD FF) que han mostrado diferentes perfiles de liberación de los compuestos bioactivos, con el fin de evaluar su efecto dermatológico.

ANEXO

**PHYSICO-CHEMICAL AND RHEOLOGICAL
CHARACTERIZATION OF OLIVE-POMACE OILS**

European Journal of Lipid Science and Technology.

2015, 117: 87-91

C.A. Sánchez-Gutiérrez, M. Casas, M.J. Lucero and

M.V. Ruiz-Méndez

Research Article

Physico-chemical and rheological characterization of olive-pomace oils

Carla Andrea Sánchez-Gutiérrez¹, Marta Casas², M. Jesús Lucero² and M. Victoria Ruiz-Méndez¹¹ Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Seville, Spain² Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, University of Seville, Seville, Spain

In this paper the characteristics and rheological behavior of crude olive-pomace oil extracted by mechanical and chemical means throughout one harvest period have been studied. Oils were turbid at 25°C and behaved as non-Newtonian fluids. While the mechanically extracted samples fitted to the rheological model of Herschel–Bulkley, the chemical extracted samples fitted better to the model of Ostwald-De Waele or Power Law.

Keywords: Olive-pomace oil / Rheology / Texture

Received: December 12, 2013 / Revised: July 4, 2014 / Accepted: July 9, 2014

DOI: 10.1002/ejlt.201300490

1 Introduction

The rheological characterization of oils is of great interest in order to extend its scope of use. Rheology studies the flow and deformation of materials and describes the relationship between force, deformation, and time [1]. Oscillatory shear studies allow us to determine the linear viscoelastic region of the sample, which is necessary to have non-destructive conditions, and to study viscous and elastic components of the samples by frequency sweeps. Furthermore, using rotational rheological studies we can obtain information about the flow behavior of the system and viscosity, from the shear stress (Pa) versus shear rate (1/s) representation, by applying theoretical mathematical models [2].

Rheological determinations of vegetable oils are necessary in different fields of application, such as the study of solid fats, crystallization studies of palm oil with respect to temperature [3], or oil absorption during the frying process [4–6], as well as non-food uses, such as biodegradable biofuels [7] and in the pharmaceutical field for the design, development, optimization, and quality control of new formulations [8, 9].

Olive oil is the juice extracted by mechanical systems, which separate the different phases that make up its structure: solid or pomace, oil, and vegetation water. The oil obtained from the solid residue, consisting mainly of pulp, peel, seed, and the olive pit, is called olive-pomace oil. Olive-pomace is stored in large ponds, where oil deterioration increases throughout the storage period [10].

Currently there are two types of olive-pomace oils on the market, depending on the procedure used in its extraction, i.e., centrifugation or solvent extraction [11]. The interest in this oil is gradually growing due to its economic value and because it contains all functional compounds present in virgin olive oil [12, 13]. Some of these minor components are present even in higher concentrations, such as triterpenic compounds [14], with direct application to sectors as diverse as food, cosmetics, and derma-pharmacy.

No references have been found on this type of physical characterization of olive-pomace oil. Therefore, the aim of this work was to determine the physico-chemical and rheological characteristics of crude olive-pomace oil, extracted by mechanical and chemical means.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Diethyl ether, ethanol, acetone, sodium hydroxide, and HPLC acetonitrile were purchased from Panreac SA (Barcelona, Spain). All reagents and solvents used were of analytical quality.

Correspondence: M. Victoria Ruiz-Méndez, Instituto de la Grasa (CSIC), Av. Padre García Tejero, 4, 41012 Seville, Spain
E-mail: mvruiz@ig.csic.es
Fax: +34954691262

Abbreviations: TAGs, Triacylglycerols; P, palmitoyl; Po, palmitoleyl; S, stearoyl; O, oleoyl; L, linoleoyl; Ln, linoleoleyl

2.2 Samples

The following samples were obtained throughout the harvest period 2012/2013:

- Five oil samples obtained by centrifugation (February, April, July, and December 2012 and March 2013).
- Five oil samples obtained by solvent extraction (February, April, July, and December 2012 and March 2013).

2.3 Analytical determinations

The acidity and TAGs composition were determined by triplicate following the methods of EEC Regulation No. 2568/91 [15].

2.4 Rheological studies

Multi-step flow curve measurements were run using a controlled stress rheometer (AR-2000, TA Instruments,

New Castle, USA), using a geometry of 60 mm diameter with a smooth surface. The temperature was kept constant with a Peltier plate ($25 \pm 0.1^\circ\text{C}$). The experimental protocol begins with the determination of the linear viscoelastic region of oils by oscillatory stress sweeps at 1 Hz frequency and with the percentage tolerance of 1% and a maximum point time of 120 s. After that one oscillatory stress is selected to allow work in non-destructive conditions. On a second stage, a frequency sweep in the range of 0.01–628.3 rad/s was carried out (maximum limit of the rheometer). The analysis of the results is based on the storage (G') and loss (G'') moduli, which are related to the elastic and viscous components, respectively. In addition, flow and viscosity curves were measured by rotational shear assay.

2.5 Texture analysis

The mechanical properties of the olive-pomace oils studied were determined by a Texture analyzer TA.

Table 1. Acidity (% oleic acid) and TAG composition (%) of pomace olive oil samples throughout 2012/2013 harvest period

Oil samples	February	April	July	December	March
Mechanical extraction					
Acidity (%)	2.41±0.05 ^a	6.33±0.04 ^b	11.76±0.05 ^c	2.81±0.05 ^d	6.08±0.05 ^c
LLL	0.34±0.02 ^a	0.44±0.02 ^b	0.66±0.03 ^c	0.35±0.01 ^a	0.43±0.02 ^d
OLnL	0.33±0.01 ^a	0.35±0.05 ^b	0.44±0.04 ^a	0.28±0.04 ^c	0.30±0.02 ^d
PLnL	0.07±0.01 ^a	0.15±0.01 ^b	0.23±0.01 ^c	0.13±0.01 ^d	0.14±0.02 ^d
OLL+OLnO	2.79±0.01 ^a	2.97±0.03 ^b	2.15±0.02 ^c	1.77±0.17 ^d	2.30±0.08 ^e
PLL	1.93±0.01 ^a	1.96±0.04 ^a	2.25±0.27 ^a	1.99±0.27 ^b	1.80±0.07 ^a
PLnO	0.49±0.02 ^a	0.45±0.02 ^a	0.59±0.10 ^a	0.64±0.17 ^b	0.44±0.06 ^c
OOL	15.34±0.01 ^a	15.56±0.06 ^a	11.81±0.17 ^b	11.13±0.53 ^c	13.94±0.06 ^d
PLO	5.26±0.06 ^a	5.58±0.03 ^a	5.28±0.08 ^a	5.49±0.45 ^a	5.14±0.11 ^b
OOO	44.41±0.60 ^a	44.54±0.47 ^a	42.32±0.23 ^b	45.67±0.21 ^c	47.99±0.08 ^d
SLO+POO	19.61±0.56 ^a	19.04±0.67 ^a	23.56±0.12 ^b	22.65±0.27 ^c	18.42±0.11 ^a
POL	2.11±0.14 ^a	2.05±0.15 ^a	2.83±0.05 ^b	2.67±0.06 ^b	1.86±0.20 ^a
SOO	6.09±0.15 ^a	5.74±0.41 ^a	6.48±0.01 ^b	5.90±0.09 ^c	6.44±0.13 ^b
SLS+POS	1.22±0.04 ^a	1.18±0.13 ^a	1.41±0.09 ^a	1.31±0.24 ^a	0.81±0.19 ^b
Chemical extraction					
Acidity (%)	6.31±0.05 ^a	11.83±0.08 ^b	12.49±0.06 ^c	6.03±0.05 ^a	20.70±0.25 ^d
LLL	0.74±0.03 ^a	0.76±0.12 ^a	0.85±0.02 ^a	0.67±0.03 ^b	0.88±0.06 ^c
OLnL	0.44±0.10 ^a	0.46±0.08 ^a	0.44±0.05 ^a	0.41±0.03 ^a	0.52±0.01 ^a
PLnL	0.16±0.07 ^a	0.20±0.03 ^a	0.14±0.02 ^a	0.03±0.01 ^a	0.23±0.02 ^a
OLL+OLnO	3.80±0.04 ^a	4.08±0.42 ^a	3.66±0.41 ^a	2.95±0.03 ^b	2.21±0.05 ^c
PLL	1.86±0.50 ^a	2.41±0.30 ^a	1.88±0.20 ^b	2.15±0.14 ^b	1.57±0.02 ^c
PLnO	0.72±0.21 ^a	0.59±0.14 ^a	0.51±0.02 ^a	0.53±0.07 ^a	0.55±0.12 ^a
OOL	15.62±0.29 ^a	15.43±0.14 ^a	13.81±0.18 ^b	12.71±0.16 ^c	11.56±0.38 ^d
PLO	6.66±0.23 ^a	6.10±0.36 ^a	6.59±0.44 ^a	6.22±0.18 ^a	4.25±0.23 ^b
OOO	39.60±0.44 ^a	40.51±0.60 ^b	41.27±0.13 ^c	42.17±0.21 ^d	44.86±0.10 ^e
SLO+POO	20.89±0.56 ^a	19.97±0.39 ^b	21.41±0.47 ^a	22.43±0.44 ^c	22.52±0.42 ^c
POL	2.54±0.12 ^a	2.48±0.13 ^a	2.60±0.05 ^a	3.01±0.25 ^b	2.62±0.11 ^a
SOO	5.64±0.17 ^a	5.65±0.27 ^a	5.51±0.29 ^a	5.46±0.20 ^a	6.58±0.17 ^b
SLS+POS	1.32±0.11 ^a	1.36±0.21 ^a	1.33±0.05 ^a	1.27±0.05 ^a	1.65±0.10 ^b

P, palmitoyl; Po, palmitoleyl; S, stearoyl; O, oleoyl; L, linoleoyl; and Ln, linoleolenyl.

Average value $n = 3 \pm \text{SD}$; values followed by the same letter in the same row do not differ significantly by the Duncan test at 5% probability.

XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) controlled by software. A uniaxial compression with a load cell of 5 kg force was applied. A probe (HDP/SR Stable Micro Systems) was penetrated into a complementary conical sample holder containing 8 ± 0.1 g of oil. The robe was set at a distance of 17 mm and moved at 2 mm s^{-1} compression rate. From the resulting force–distance and force–time plots, the hardness (the force required to attain a given deformation), compressibility (the work required to deform the product during the penetration of the probe), and adhesiveness (the work necessary to overcome the attractive forces between the surface of the oil and the surface of the probe) were measured [16].

3 Results and discussion

3.1 Chemical characteristics of crude olive-pomace oil samples

Vegetable oils consist of triglycerides (TAGs), in concentrations of practically 99%. The composition and distribution of fatty acids in TAG structures influence the technological behavior of fats and oils. Table 1 shows the acidity and triglyceride composition expressed in equivalent carbon number (ECN) of the crude oils extracted by both mechanical and chemical means. As expected, the acidity increased with storage time [10], although surprisingly, the December-12 samples resulted in lower acidity than the March-13 samples.

The oils extracted by solvent presented higher proportion of those TAGs composed of unsaturated fatty acids, such as LLL, OLnL, LOL, PLO, and POL, whereas the oils extracted by centrifugation showed higher contents of OOO, being the increment of 6.9% average. However, from February to March, a gradual rise in the OOO content occurred, being the increment of 9.7% in the oil samples extracted by mechanical means and even higher in the oils extracted with solvent, 13.5%. These differences could be attributed to the olive ripeness, in agreement with some authors [17]. Their findings showed significant differences in fatty acid composition with the fruit ripeness, with a clear trend towards increased concentrations of the total MUFA with the ripeness index and at the same time a trend towards decreased contents in the total PUFA.

3.2 Rheological characterization and textural analysis of crude olive-pomace oil samples

Figure 1 shows the oscillatory shear of samples of crude olive-pomace oil. The oscillatory stress sweep is designed to determine the linear viscoelastic region, where storage (G') and loss (G'') moduli have constant values and are independent of the applied oscillatory stress at a constant frequency (1 Hz) [14]. After selecting an oscillatory stress in

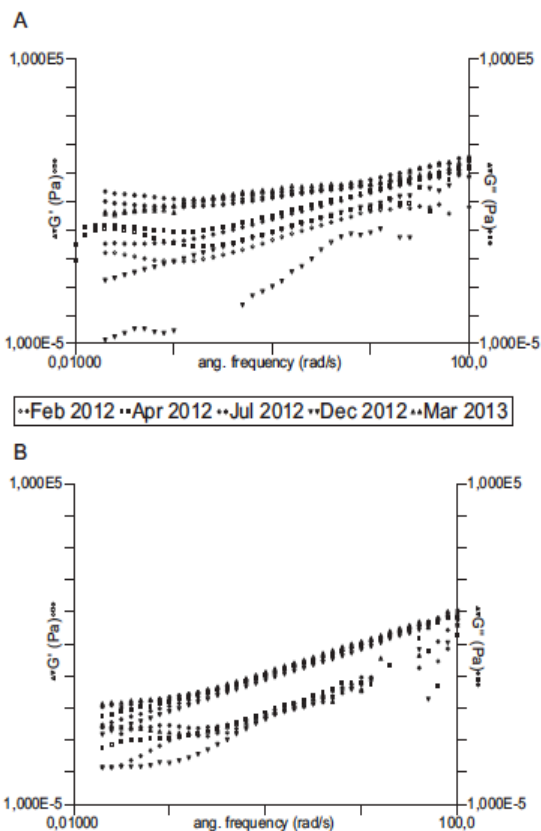


Figure 1. Study of oscillatory shear of samples of crude olive-pomace oil. Frequency sweep of crude olive-pomace oil obtained by mechanical extraction (A) and by chemical extraction (B).

the region of 0.03 Pa, frequency sweeps were performed. In all samples, the elastic (G') and viscous (G'') components increased with the applied frequency over the range tested, with G'' always being higher than G' . Therefore, the samples were all viscoelastic fluids with a predominant viscous component. However, there was an exception in the samples extracted by centrifugation. Specifically, the sample collected in July 12 presented an elastic component (G') that was above the viscous (G''). This sample showed a cross point of the curves (known as the relaxation point) at a frequency value of 1.909 rad/s and 1.925 Pa from which predominance of the viscous component (G'') began.

By representing viscosity versus shear rate, information about the flow behavior of the olive-pomace oils is obtained (Fig. 2). It was observed that the samples obtained by mechanical (Fig. 2a) and chemical (Fig. 2b) means had a non-Newtonian behavior with pseudoplastic flux. Viscosity decreased with the increased shear rate and the system became more fluid.

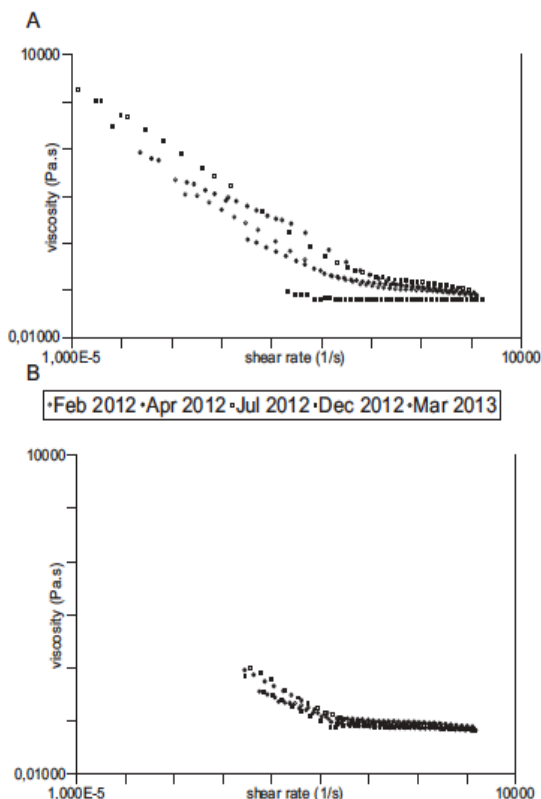


Figure 2. Study of viscosity curves of samples of crude olive-pomace oil. Viscosity curves of crude olive-pomace oil obtained by mechanical extraction (A) and by chemical extraction (B).

Applying rheological theoretical models, the behavior of the samples showed good fits to the models of Ostwald-De Waele or Power law (Eq. 1) and Herschel-Bulkley (Eq. 2) [2] (Table 2).

$$\tau = K(\dot{\gamma})^n \quad (1)$$

$$\tau = \tau_0 + K(\dot{\gamma})^n \quad (2)$$

where τ and τ_0 stand for the shear stress and yield stress, respectively, K is the consistency index and n is the flow index ($n = 1$ for Newtonian fluids, $n < 1$ for non-Newtonian fluids, and $n > 1$ for dilatant fluids). Both types of samples presented values of $n < 1$, thus confirming their pseudo-plastic behavior. The main rheological difference observed between the samples was that the oils obtained by mechanical extraction fitted better to the Herschel-Bulkley model, while the samples extracted by solvent fitted to the Power law.

The Herschel-Bulkley model is developed by the Power Law to determine the yield stress τ_0 , at which a material begins to deform plastically without returning to its original

Table 2. Rheological model parameters of crude pomace olive oil samples

Oil samples	Rheological models fit			SE
	τ_0 (Pa)	K (Pa s)	n	
Mechanical extraction	Herschel-Bulkley			
Feb-12	0.014	0.149	0.911	1.317
Apr-12	0.007	0.200	0.884	1.406
Jul-12	0.064	0.299	0.849	2.197
Dec-12	0.009	0.058	0.998	0.865
Mar-13	0.299	0.212	0.858	2.257
Chemical extraction	Ostwald-De Waele			
Feb-12		0.118	0.939	2.117
Apr-12		0.090	0.954	1.177
Jul-12		0.113	0.928	1.962
Dec-12		0.081	0.977	1.402
Mar-13		0.151	0.904	1.967

Symbols: τ , shear stress, τ_0 , yield stress; K , consistency index; n is the flow index, SE, standard error.

shape when the applied stress is removed. This parameter was only able to be quantified in the samples obtained by mechanical extraction.

From the consistency index (K), it is concluded that the samples obtained by solvent extraction were more uniform and presented lower viscosity values throughout the period studied than the oils extracted by centrifugation.

Table 3 shows the results obtained in the textural analysis of all olive-pomace oil samples. The cohesion and adhesion forces were higher for the oils extracted by centrifugation and were independent of the harvesting period.

Table 3. Textural analysis of crude pomace olive oil samples

Oil samples	Texture parameters			
	Cohesion force (N)	Adhesion force (N)	Cohesion area (Ns)	Adhesion area (Ns)
Mechanical extraction				
Feb-12	1.69	0.72	0.54	0.29
Apr-12	1.00	0.83	0.36	0.15
Jul-12	0.33	0.19	0.16	0.20
Dec-12	2.08	0.63	0.55	0.16
Mar-13	1.45	0.75	0.49	0.21
Chemical extraction				
Feb-12	1.50	0.75	0.55	0.25
Apr-12	0.83	0.66	0.29	0.09
Jul-12	1.18	0.53	0.30	0.17
Dec-12	0.93	0.61	0.35	0.19
Mar-13	0.06	0.02	0.08	0.04

4 Conclusions

The rheological behavior of crude olive-pomace oil has been established for the first time. The type of oil extraction showed a great impact on the rheological behavior. Although both types of oils were viscoelastic fluids with a predominant viscous component and pseudoplastic flow behavior, the oils extracted by centrifugation had a better fit to the Herschel–Bulkley rheological model and the samples extracted by solvent fitted better to the Ostwald–De Waele model. Therefore, the process of extraction affects the plasticity of oils.

The authors are grateful to Oleicola El Tejar, SCA for managing all the samples required for the development of this work, and to Irene Pérez de la Rosa for technical assistance.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Barnes, H. A., Hutton, J. F., Walters, K., in: *An Introduction to Rheology*, (Vol. 3) Elsevier Ltd., London, UK 1989, Chap. 1, p. 1.
- [2] Schramm, G., in: *A practical Approach to Rheology and Rheometry*, Vol. 1, Haake, Karlsruhe, Germany, 1994, pp. 1–291.
- [3] De Graef, V., Goderis, B., Van Puyvelde, P., Foubert, I., Dewettinck, K., Development of a rheological method to characterize palm oil crystallizing under shear. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008, 110, 521–529.
- [4] Kim, J., Kim, D. N., Lee, S. H., Yoo, S. H., Lee, S., Correlation of fatty acid composition of vegetable oils with rheological behaviour and oil uptake. *Food Chem.* 2010, 118, 398–402.
- [5] Maskan, M., Change in colour and rheological behaviour of sunflower seed oil during frying and after adsorbent treatment of used oil. *Eur. Food Res. Technol.* 2003, 218, 20–25.
- [6] Santos, J. C., Santos, I. M., Conceição, M. M., Porto, S. L., et al., Thermoanalytical, kinetic and rheological parameters of commercial edible vegetable oils. *J. Therm. Anal. Cal.* 2004, 75, 419–428.
- [7] Doll, K. M., Sharma, B. K., Suarez, P. A., Erhan, S. Z., Comparing biofuels obtained from pyrolysis, of soybean oil or soapstock, with traditional soybean biodiesel: Density, kinematic viscosity, and surface tensions†. *Energy Fuels* 2008, 22, 2061–2066.
- [8] Jiménez-Kairuz, A., Allemandi, D., Manzo, R. H., Mechanism of lidocaine release from carcomer-lidocaine hydrogels. *J. Pharm.* 2002, 91, 267–272.
- [9] Chouaibi, M., Mahfoudhi, N., Rezig, L., Donsi, F., et al., A comparative study on physicochemical, rheological and surface tension properties of Tunisian Jujube (*Zizyphus lotus* L.) seed and vegetable oils. *Intern. J. Food Eng.* 2012, 8, 11–18.
- [10] Ramos Hinojosa, Á. E., Ruiz Méndez, M., Orujos de dos fases almacenados en balsas. *Grasas y aceites* 2004, 55, 251–258.
- [11] Sánchez, P., Ruiz-Méndez, M. V., Production of pomace olive oil. *Grasas y Aceites* 2006, 57, 47–55.
- [12] Valero Muñoz, M., Martín Fernández, B., Ballesteros, S., Quintela, J. C., et al., Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: Mechanisms involved. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014, 58, 376–383.
- [13] Rodríguez-Rodríguez, R., Herrera, M. D., de Sotomayor, M. A., Ruiz-Gutiérrez, V. Effects of pomace olive oil-enriched diets on endothelial function of small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.* 2009, 102, 1435–1444.
- [14] Pérez-Camino, M. C., Cert, A., Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1558–1562.
- [15] Regulation (EU) No 1348/2013 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Off. J. Eur. Union* 2013, L338, 31–67.
- [16] Lucero, M. J., Claro, C., Casas, M., Jiménez-Castellanos, M. R., Rheological and mechanical properties of hydrophilic dispersions using a new hydrophobically modified polymer and Igepal® CO520. *Carbohydr. Polym.* 2011, 86, 891–896.
- [17] Fuentes de Mendoza, M., De Miguel Gordillo, C., Marín Expósito, J., Sánchez Casas, J., et al., Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives. *Food Chem.* 2013, 141, 2575–2581.

**INFLUENCE OF REFINING PROCESSES ON
CONTENT OF BIOACTIVE COMPOUNDS,
RHEOLOGY, AND TEXTURE OF OLIVE POMACE OIL
FOR USE IN TOPICAL FORMULATIONS**

European Journal of Lipid Science and Technology.

In press, DOI: [10.1002/ejlt.201600408](https://doi.org/10.1002/ejlt.201600408)

**C.A. Sánchez-Gutiérrez, M.V Ruiz-Méndez, M.R. Jiménez-
Castellanos Ballesteros and M.J. Lucero**

**Influence of refining processes on content of bioactive
compounds, rheology, and texture of olive pomace oil for use in
topical formulations**

**C. A. Sánchez-Gutiérrez^{a,b}, M. V. Ruiz-Méndez^{b*}, M. R. Jiménez-Castellanos^{a,*}
and M. J. Lucero^{a,*}**

^a Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia.
Universidad de Sevilla, Spain.

^b Instituto de la Grasa. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla,
Spain.

E-mail addresses: csanchez17@us.es (C. A. Sánchez-Gutiérrez),
mvrui@ig.csic.es (M.V. Ruiz-Méndez), mrosa@us.es (M. R. Jiménez-
Castellanos), mj lucero@us.es (M. J. Lucero)

ABSTRACT

Retaining the bioactive ingredients of olive pomace oil is a crucial step in ensuring their functional or pharmaceutical value. To help select the best method for retaining bioactive compounds in olive pomace oil, three refining processes, namely, chemical, classical physical, or molecular distillation, were compared at different temperatures. For each method, the contents of triacylglycerols, fatty acids (oleic acid, linoleic and linolenic acids), triterpenic acids (oleanolic and maslinic acids), and unsaponifiable matter (squalene, aliphatic, sterols and terpenic) were studied. We observed that physical refining by molecular distillation provided oils with interesting amounts of bioactive compounds, especially triterpenic acids. Of these oils, the samples submitted to a temperature of 190°C exhibited a greater albeit low acidity compared with the other oils obtained by chemical and classical physical refining but exhibited higher amounts of all bioactive compounds. Conversely, the molecular distillation refining process had only a slight effect on the values of the consistency index. The firmness, cohesiveness, and adhesiveness parameters from texture profile analysis indicated that in general, all deodorized oils had high smoothness and spreadability but low adhesiveness. Molecular distillation was concluded to be the best refining process. Nevertheless, it is necessary to improve the working conditions of this process.

KEYWORDS: Olive pomace oil / Refining processes / Bioactive compounds/ Rheology / Topical formulations

1. INTRODUCTION

Olives are subjected to a mechanical extraction process in order to separate the different parts that make up the fruit and obtain the pomace (solid residue), extra virgin olive oil (EVOO juice), and vegetable water. EVOO has been used since ancient times as a natural product for skin-care formulations and cosmetics [1]. However, olive pomace oil (OPOC), obtained from pomace, has always been discarded or used in other technological fields. Nevertheless, in recent years, there has been growing interest in OPOC due to its composition because it contains all the functional compounds of EVOO but with a higher concentration of some minor components [2]. Thus, in decreasing order of concentration, the bioactive compounds are: a) triacylglycerols as the main component (>95%); b) fatty acids, such as oleic acid, used in cosmetic and pharmaceutical formulation, and linoleic and linolenic acids, which influence the metabolic processes of the skin and promote ceramide formation [3] and the activity of vitamins A and E [4]; c) triterpenic acids, in particular oleanolic and maslinic acids, with antitumor, anti-inflammatory, and bactericidal activities [5]; and d) unsaponifiable matter composed of squalene, used as an emollient to keep skin soft and elastic. Additionally, it has antioxidant properties due to its isoprene structure [6]. Aliphatic alcohols suppress the release of various inflammatory mediators [7]; sterols and terpenic alcohols (erythrodiol and uvaol) have positive effects on the inflammatory process [8].

Chemical and mechanical extractions can be used to obtain OPOC. In a previous paper [9], it was demonstrated that mechanical extraction provides a greater percentage of the main compounds (triacylglycerols). However, due to the high acidity of the OPOC, it cannot be used in pharmaceuticals. This is why the OPOC must be subjected to a refining process, but with minimum losses of bioactive compounds [10].

There are two refining procedures, chemical (C) or physical (P), with different steps. The common method of refining oil is by reacting it with an alkali

solution, which neutralizes the free fatty acids (chemical refining). Ruiz-Mendez et al. [11] demonstrated that physical procedures result in minimal losses of bioactive compounds, such as triterpenic acids in the case of OPOC. In physical refining, vegetable oils can be neutralized by free fatty acid distillation at high temperatures, low pressures, and with steam stream. However, physical refining can only be applied after mechanical extraction. This is because the OPOC from chemical extraction has a high content of chlorophyll, phosphatides, carotenes, and other pollutants that cannot be removed by simple physical means [12].

Given the above, the aim of this work was to study the influence of refining processes in determining the composition of bioactive compounds for use in topical formulations. For quantitative evaluation of the composition, two types of OPOC were selected, obtained by chemical or mechanical extraction. These oils were subjected to various refining processes (chemical refining, classical physical refining, or physical refining by molecular distillation at different temperatures). The best refining process was selected on the basis of the analytical determination of bioactive compounds by gas chromatography. Finally, rheological characterization and texture profile analysis are discussed as convenient methods for mechanical characterization of topical olive pomace oils.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

The raw materials used for this paper were OPOC from the 2012-2013 campaign and were labeled as follows: olive pomace oil (OPOC) obtained by chemical extraction (OPOC C) and, two OPOCs obtained by mechanical extraction (OPOC MA and OPOC MB). All OPOCs were refined at the laboratory scale. Therefore, OPOC C and OPOC MA were subjected to a chemical refining process, and the obtained products were labeled as OPOD CC and OPOD MAC, respectively. On the other hand, OPOC MA and OPOC MB were refined by

classical physical refining and physical refining by molecular distillation at different temperatures, and the obtained products were labeled as OPOD MAP and OPOD MBP, respectively (Fig. 1).

Different reagents and solvents were used: hexane, diethyl ether, isopropyl ether, ethanol, chloroform, dichloromethane phosphoric acid, methanol, pyridine, acetone, acetic acid, sulfuric acid, potassium hydroxide, sodium methylate, sodium hydroxide, ethyl acetate, phenolphthalein, and HPLC grade acetonitrile were purchased from Panreac SA (Barcelona, Spain). Trimethyl chlorosilane, hexamethyl disiloxane, and Sudan I were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Filter aids were supplied by Dicalite (Gent, Belgium). Tonsil supreme 114 FF was obtained from Süd-Chemie (Toledo, Spain). All reagents and solvents used were of analytical quality.

As standard compounds, 5- α -cholestan-3-ol, n-heicosanol, betulinic acid, lauryl arachidate, and methyl heptadecanoate were purchased from Sigma-Aldrich SA (S. Louis, USA). Squalene was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Methods

2.2.1 Chemical refining process

The steps of this method are described below:

Degumming: Five hundred grams of OPOC C or OPOC MA was weighed into a vessel, and 0.3 wt.% oil of phosphoric acid was added. The mixture was maintained at 25°C for 30 min under agitation, to precipitate phospholipids in the acidic media.

Neutralization: Without separating the gums, the required amount of NaOH (24° Be) was added, accompanied by an excess of 10%. The addition was performed at 40°C and the temperature was then increased to 80°C. The mixture was stirred at this temperature for 20 min. Then, the soap stocks were separated by centrifugation at 2500 rpm.

Winterization: Without washing, 5% of NaOH (4° Be) was added to the neutralized oil, and the mixtures was kept at 5°C for 18 h. The precipitates were separated by centrifugation.

Washes: In order to remove traces of dissolved soap, the winterized oil was washed three times with water (10% w/w) for 10 min. The washing water was discarded.

Bleaching: The washed oil was dried under a vacuum of 60 Torr at 90°C for 15 min with an agitation of 125 rpm. Next, 1.5% of Tonsil Supreme 114% and 0.15% of activated carbon were added. The temperature was raised to 110°C and held for 10 min. Then, the mixture was cooled under a vacuum and filtered at 50°C.

Deodorization: The bleached oils were deodorized at 220°C for 3 h under a vacuum of 0.5 to 1 mbar. Once deodorized, the oils were filtered with filter paper and stored at -18°C until analysis (OPOD CC and OPOD MAC).

2.2.2 Physical refining process

2.2.2.1. Classical physical refining

The steps of this procedure were as follows:

Degumming: Five hundred grams of OPOC MA was weighed into a vessel, and 0.5 wt.% oil of citric acid was added to it. The mixture was maintained for 10 min at 80°C under agitation, to precipitate phospholipids in the acidic media.

Washes: In order to remove traces of dissolved soap, the degummed oil was washed once with water (10% w/w), for 10 min at 80°C. The washing water was discarded.

Bleaching: The washed oil was dried under a vacuum of 60 Torr at 90°C for 15 min with an agitation of 125 rpm. Then, 1.5% Tonsil Supreme 114, 0.1% activated carbon, 1% Trysil 300, and 0.1% Dicalite were added. The temperature was raised to 110°C and held for 10 min. Then, the mixture was filtered.

Neutralizing deodorization: The bleached oil was deodorized at 250°C

(OPOD MAP) for 3 h under a vacuum of 0.5 to 1 mbar. Water vapor was used as the carrier gas at a rate of 6.24 mL/h. Once deodorized, the oil was filtered through paper and stored at -18°C until analysis.

2.2.2.2 Molecular distillation refining

The steps of this procedure were as follows:

Bleaching: The bleaching conditions were the same as those used in the classical physical refining procedure.

Molecular distillation: The deodorization was performed in a short-path device (mod. KDLS, UIC Gmb, Germany). The operating conditions were fixed as follows: feed flow of 1.44 l/h, 250 rpm as the rotation speed of the rollers, condenser temperature of 50°C, and vacuum of 0.001 mbar. Deodorized oils were taken at 140°C (OPOD140 MBP), 165°C (OPOD165 MBP), 190°C (OPOD190 MBP), and 215°C (OPOD215 MBP).

2.3. Analytical study

Analytical determination of bioactive compounds was carried out for crude olive pomace oils (OPOC C, OPOC MA, and OPOC MB) and deodorized oils obtained in different refining process (OPOD CC, OPOD MAC, OPOD MAP, and different OPOD MBP).

The acidity, fatty acid composition, wax content, and squalene and alkyl esters were determined by the methods outlined in the European Economic Community [13].

The unsaponifiable matter was extracted and quantified after saponification of the oils with KOH/EtOH, following the Spanish standard method [14]. From these extracts, the content of sterols and aliphatic alcohols was determined according the proposed standard methods [13], by using 5- α -cholestan-3-ol and n-heneicosanol as internal standards, respectively.

The triterpenic acid content was determined following the method

proposed by Pérez-Camino and Cert [2], which consists of the isolation of the fatty acid fraction by SPE-NH₂ columns, silylation of the extracts, and quantification by gas chromatography (Mod. 7890A, Agilent Technologies), using betulinic acid as an internal standard.

2.4. Rheological characterization

Multi-step flow curve measurements were run using a controlled stress rheometer (AR-2000, TA Instruments, New Castle, USA) and a plane geometry of 60-mm diameter with a smooth surface. A constant temperature was maintained with a Peltier plate (25±0.1°C). The experimental protocol began with a dynamic oscillatory study to determine the linear viscoelastic region of oils through stress sweeps at a frequency of 1 Hz, a percentage tolerance of 1%, and maximum point time of 120 s. Then, an appropriate value of stress was selected in order to comply with non-destructive conditions. After this, a frequency sweep was carried out in the range from 0.01 rad/s to 628.3 rad/s. The analysis of results is based on the storage (G') and loss (G'') moduli, which are related to the elastic and viscous components, respectively. On the other hand, flow and viscosity curves were determined by a rotational shear assay. Each measurement was made in triplicate and was deemed valid when the curves were superimposable.

Different theoretical models can be used to analyze the rheological results to test performance in terms of shear stress (τ) and shear rate ($\dot{\gamma}$) or viscosity (η) and shear rate ($\dot{\gamma}$). The lowest standard error was applied to the theoretical rheological models. In our paper, the power law model (also well-known as Ostwald-de Waele model) was used Eq. (1).

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

This model relates the shear stress (τ) with the shear rate ($\dot{\gamma}$), where K and

n are the consistency index and fluid index, respectively. Depending on the value of n , the fluid types can be determined. Fluids with $n = 1$ are Newtonian fluids and those with $n \neq 1$ are non-Newtonian fluids. The flow behavior can be determined depending on the n value. Thus, $n < 1$ indicates pseudoplastic or plastic flow (shear-thinning) and $n > 1$ indicates dilatant flow (shear-thickening).

2.5 Texture profile analysis (TPA)

The texture is defined by ISO 5492 [15] as: an instrumental technique that studies the set of rheological properties and structure of a perceived product by the mechano-receptors, touch receptors, and in some cases, by visuals and auditory information.

Actually, texture is an important attribute of any product, which affects its processing and handling, and determines its useful life as well as acceptance by users/patients.

Spreadability, in practical terms, is the ease with which a product can be spread in a thin, even layer on a surface. The firmness or hardness can be measured by the force required to obtain a given deformation or the amount of deformation by a given force.

Although extensibility is also a deformation under an external load, it is a more dynamic property than firmness or hardness. Measurements of firmness and spreadability tend to be highly correlated, but this relationship is usually not perfect.

Textural properties of the different OPOCs and OPODs were determined by uniaxial compression with a load cell of 5 kg. A texture analyzer TA.XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) was used and controlled by software. A conical probe (HDP/SR, Stable Micro Systems) was inserted in the complementary conical sample holder containing 8 ± 0.1 g of different oils. This probe is an accessory that measures the ease with which a product can be applied in a thin, even layer. During the test, the force was increased to the point of maximum

depth as the cone entered the vessel. The value of peak force (maximum force) was taken as the firmness to the specified depth. Firmer samples showed a larger positive area, representing the total amount of force (cohesiveness) required to perform the breaking process. Both values were used to quantify the spreadability of samples; however, one of the two measurements often gave more relevant information than the other. The adhesive properties of the product (adhesiveness), which are quantified by the negative zone of the curve, were characterized during the return movement of the probe [16].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical characterization of OPOCs and OPODs obtained by refining processes.

As mentioned before, OPOCs were refined to remove unwanted minor components from oils, while causing minimal losses of bioactive compounds [10]. Table 1 shows the results of analytical determinations of crude pomace oil obtained by: chemical (OPOC C) and mechanical (OPOC MA) extractions, and deodorized oil obtained by the chemical refining process (OPOD CC and OPOD MAC). Table 2 includes the corresponding results for oils obtained by mechanical extraction (OPOC MA and OPOC MB), and deodorized oils obtained by physical refining processes (OPOD MAP and OPOD MBP).

Acidity and triterpenic acids. In relation to the acidity, it is possible to appreciate two important aspects. First, it is noted that the oil obtained by mechanical extraction (OPOC MA and OPOC MB) has less acidity than that obtained by chemical extraction (OPOC C). Therefore, it seems that the centrifugation process is more suitable than the solvent extraction process. This property is observed because the chemical extraction process requires preliminary drying under drastic conditions, producing oxidation and hydrolysis reactions and thus causing the increase of free fatty acids.

Conversely it is observed that the temperature of the refining process

greatly influences the acidity. Thus, it was observed that using high temperatures, as in the case of chemical (220°C) and classical physical (250°C) refining, acidity greatly decreases against the selected temperatures in molecular distillation. However, these high temperatures have a significant impact on the concentration of bioactive compounds.

In the case of chemical refining, free fatty acids and triterpenic acids were removed by saponification. The acidity was reduced below <0.1%; however, the oil quality was degraded from a health point of view because triterpenic acids had been removed. Similar behavior can be observed in the case of classical physical refining (Table 2). In contrast, the acidity was less reduced by molecular distillation, but a higher amount of anti-inflammatory bioactive compounds (triterpenic acids) were obtained (Table 2). This major acidity could be attributed to the fact that a steam stream was not introduced in the molecular distiller to remove free fatty acids.

Alkyl esters. As shown in Table 1 and 2, lower amounts of alkyl esters were obtained in all processes of refining. These non-bioactive compounds appear due to fermentation of vegetable matter during olive pomace oil storage in ponds [17]. Consistent with Yuan et al. [18], an increase in temperature causes a decrease of alkyl esters, as observed in the oils after molecular distillation, because these compounds are volatile at temperatures >165°C.

Waxes. In general, the presence of long-chain esters as waxes in vegetable oil is used to determine the purity and classification of the various grades of olive oil [13]. The wax content increases during the chemical and physical refining processes (Tables 1 and 2). This suggests esterification reactions between free fatty acids and aliphatic alcohols present in the oil at deodorization temperatures, as reported by Tubaileh et al. [19]. Thus, when deodorization temperature increased, the wax content increased, as observed from the oils obtained by molecular distillation.

Unsaponifiable matter. This is composed of a complex mixture of

compounds other than glycerides. The major bioactive compounds in olive pomace oil are squalene, sterols, and the triterpenic alcohols erythrodiol and uvaol [8]. As displayed in Table 1 and 2, the percentage of unsaponifiable matter decreased with refining. This could be attributed mainly to the removal of squalene in the refining processes. However, in molecular distillation, a significant amount of squalene was collected in deodorization distillates (OPOD140 MBP to OPOD215 MBP). This squalene, as indicated by Bondioli et al. [20], can be added to our oil, enriching the concentration of this bioactive compound.

Tables 1 and 2 report the different sterols characteristic of the olive pomace oil. In agreement with Verleyen et al. [21], the partial removal of sterols during the refining process depends largely on the conditions applied in the various stages of the process. Thus, with chemical and classical physical refining, the amount of these bioactive compounds decreased (40% and 20%, respectively); in contrast, the amount of these sterols increased slightly in the molecular distillation. Similar behavior can be observed with triterpenic alcohols.

Considering all of the above, the physical refining processes, especially molecular distillation, contribute to better performance in terms of the bioactive compounds studied, which can be used in topical formulations for their therapeutical activities. Furthermore, of all the oils obtained by molecular distillation, OPOD190 MBP was chosen to be the only one that simultaneously shows low acidity and less loss of bioactive compounds.

In summary, the results obtained for OPOD190 MBP by molecular distillation were considered appropriate to compare with respect to EVOO, which is a raw material widely used in topical formulations (Table 3). It is noted that OPOD190 MBP showed greater acidity than EVOO, although still low; however, we confirmed that our olive pomace oil exhibited higher amounts of all bioactive compounds, except for squalene.

3.2. Rheological characterization

Fig. 2 shows the rheological behavior in chemical and mechanical extraction (OPOC C and OPOC MA), and chemical refining (OPOD CC and OPOD MAC). Fig. 2A presents the oscillatory frequency sweep for the measurement of viscoelasticity. In all cases, it was observed that the viscoelasticity of fluids, G' and G'' , is dependent on the applied frequency. Moreover, there is a predominance of the viscous component in all OPOC as OPOD. G' was only stable at frequencies less than $5\text{-}10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, indicating little influence of the elastic component in the viscoelastic behavior. At the same time, an important gap was observed in the profiles between G'' and G' , which corroborates the impact of viscous behavior. Only OPOD CC shows little difference between the two components (G'' and G'), which were even reversed at frequencies below 0.1 rad/s , indicating that G' has greater impact on the internal structure of this oil.

Fig. 2B shows the flow curves of OPOC C, OPOC MA, OPOD CC, and OPOD MAC. All oils behave as pseudoplastic or shear-thinning fluids.

Fig. 3 compares the rheological behavior in chemical and classical physical refining (OPOD MAC and OPOD MAP). For all oils, the viscous component (G'') increased with the applied frequency (Fig. 3A). Therefore, OPOD MAC and OPOD MAP were viscoelastic fluids with a predominance of the viscous component, similar to OPOC MA. Furthermore, it was observed that OPOD MAP had progressively lower values of the elastic component (G'), in contrast with OPOD MAC.

The flow behavior can be observed in Fig. 3B, which shows that all oils were non-Newtonian fluids with pseudoplastic behavior.

Fig. 4 compares the rheological behavior of the two physical refining processes, classical physical (OPOD MAP) and molecular distillation (OPOD MBP). Again, all oils were viscoelastic fluids with a predominance of the viscous component, similar to raw olive pomace oils. Nonetheless, it is observed that

the fractions subjected to temperatures above 145°C in the molecular distillation refining process (OPOD165 MBP, OPOD190 MBP and OPOD215 MBP) had progressively lower values of G' , and lost their elastic property (Fig. 4A).

The flow behavior can be observed in Fig. 4B. Again, all of the oils studied exhibited pseudoplastic flow behavior.

The flow curves were adjusted to different rheological theoretical models. The best fit was obtained with the power law model. Table 4 registers all the parameters obtained. The results confirm that all oils studied behave as Non-Newtonian fluids with pseudoplastic or shear-thinning behavior ($n < 1$). Nevertheless, the flow index values close to 1 denote that they were almost Newtonian fluids.

The consistency index (K) values indicate that the viscosity was small in all instances. Moreover, the chemical refining process did not affect the flow characteristics (OPOD CC with respect to OPOC C and OPOD MAC with respect to OPOC MA). Nonetheless, because OPOD CC and OPOD MAC did not differ in the refining process, the extraction process is responsible for the results obtained. Thus, mechanical extraction caused a loss of viscosity, while chemical extraction promoted an increase of it. This could be related with the acidity content. It is important to mention that OPOC MA with lower acidity resulted in a decrease in viscosity. The opposite occurred in OPOC C, the sample with higher acidity (obtained by solvent extraction), increasing the viscosity of the sample [22].

The classical physical refining (OPOD MAP) displayed less viscosity than OPOC MA, although both are almost Newtonian fluids. The consistency index values were lower for the physically refined samples than for the crude olive pomace oil, while the chemical process seemed to not modify this parameter.

On the other hand, the molecular distillation refining process (OPOD MBP) slightly affected the values of the consistency index.

3.3. Texture profile analysis (TPA)

Determining the texture parameters of the oils can indicate their mechanical and sensory properties during situations of use, for example, spreadability, adhesiveness, and cohesiveness.

The firmness is related with the maximum positive force required to attain a given deformation. Cohesiveness and adhesiveness correspond to the areas under the curve obtained in the compression and withdrawal of the probe, respectively. Cohesiveness indicates the force to break the physical/chemical bonds established between the substances composing each oil. In contrast, adhesiveness indicates the force required to separate the oil from the walls of the containing recipient.

The results of TPA (Table 5) indicate that the refining processes influence these parameters. Thus, the chemical refining process shows that the deodorized oils (OPOD CC and OPOD MAC) present similar values. If the chemical and classical physical refining processes are compared, OPOD MAC and MAP OPOD show the lowest values of all parameters, indicating greater influence of classical physical refining than chemical refining. In the case of molecular distillation and taking into account all temperatures, changes in the texture values are less marked than in classical physical refining.

In summary, OPOD CC and OPOD MAC are characterized by low firmness and cohesiveness, which indicate that they are soft and have high spreadability. At the same time, they have little adhesiveness and will thus form a thin film on the skin. OPOD MAP presents the same characteristics of texture.

Molecular distillation provides a battery of OPOD with optimal texture characteristics of softness and spreadability, which allow the formation of a more adhesive film on the skin.

4. CONCLUSIONS

Temperature and, in general, the working conditions of the refining

processes have important effects on the content of bioactive compounds. The physical refining processes, especially molecular distillation, contribute to better performance in these compounds. Furthermore, of all of the oils obtained by molecular distillation, OPOD190 MBP was chosen to be the only one that simultaneously showed low acidity and less loss of bioactive compounds. However, this oil showed higher acidity than extra virgin olive oil but higher amounts of all bioactive compounds, except squalene.

After the refining process, the olive pomace oils showed the best fit to the power law rheological model, possibly due to the removal of minor components in the process. In the OPOC subjected to refining, the viscosity decreased with an increase in the deodorization temperature and reduction in the amount of free fatty acids, thus also affecting the nature of the samples. The firmness, cohesiveness, and adhesiveness parameters from texture profile analysis showed that, in general, all OPODs have high smoothness and spreadability but low adhesiveness.

In view of the achieved results, it can be concluded that molecular distillation is the best refining process. Nevertheless, it is necessary to improve the working conditions in order to reduce acidity and achieve lower losses, if possible, of bioactive compounds. Therefore, other studies need to be performed by changing the working conditions of the molecular distillation in addition to applying other physical refining processes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Oleícola El Tejar, SCA for managing all the samples required for the development of this work and to Irene Pérez de la Rosa for technical assistance.

REFERENCES

- [1] Draeos, Z.D., *Cosmetic dermatology: products and procedures*, John Wiley and Sons ed. Oxford. 2011
- [2] Pérez-Camino, M.C., Cert, A., Quantitative determination of hydroxypentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1558-1562.
- [3] Rabionet, M., Gorgas, K., Sandhoff, R., Ceramide synthesis in the epidermis. *BBA-Mol. Cell. Biol. L.* 2014, 1841, 422-434.
- [4] Rabasco, A., González, M., Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas Aceites.* 2000, 51, 74-96.
- [5] Sun, M., Tang, Y., Ding, T., Liu, M., Wang, X., Investigation of cytochrome P450 inhibitory properties of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L., and its structure–activity relationship. *Phytomedicine.* 2015, 22, 56-65.
- [6] Reddy, L.H., Couvreur, P., Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Adv. Drug. Deliver Rev.* 2009, 61, 1412-1426.
- [7] Fernández-Arche, A., Márquez-Martín, A., de la Puerta Vázquez, R., Perona, J., Terencio, C., Pérez-Camino, C., Ruiz-Gutiérrez, V., Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *J. Nutr. Biochem.* 2009, 20, 155-162.
- [8] Márquez-Martín, A., De la Puerta, R., Fernández-Arche, A., Ruiz-Gutiérrez, V., Yaqoob, P., Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil human mononuclear cells. *Cytokine.* 2006, 36, 211-217.
- [9] Sánchez-Gutiérrez, C.A., Casas, M., Lucero, M.J., Ruiz-Méndez, M.V., Physico-chemical and rheological characterization of olive-pomace oils. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* 2015, 117, 87-91.

- [10] Ruiz-Méndez, M.V., Aguirre-González, M.R., Marmesat, S., Olive Oil Refining Process, in: Aparicio, R., Harwood, J. (Eds.), *Handbook of Olive Oil*. Springer US, 2013, pp. 715-738.
- [11] Ruiz-Méndez, M.V., Dobarganes, M.C., Sánchez Moral, P., Edible olive pomace oil concentrated in triterpenic acids, procedure of physical refining utilized for obtainment thereof and recovery of functional components present in the crude oil. Patent ES 2332977 (A1) 2010.
- [12] Amelotti, G., Effects of the interesterification for physical refining of some olive oils. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. 1987, 64, 223-226.
- [13] Regulation (EU) No 1348/2013 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Off. J. Eur. Union*. L 338, 31-67.
- [14] Standard Method UNE 55004. 2001. Quantitative Determination of Unsaponifiable Matter. AENOR (Asociación Española de Normalización y Racionalización). Madrid, Spain.
- [15] UNE-EN ISO 5492:2010. Análisis sensorial. Vocabulario. (ISO 5492:2008). AENOR. Madrid.
- [16] Aname Instrumentación Científica.
<http://analisisdetextura.blogspot.com.es/search/label/An%C3%A1lisis%20de%20Textura> , 2016 (Accessed 30.05.16).
- [17] Ruiz-Méndez, M.V., Ramos Hinojosa, A.E., Fatty acid esters with short chain alcohols in two phase olive pomace oils. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech*. 2003, 105, 346-350.
- [18] Yuan, W., Hansen, A.C., Zhang, Q., Vapor pressure and normal boiling point predictions for pure methyl esters and biodiesel fuels. *Fuel*. 2005, 84, 943-950.
- [19] Tubaileh, R.M., Garrido-Fernández, A., Ruiz Méndez, M.V., León-Camacho,

- M., et al., Effects of deodorization/physical refining variables in wax and fatty alcohols content of refined olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002, 79, 67-71.
- [20] Bondioli, P., Mariani, C., Lanzani, A., Fedeli, E., Muller, A., Squalene recovery from olive oil deodorizer distillates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1993, 70, 763-766.
- [21] Verleyen, T., Sosinska, U., Verhé, R., Dewettinck, K., et al., Influence of the vegetable oil refining process on free and esterified sterols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002, 79, 947-953.
- [22] Cedeño González, F.O., Prieto González, M.M., Bada Gancedo, J.C., Alonso Suárez, R., Estudio de la densidad y de la viscosidad de algunos ácidos grasos puros. *Grasas Aceites.* 1999, 50, 359-368.

TABLES

Table 1.- Analytical determinations of crude olive pomace oil obtained by chemical (OPOC C) and mechanical (OPOC MA) extractions and deodorized oil obtained by chemical refining process (OPOD CC and OPOD MAC).

	Chemical extraction and chemical refining		Mechanical extraction and chemical refining	
	OPOC C	OPOD CC	OPOC MA	OPOD MAC
Acidity (%)	20.70±0.14	0.08±0.01	6,89±0.02	0,075±0,01
Triterpenic acids (mg/Kg)	5121±130		11171±263	
Oleanolic acid	4342±78	0	5027±142	0
Maslinic acid	779±52	0	6114±121	0
Alkyl esters (%)	3.69	0.02	1,21	0,42
Waxes (mg/kg)	3510±78	5172±173	1798±58	2348±18
Unsaponifiable matter (%)	2.64±0.18	2.43±0.05	2,14±0.08	1,51±0,08
Squalene (mg/kg)	5048±96	3747±9	6175±121	4567±12
Aliphatic alcohols (mg/kg)	5784±81	4744±7	5263±234	3081±96
Sterols (mg/kg)	5435±158	3065±269	3406±87	2252±58
Cholesterol (%)	0.24±0.01	0.24±0.04	0.24±0.03	0,24±0,03
Campesterol	3.20±0.02	3.54±0.04	3,20±0.22	2,81±0,16
Stigmasterol	1.23±0.07	1.59±0.18	1,29±0.10	0,86±0.06
Clerosterol	0.94±0.01	1.34±0.05	1.42±0.23	1,79±0.26
β-Sitosterol	87.71±0.31	84.48±0.03	88.04±0.48	88.11±0.018
Sitostenol	1.26±0.13	2.17±0.28	2.36±0.22	2,97±0.21
5-Avenasterol	3.98±0.16	3.60±0.13	0.43±0.06	0.38±0.12
5,24-Estigmastadienol	0.83±0.17	1.94±0.37	2.18±0.02	2.06±0.12
Δ-7-Stigmastenol	0.38±0.04	0.89±0.11	0,46±0.01	0,45±0.15
Δ-7-Avenasterol	0.23±0.02	0.21±0.04	0,37±0.04	0,33±0.05
Triterpenic alcohols (mg/kg)	568±4	511±4	582±48	376±29

Average value $n=3 \pm SD$

Table 2.- Analytical determinations of crude olive pomace oil obtained by mechanical extraction (OPOC MA and OPOC MB) and deodorized oils obtained by physical refining process (OPOD MAP and OPOD MBP).

	Mechanical extraction and Classical physical refining		Mechanical extraction and molecular distillation refining				
	OPOC MA	OPOD MAP	OPOC MB	OPOD140 MBP	OPOD165 MBP	OPOD190 MBP	OPOD215 MBP
Acidity (%)	6,89±0.02	0,12±0.0	11.76±0.0	17.00±0.06	6.30±0.02	2.75±0.01	2.15±0.09
Triterpenic acids (mg/Kg)	11141±26	49±0.9	38300±1	8275±257	7619±180	9856±357	8458±567
Oleanolic acid	5027±142	29±0.6	12400±67	4681±82	4450±141	5450±128	4310±167
Maslinic acid	6114±121	20±0.3	25900±56	3594±135	3169±39	4406±229	4148±400
Alkyl esters (%)	1.21	0.00	2.67	1.60	0.18	0.03	0.02
Waxes (mg/kg)	1798±58	2374±12	4633±78	7782±202	8806±106	8827±78	8866±80
Unsaponifiable matter (%)	2,14±0.08	0,85±0.0	3.57±0,25	3.37±0,05	3.05±0,16	2.80±0,15	2.35±0,14
Squalene (mg/kg)	6175±121	232±12	4516±107	2355±126	2061±81	310±56	85±8
Aliphatic alcohols (mg/kg)	5263±234	2220±98	6595±567	6546±319	7690±115	5465±282	6954±366
Sterols (mg/kg)	3406±87	2646±29	3979±453	3851±90	4284±54	4131±31	4359±180
Cholesterol (%)	0.24±0.03	0.24±0.0	0.24±0.05	0.24±0.02	0.24±0.02	0.24±0,03	0.20±0,08
Campesterol	3,20±0.22	3,18±0.1	3.07±0.09	4.03±0.21	4.67±0,05	4.73±0,08	4.67±0,41
Stigmasterol	1,29±0.10	2,01±0.1	1.43±0.18	1.39±0.06	1.36±0,02	1.26±0,10	1.25±0,52
Clerosterol	1.42±0.23	1.83±0.0	1.34±0.11	1.50±0.12	1.41±0.12	1.22±0.41	1.95±0.03
β-Sitosterol	88.04±0.48	87.47±0.	88.49±0.3	87.71±0.4	87.90±0.0	88.03±0.0	86.62±0.0
Sitostenol	2.36±0.22	2.34±0.1	2.05±0.21	2.04±0.03	1.90±0.09	2.01±0.08	2.46±0.22
5- Avenasterol	0.43±0.06	0.33±0.0	0.39±0.04	0.40±0.04	0.19±0.07	0.20±0.08	0.31±0.01
5,24- Estigmastadienol	2.18±0.02	2.02±0.0	2.12±0.02	2.08±0.07	1.75±0.09	1.78±0.09	2.02±0.04
Δ-7-stigmastenol	0,46±0.01	0,29±0.0	0.38±0.01	0.45±0.03	0.41±0,05	0.39±0,00	0.39±0,00
Δ-7-Avenasterol	0,37±0.04	0,27±0.0	0.28±0.03	0.17±0.01	0.18±0,02	0.16±0,00	0.15±0,02
Triterpenic alcohols (mg/kg)	582±48	238±38	435±131	838±2	1221±24	1298±53	1393±214

Average value $n=3 \pm SD$

Table 3.- Comparative study of the composition of olive pomace oil obtained by mechanical extraction and molecular distillation (OPOD190 MBP) respect to extra virgin olive oil (EVOO).

	OPOD190 MBP	EVOO
Acidity (%)	2.75	<0.8
Triterpenic acids (mg/Kg)	9856	90-190
Oleanolic acid	5450	30-80
Maslinic acid	4406	60-110
Alkyl esters (%)	0.03	-
Waxes (mg/kg)	8827	<250
Unsaponifiable matter (%)	2.80	0.4-2
Squalene (mg/kg)	310	9000
Aliphatic alcohols (mg/kg)	5465	350
Sterols (mg/kg)	4131	1500
riterpenic alcohols (mg/kg)	1298	<100

Table 4.- Parameters obtained with the Power Law model for crude and deodorized olive pomace oils studied.

(K, consistency index; n, flow index, SE, standard error)

	K (Pa·s)	n	SE
Chemical refining			
OPOC C	0.151	0.904	1.967
OPOD CC	0.158	0.889	2.414
OPOC MA	0.127	0.933	1.367
OPOD MAC	0.126	0.940	1.295
Physical refining			
OPOC MA	0.127	0.933	1.367
OPOD MAP	0.070	0.986	1.238
OPOC MB	0.298	0.849	2.220
OPOD140 MBP	0.211	0.886	2.704
OPOD165 MBP	0.186	0.954	3.357
OPOD190 MBP	0.227	0.899	4.510
OPOD215 MBP	0.257	0.880	4.150

Table 5.- Parameters obtained in Texture profile analysis of crude and deodorized olive pomace oils studied.

	Firmness (N)	Cohesiveness (N.s)	Adhesiveness (N.s)
Chemical refining			
OPOC C	0.28	0.22	0.04
OPOD CC	0.29	0.28	0.07
OPOC MA	0.42	0.26	0.05
OPOD MAC	0.30	0.24	0.04
Physical refining			
OPOC MA	0.42	0.26	0.05
OPOD MAP	0.17	0.16	0.01
OPOC MB	0.71	0.37	0.16
OPOD140 MBP	0.54	0.34	0.13
OPOD165 MBP	0.36	0.26	0.07
OPOD190 MBP	0.43	0.30	0.09
OPOD215 MBP	0.54	0.32	0.12

FIGURES

Figure 1. Extraction and refining processes of olive pomace oil from pomace.

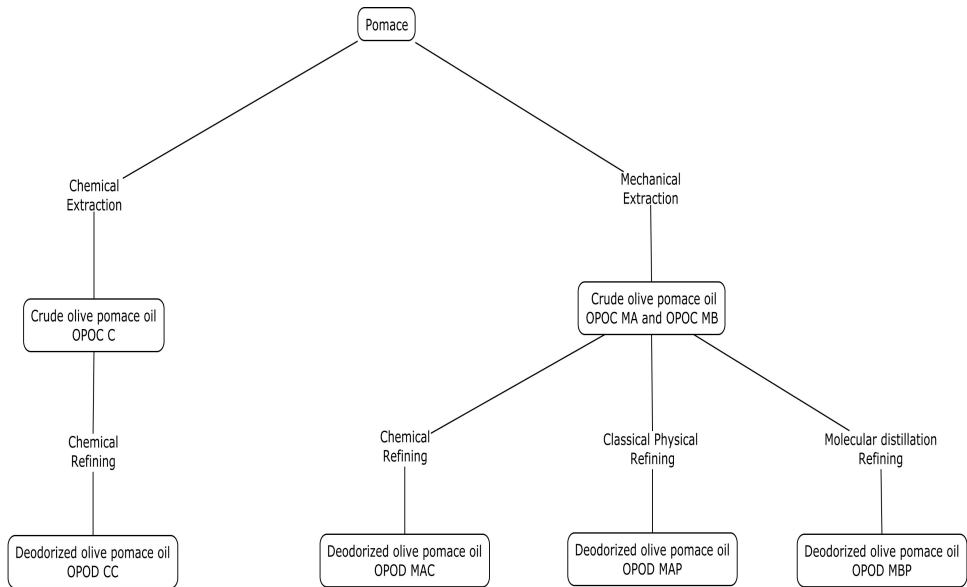


Figure 2. Rheological characterization of olive pomace oils obtained by chemical (OPOC C) and mechanical (OPOC MA) extraction and by chemical refining (OPOD CC and OPOD MAC). A) Oscillatory frequency sweeps B) Flow curves.

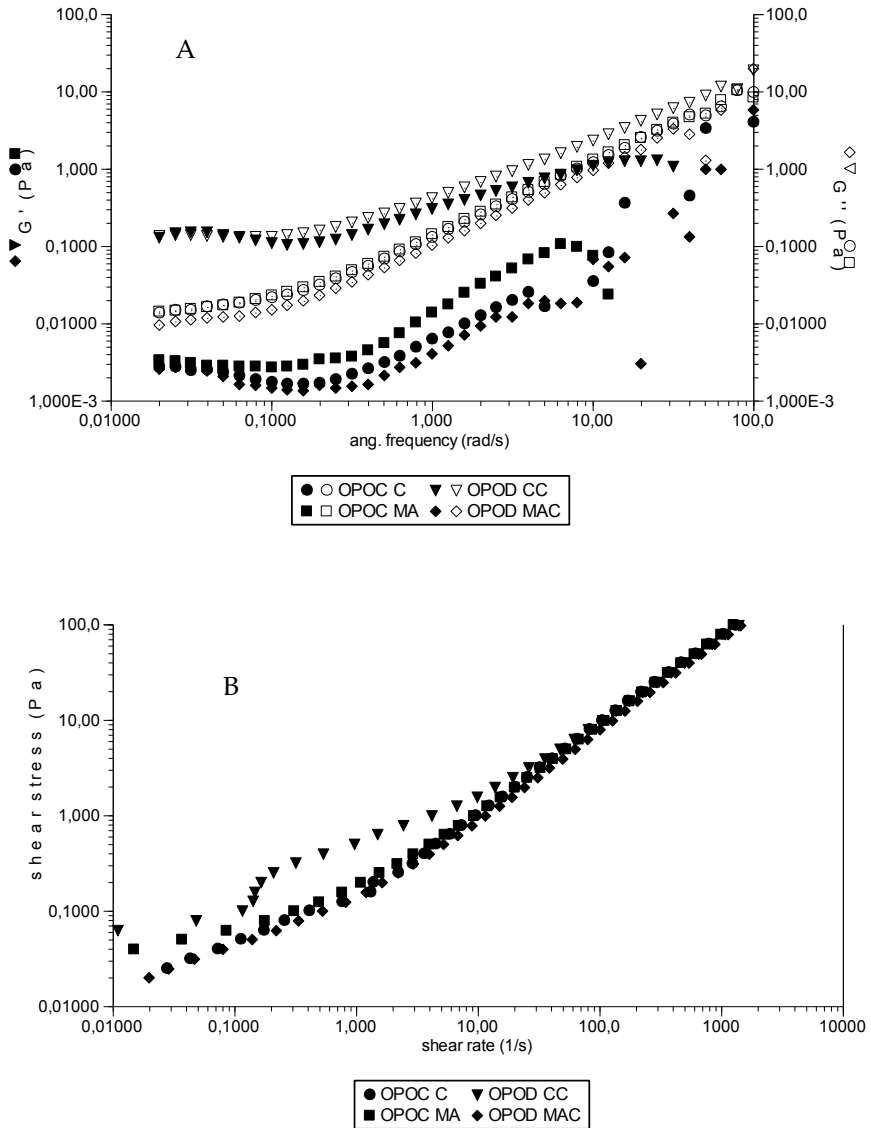


Figure 3. Rheological characterization of olive pomace oils obtained by mechanical extraction (OPOC MA) and by chemical and physical refining (OPOD MAC and OPOD MAP). A) Oscillatory frequency sweeps B) Flow curves.

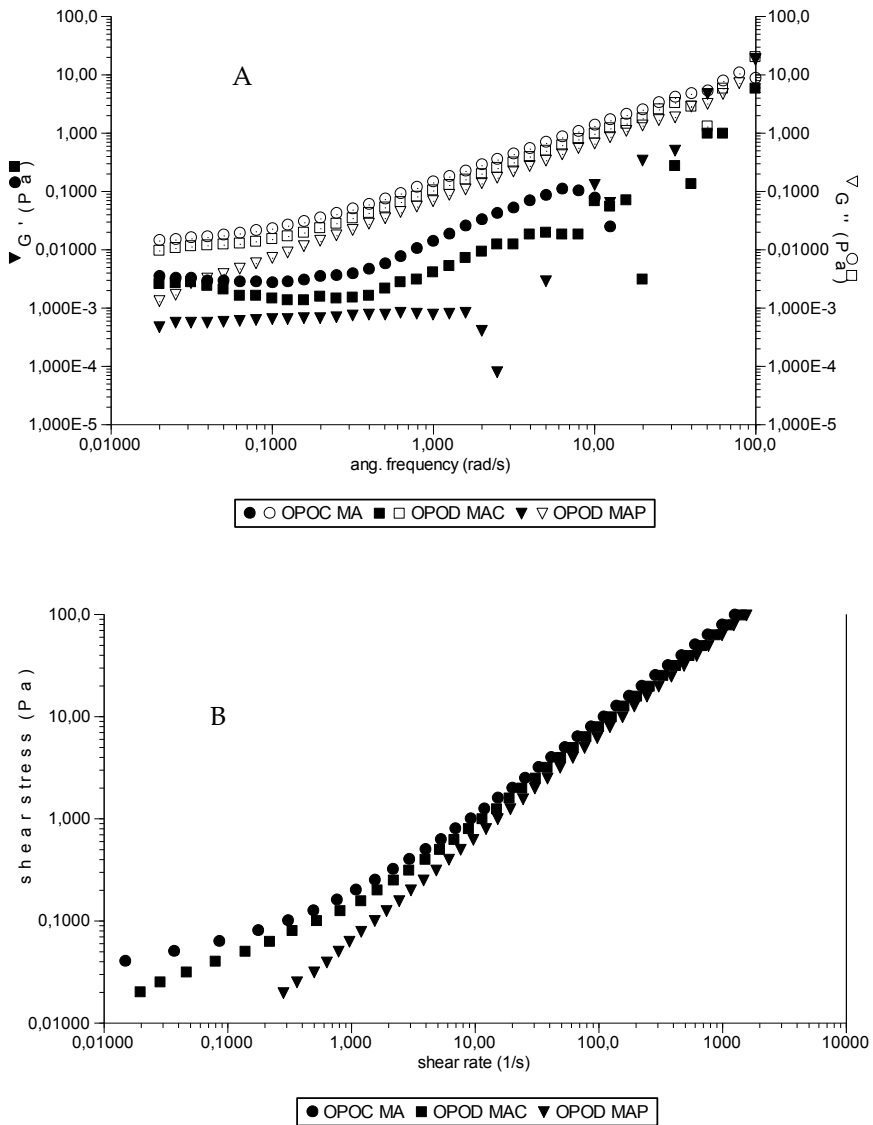


Figure 4. Rheological characterization of deodorized olive pomace oils obtained by classical physical (OPOD MAP) and molecular distillation (OPOD MBP) refining. A) Oscillatory frequency sweeps B) Flow curves.

