



## PIGMENTOS CLOROFÍLICOS Y CAROTENOIDES EN AOV: IMPORTANCIA DE LA PIROFEOFITINA



JUAN BAUTISTA RIVERO MORENO



**PIGMENTOS CLOROFILICOS Y CAROTENOIDES EN AOV: IMPORTANCIA DE LA  
PIROFEOFITINA**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA PRESENTADA POR JUAN BAUTISTA RIVERO  
MORENO PARA OPTAR AL GRADO DE FARMACIA POR LA UNIVERSIDAD DE  
SEVILLA.**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**TUTOR: RAMÓN APARICIO RUIZ**

**ALUMNO: JUAN BAUTISTA RIVERO MORENO**



**Sevilla, febrero de 2021**

**Resumen:** El presente trabajo trata de abordar un tema como es el aceite de oliva virgen y su composición de pigmentos. Estos pigmentos, a su vez, se dividen en clorofílicos y carotenoides.

Asimismo, se introduce el tema hablando sobre la historia del aceite a lo largo de los años en el entorno de la cuenca del mar Mediterráneo y su expansión a nivel mundial en el tiempo actual. Además, se comentan aspectos botánicos sobre el árbol del olivo, características estructurales de la drupa de la aceituna y el proceso de extracción del aceite de oliva. A continuación, se hace referencia a los parámetros de calidad y pureza según el COI que debe obedecer un aceite de oliva virgen.

También, como objetivo de la revisión realizada, se comentan los pigmentos clorofílicos y carotenoides, sus rutas de biosíntesis y las transformaciones que sufren a medida que se extrae el aceite, cuando son separados de su entorno básico en el fruto de la aceituna y reaccionan con facilidad.

Más adelante, se habla sobre los métodos analíticos aplicados para extraer e identificar los pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite de oliva virgen y poder cuantificarlos.

En la parte final de este trabajo, se hace especial énfasis en la síntesis de un derivado clorofílico llamado pirofeofitina *a*, el cual se genera cuando el aceite se almacena durante un tiempo prolongado o se expone a elevada temperatura. A su vez, se abordará la perspectiva de algunos países que establecen determinados porcentajes de este derivado clorofílico para aceptar el comercio de aceites de países externos. De esta forma, se tratará la posibilidad de valorar la cantidad de este componente para determinar una fecha de consumo preferente para un aceite de oliva virgen y el acceso a un aceite lo más fresco posible.

**Palabras clave:** Aceite de oliva, pigmentos, clorofilas, carotenoides, pirofeofitina.

**Abstract:** This paper deals with the subject of virgin olive oil and its pigment composition. These pigments, in turn, are divided into chlorophylls and carotenoids.

It also introduces the subject by talking about the history of oil over the years in the environment of the Mediterranean Sea basin and its expansion worldwide in the present day. In addition, botanical aspects of the olive tree, structural characteristics of the drupe of the olive and the process of extracting olive oil are discussed. Next, reference is made to the quality and purity parameters according to the IOOC that a virgin olive oil must obey.

Also, as an objective of the review carried out, the chlorophyll and carotenoid pigments are commented on, as well as their biosynthesis routes and the transformations they undergo as the oil is extracted, when they are separated from their basic environment in the olive fruit and react easily.

Later on, we will talk about the analytical methods applied to extract and identify the chlorophyll and carotenoid pigments in virgin olive oil and to be able to quantify them.

In the final part of this work, special emphasis is placed on the synthesis of a chlorophyll derivative called pyropheophytin *a*, which is generated when the oil is stored for a long time or exposed to high temperatures. At the same time, the perspective of some countries that establish certain percentages of this chlorophyll derivative to accept the trade of oils from external countries will be addressed. In this way, the possibility of assessing the quantity of this component in order to determine a preferential date for consumption of a virgin olive oil and access to an oil as fresh as possible will be discussed.

**Key words:** Olive Oil, pigments, chlorophylls, carotenoids, pyropheophytin.

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>Resumen</b> .....  | 3  |
| <b>Abstract</b> .....   | 4  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 6  |
| <b>1.1. Olea europaea</b> .....   | 9  |
| 1.1.1. Aspectos botánicos.....  | 9  |
| <b>1.2. La aceituna</b> .....   | 10 |
| 1.2.1. Estructura.....  | 10 |
| 1.2.2. Evolución durante su maduración.....                             | 11 |
| 1.2.3. Variedades cultivadas en España .....                            | 12 |
| <b>1.3. El aceite</b> .....   | 12 |
| 1.3.1. Métodos de extracción.....                                       | 14 |
| 1.3.2. Parámetros de calidad en AOV .....                               | 16 |
| 1.3.3. Parámetros de pureza en AOV.....                                 | 17 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 21 |
| <b>3. METODOLOGÍA</b> .....   | 22 |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....                                  | 23 |
| <b>4.1. Pigmentos clorofílicos</b> .....                                | 23 |
| <b>4.2. Pigmentos carotenoides</b> .....                                | 25 |
| <b>4.3. Métodos analíticos de identificación de pigmentos</b> .....     | 27 |
| <b>4.4. Utilidad de los pigmentos como indicadores de calidad</b> ..... | 31 |
| <b>4.5. Importancia de la pirofeofitina</b> .....                       | 33 |
| <b>5. CONCLUSIONES</b> .....  | 36 |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | 37 |

## 1. INTRODUCCIÓN

En torno a unos seis milenios se aproxima la vinculación entre las civilizaciones humanas y el origen del olivo cultivado, siendo considerado uno de los árboles más importantes de la cuenca del Mediterráneo al sufrir una gran expansión y aumento en su cultivo. La extensión del olivar va ligada a la difusión de la civilización humana gracias a las diferentes formas de usarlo como forraje para el ganado, alimento o madera, tanto los olivos cultivados como silvestres (Besnard et al., 2017).

Todo apunta a una diseminación hacia la isla de Chipre y dirigida a Anatolia o encaminada desde la isla de Creta a Egipto, todo esto partiendo de un progreso del cultivo entre el área entorno al sur del Cáucaso hacia la meseta iraní y las zonas costeras del Mediterráneo de Siria y Palestina (Figura 1).

Crece de forma abundante y brotan densos bosques en Asia Menor donde se atribuye el origen del olivo silvestre. Seguidamente, a través de Anatolia llegaría de Siria a Grecia propagándose por todo el territorio. Sin embargo, distintas conjeturas señalan sobre zonas de Europa, la cordillera del Atlas, Etiopía, Nubia o el bajo Egipto como el área de su origen. Por tanto, el pensamiento más establecido piensa en la cuenca del Mediterráneo como la zona autóctona de este árbol y Asia Menor fuera donde se originará el olivo cultivado. De las únicas civilizaciones antiguas que no tienen relación con el olivo fueron asirios y babilonios en Asia Menor.

El olivo llega a Sicilia, Túnez y Tripoli desde haber sido propagado por los países mediterráneos en el siglo VI a. C., llegando hasta el sur de Italia. Avanzó de Calabria a Liguria, llegando del sur al norte del país transalpino. El pueblo bereber ya conocía técnicas de injerto de aceitunas silvestres y tenía establecido el cultivo sobre los territorios que habitaban, cosa que observaron los romanos al llegar al norte de África.

El olivo en Córcega se cree que fue llevado por los genoveses tras caer el Imperio Romano, en Cerdeña, sin embargo, aparece en la época romana. En Marsella fue introducido en el año 600 a.C. y pasa a la zona de la Galia. Continuó, la expansión a través del imperio romano que lo usó en sus conquistas en torno a los países ribereños al Mediterráneo como arma pacífica (International Olive Council, 2020).

En España serían romanos los encargados de dar continuidad al cultivo del olivo (*Olea europaea* L.) y difundirlo desde el siglo II a.C., mientras que griegos y fenicios lo expandieron por los países de la cuenca mediterránea y se sitúa el origen de su cultivo en la antigua Mesopotamia. Por otro lado, fue la cultura árabe la que buscó potenciar y mejorar el cultivo para permanecer tras siglos. Posteriormente, con el descubrimiento de América en el siglo XV llegó a este

continente el cultivo del olivo, por lo que a día de hoy se encuentra sobre todos los continentes este preciado árbol (Casanovas Castro, 2012).



**Figura 1.** Propagación de olivo por la cuenca del mar Mediterráneo (Fuente: <https://vividmaps.com/olive-tree-in-the-mediterranean-bassin/>).

A la llegada de fenicios y romanos se atribuye la introducción en cuanto a nuevas variedades del olivo en la región y su desarrollo como cultivo ya que se han extraído huesos de aceituna carbonizados de asentamiento de la Edad de Bronce, los cuales sugieren aceitunas domesticadas de milenios antes en el sur y este de la Península Ibérica (Besnard et al., 2017).

Actualmente, los países mediterráneos como son España, Italia y Grecia abarcan una producción de aceite oliva en torno a un 77% a nivel mundial. Por otro lado, países como pueden ser Egipto, Siria, Marruecos, Turquía, Túnez y Portugal asimismo poseen una elaboración elevada de aceite, aunque el rendimiento de este suele ser escaso. Por ello, los países de la cuenca mediterránea comprenden el cultivo del 98% de las aceitunas del mundo.

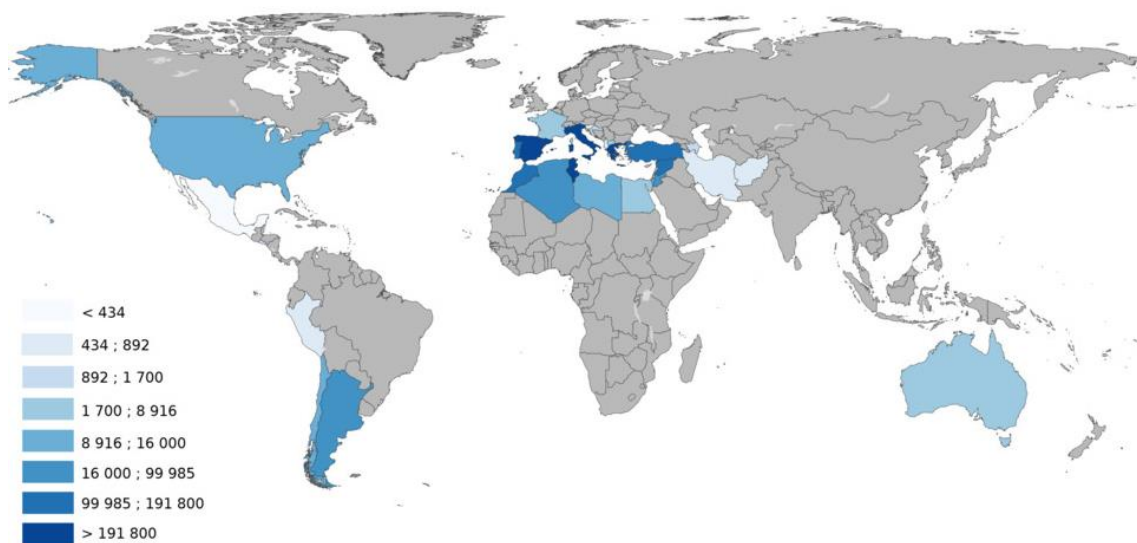
La cuenca del mar Mediterráneo alberga una gran diversidad de cultivos de olivos endémicos de una zona concreta y siendo seleccionados para el producto final que se persigue en el caso de que se manufacture aceituna de mesa, aceite de oliva o ambos artículos. De este modo se han reconocido 262 cultivos distintos de olivos en España con 24 de ellos con exclusividad propia de un lugar concreto.

Cuando se trata de extraer aceite poseen mayor protagonismo variedad como Picual, Cornicabra, Hojiblanca y Lechín de Sevilla, representando un porcentaje del 60% respecto a la totalidad de la producción española. Para producir aceituna de mesa, España tiene dentro de su abanico importantes variedades llamadas Gordal Sevillana y Manzanilla de Sevilla (con unas cualidades idóneas en cuanto a rendimiento. Cabe destacar, una variedad polivalente tanto para aceituna de mesa como para aceite como es la variedad Hojiblanca (Mínguez-Mosquera, 2008).

Sin embargo, países o zonas geográficas foráneas al mar Mediterráneo como América del Sur, la India, China o Australia experimentan un incremento en la elaboración y dispendio del aceite de oliva, desde 20 o 30 años atrás.

Hablamos de Argentina cuando nos referimos al país de mayor extensión de tierras de olivar cultivadas en el hemisferio sur, alrededor de unas 30.000 hectáreas. Dentro del Catálogo Mundial de Variedades de Oliva, se encuentra de forma característica el “Arauco” como cultivar reconocido en Argentina. Con unas 24.000 hectáreas plantadas, Chile se encuentra en la segunda posición en América del Sur. Por otro lado, Perú presenta un aumento en su consumo de aceituna de mesa ya que posee una escasa producción de aceite de oliva (con unas 28.000 hectáreas cultivadas). Con unas 10.000 y 1.300 hectáreas se encuentran Uruguay y Brasil de forma respectiva, con una menor producción aceitunera. Fuera de América del Sur, nos trasladamos hasta Australia para apreciar unas 35.000 hectáreas cultivadas de olivas con 11 millones de árboles. Tanto en Australia como en Argentina la mayoría de los olivares poseen sistema de regadío debido a la escasez de precipitaciones (Figura 2).

Las principales variedades cultivadas son españolas e italianas como “Frantoio”, “Picual”, “Manzanilla” y “Arbequina” (Torres et al., 2017).



**Figura 2.** Países productores de aceite de oliva a nivel mundial (Fuente: <https://es.actualitix.com/pais/wld/aceite-de-oliva-paises-productores.php>).



## **1.1.Olea europaea**

### 1.1.1. Aspectos botánicos

Dentro de la familia Oleacea, la cual abarca unas treinta especies, se encuentra el olivo junto con otros árboles como pueden ser la lila, la forsitia, el aligustre o el fresno. Además, aparece el olivo cultivado (*Olea europaea*) y el acebuche u olivo silvestre (*Olea silvestris*). El olivo cultivado que conocemos hoy día procede de la selección mediante manutención y poda de la especie silvestre o acebuche, el cual genera frutos con un tamaño inferior, de sabor amargo y sin mucha cantidad de aceite además de tener ramas de arbusto, con formas más cuadradas y espinosas.

Cuando hablamos del olivo cultivado, nos referimos a un árbol con un tronco grueso entre un tono gris y verde grisáceo. Tiene hojas coriáceas, pequeñas y perennes, presentando una estructura anatómica con la que evita la pérdida de agua ya que presenta pilosidades en el envés. A la hora de su aspecto general, presenta una altura de 4 a 8 metros en función de la variedad cultivada, tiene un crecimiento generalmente lento y puede llegar a vivir milenios (Figura 3).

Se trata de un árbol con un mayor poder para enraizar alrededor de su etapa juvenil, y en una fase adulta, presenta una capacidad para la reproducción mayor, siendo por esto un árbol polimórfico. Con un crecimiento normal la copa del árbol adquiere una forma redondeada o un poco lobulada y densa, aunque debido a las podas realizadas se va buscando rebajar densidad de ramas para una mayor penetración solar, mediante la cual aumentan las ramas más jóvenes junto con un mayor número de frutos.

En base a unas condiciones climáticas y topográficas de la zona concreta y la variedad del olivo, hasta dos o tres semanas pueden llegar a transcurrir la floración completa del olivo desde que en primavera comienza a liberar las primeras flores. Los responsables de una polinización adecuada son el viento o los insectos, que al ocurrir la fecundación y al cuajar da lugar, al fruto en este caso llamado aceituna (Casanovas Castro, 2012).



**Figura 3.** Fisonomía del olivo (*Olea europaea*) (Fuente: <https://www.internationaloliveoil.org/olive-world/olive-tree/>)

A día de hoy, la forma de cultivo que emerge con mayor fuerza se conoce como sistema de súper alta densidad, se cultivan olivos con una cosecha más rápida y poda mecanizada ya que se plantan alrededor de 1500-2000 árboles por hectárea, mientras que el olivo tradicional abarca una espesura de unos 70-80 árboles por hectárea (Díez et al., 2016).

## **1.2.La aceituna**

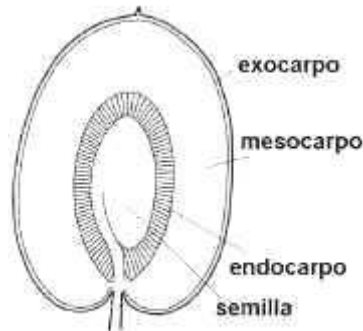
### 1.2.1. Estructura

La aceituna la conforman (desde el interior al exterior del fruto): el endocarpo o hueso, la pulpa o mesocarpo y el exocarpo o piel. Se trata, por tanto, de una drupa con una longitud entre 1 a 4 cm y un diámetro entre 0,6 a 2 cm adoptando una forma elipsoidal o globosa. La semilla está localizada en el interior del endocarpo siendo de origen embrionario mientras que las tres partes que posee la aceituna se originan en la pared del ovario (Figura 4).

Ocurren tres fases dentro de un modelo doble sigmoide, se genera el desarrollo del fruto tras la fecundación:

- La primera fase posee una alta división celular. El mesocarpo presenta un bajo desarrollo y el endocarpo crece hasta casi su tamaño final.

- La segunda fase o esclerificación, se endurece el endocarpo para el posterior desarrollo de la semilla y se observa un crecimiento ralentizado.
- La última fase, ocurre la madurez de la aceituna al aumentar mesocarpo y exocarpo, al desarrollarse el tamaño celular. Además, aumenta de forma conjunta con el incremento de aceite presente en el fruto (Casanovas Castro, 2012).



**Figura 4.** Estructura drupal de la aceituna (Fuente: [http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema6/6\\_1fruto.htm](http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema6/6_1fruto.htm)).

#### 1.2.2. Evolución durante su maduración

Alrededor de unas 8 semanas abarca el periodo en el que la aceituna reúne por completo todo el contenido en aceite en su interior, y posteriormente ocurre la maduración del fruto donde experimenta diversos cambios. Conjuntamente, existen factores que resultan decisivos a la hora de influenciar el completo desarrollo de la aceituna como pueden ser las condiciones climáticas y el modelo de cultivo.

Una vez que el árbol del olivo florece, transcurren en total unas veinte semanas en las que ha ocurrido el crecimiento y maduración de la aceituna. El primer fenómeno que ocurre reside en el desarrollo del ovario, tras ser fecundado, mediante división celular y con una duración de unos 15 días. Tras esto, se ensancha y aumenta el tamaño de la aceituna en unas seis semanas. Posteriormente, tras unas siete semanas se generan cuerpos oleosos y continúa aumentando en tamaño. Estos cuerpos oleosos, donde residen las moléculas lipídicas, quedan albergados por las células del mesocarpo. A continuación, los cuerpos de aceite van acrecentando, junto con la maduración de la drupa, para llegar a fundirse como una gota de aceite que albergue un 40% del volumen de la célula. Pasadas unas 10 semanas, los cuerpos oleosos aumentan hasta ocupar el 60% del volumen celular y adquiere mayor robustez el hueso de la drupa. Hasta la maduración total del fruto va a continuar aumentando la presencia de lípidos. Con el transcurso de unos 120 días se hace notoria la presencia de antocianina dentro de la vacuola proporcionando color

púrpura al epicarpio. Llegados a este punto, la presencia de aceite en la aceituna alcanza valores bastante elevados de manera que comprende un 80% de volumen celular (Nissim et al., 2020).

### 1.2.3. Variedades cultivadas en España

Factores como son la variedad o el estado de maduración determinan la cantidad de aceite en la aceituna. A su vez, este contenido en aceite grasa depende de factores genéticos clasificando de esta forma las distintas variedades de aceitunas (Adakalicy Lazovic, 2018).

**Tabla 1.** Algunas de las variedades de aceitunas más comunes en España (Fuente: <https://www.selectagourmet.com/blog/las-variedades-de-aceituna-mas-cultivadas-en-espana/>).

| VARIEDAD                                | LOCALIZACIÓN  | CARACTERÍSTICAS  |
|---|---|--|
| <b>Picual</b>                           | Cultivo más extendido en Córdoba, Jaén y Granada.   | Elevada productividad, buena aptitud de conservación, alto contenido oleico.                         |
| <b>Cornicabra</b>                       | Notable presencia en Castilla la Mancha, Ciudad Real y Toledo.                            | Aceite con tintes amarillo dorando hacia verdoso. Sabor afrutado, algo amargo y fresco.              |
| <b>Hojiblanca</b>                       | Predomina en Sevilla, Granada, Córdoba y Málaga.  | Aceite de calidad superior, de sabor algo picante y afrutado.  |
| <b>Arbequina</b>                        | Cultivada en Aragón, Huesca, Zaragoza, Cataluña. Ha aumentado recientemente en Andalucía. | Aceite de aroma fresco y afrutado, de color amarillento. Tiene un elevado rendimiento de extracción. |
| <b>Picudo (Carrasqueña de Córdoba).</b> | Casi exclusiva de Córdoba.  | Aceite de olor dulce a manzana, afrutado, dulce y muy equilibrado.                                   |
| <b>Empeltre</b>                         | Presente en Tarragona, La Rioja y Aragón.   | Aceite con toques de manzana y almendra, de color entre dorado y oro viejo, de gran calidad.         |

### 1.3.El aceite

El aceite de oliva es el aceite procedente únicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.), con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Se comercializará según las denominaciones y definiciones siguientes acordes a la normativa COI/T.15/NC No 3/Rev. 13:

Los aceites de oliva vírgenes son aceites que se obtienen del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) únicamente por medios mecánicos u otros medios físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan alteraciones en el aceite, y que no hayan sido sometidos a ningún otro tratamiento que no sea el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. Los aceites de oliva vírgenes se clasificarán y designarán de la siguiente manera:

Aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo tal como están:

i) Aceite de oliva virgen extra: aceite de oliva virgen que tiene una acidez libre, expresada como ácido oleico, de no más de 0,80 gramos por 100 gramos y el otro físico-químico y cuyas características organolépticas corresponden a las fijadas para esta categoría en este estándar.

ii) Aceite de oliva virgen: aceite de oliva virgen que tiene una acidez libre, expresada como ácido oleico, de no más de 2,0 gramos por 100 gramos y el otro físico-químico y cuyas características organolépticas corresponden a las fijadas para esta categoría en este estándar.

iii) Aceite de oliva virgen ordinario: aceite de oliva virgen que tiene una acidez libre, expresado como ácido oleico, de no más de 3,3 gramos por 100 gramos y el otro cuyas características físico-químicas y organolépticas corresponden a las fijadas para esta categoría en esta norma.

Aceites de oliva vírgenes que deben ser procesados antes de su consumo:

Aceite de oliva virgen lampante: aceite de oliva virgen que tiene una acidez libre, expresada en ácido oleico, superior a 3,3 gramos por 100 gramos y/o cuyas características fisicoquímicas y organolépticas corresponden a las fijadas para esta categoría en esta norma. Se destina al refinado o a usos técnicos.

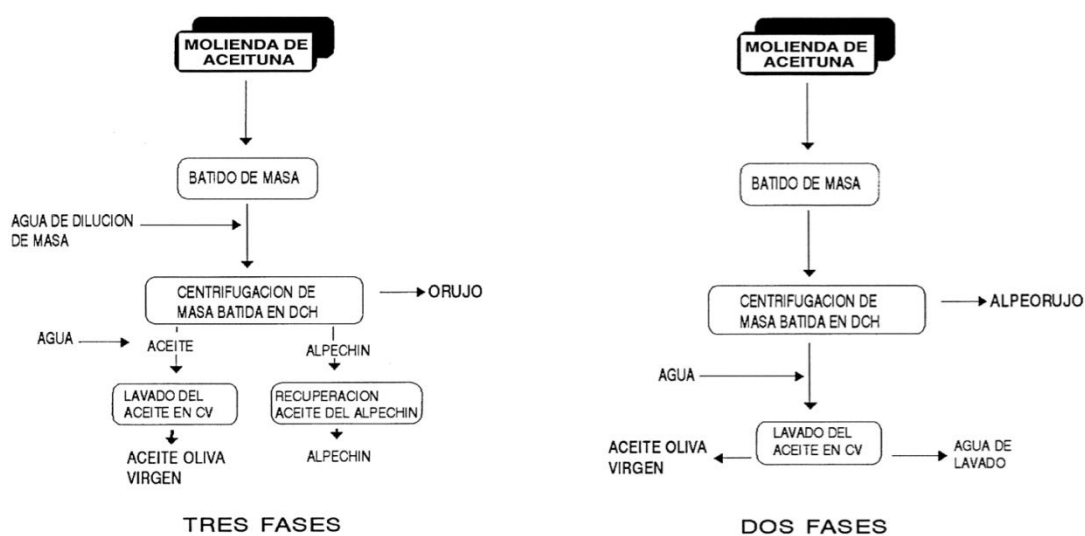
Aceite de oliva refinado: aceite de oliva obtenido a partir de aceites de oliva vírgenes mediante métodos de refinado que no produzcan alteraciones de la estructura glicéridica inicial. Tiene una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 0,30 gramos por 100 gramos y sus demás características fisicoquímicas y organolépticas corresponden a las fijadas para esta categoría en la presente norma.

Aceite de oliva compuesto de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes: aceite constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo tal cual. Tiene una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 1,00 gramo por 100 gramos y sus demás características fisicoquímicas y organolépticas corresponden a las fijadas para esta categoría en esta norma.

El aceite de orujo de oliva es el aceite obtenido por tratamiento del orujo de oliva con disolventes u otros tratamientos físicos, con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza (COI, 2019).

### 1.3.1. Métodos de extracción

La forma más primigenia de obtener el aceite de oliva, aún usado en nuestros tiempos, recae en aplicar presión. Dentro de la pasta (obtenida tras triturar la aceituna) residen fases, líquida y sólida, de donde aflora el aceite mediante percolación, centrifugación o presión (Vekiari y Koutsaftakis, 2002).



**Figura 5.** Representación comparativa entre sistema dos y tres fases de extracción AOV (Fuente: Jiménez et al., 1995).

Las partes que confeccionan una planta moderna continua para triturar la aceituna se trata de un separador centrífugo con un eje horizontal (llamado decantador), algunos malaxadores y una trituradora mecánica. El sobrenombre de continua es debido al transcurso de forma continua tanto de la trituradora como el decantador ya que el malaxador trabaja por lotes, interpuesto entre las demás máquinas (Clodoveo et al., 2014).

Cuando hablamos de la elaboración del aceite de oliva virgen, observamos en la actualidad el predominio de la elaboración a través de sistemas continuos con los que obtenemos las sustancias sólidas a parte de los líquidos ya que se genera una fuerza centrífuga sobre la masa introducida en el interior del sedimentador provocando la separación de las fases.

Dentro de los sistemas continuos diferenciamos dos tipos como son el sistema de tres fases en el que se desglosa orujo, alpechín y aceite, y el sistema de dos fases en el que se extrae orujo muy húmedo, a parte del aceite (Figura 5).

El sistema de dos fases aporta una nueva ventaja a la elaboración del aceite como es la disminución de la producción de alpechín. Además, este método proporciona un incremento en la composición cuantitativa de polifenoles, a la hora de compararlo con el sistema de tres fases, ya que al inyectar masa al decánter utiliza una menor cantidad de agua (Jiménez et al., 1995).

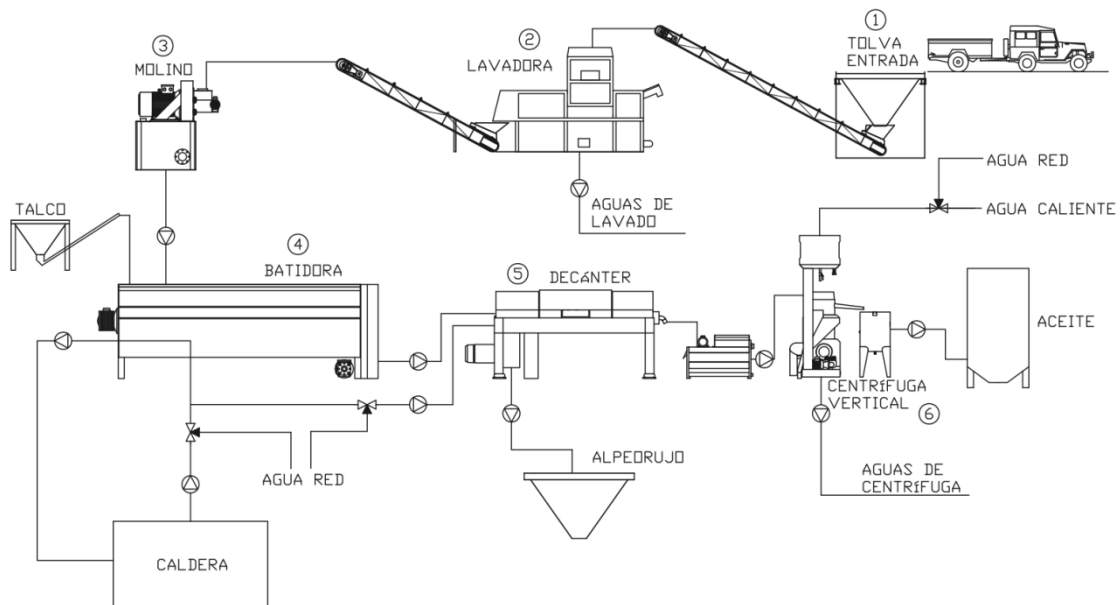
La primera operación a realizar en la elaboración del aceite de oliva virgen consiste en lavar la aceituna que llega a la almazara junto con restos vegetales, piedras o tierra. Tras depurar la aceituna recibida del campo, se realiza la molturación con la finalidad de buscar una pasta mediante la cual se extraerá el aceite que se encuentra depositado en las células de la aceituna.

Obtenemos, por tanto, una pasta compuesta por gotas de aceite, pulpa, agua y restos de hueso de aceituna. A continuación, se inserta la pasta en una batidora (con las posibilidades de incorporar coadyuvantes que predisponen la pasta para su procesado), con el objetivo de mejorar la extracción del aceite, donde se agita mediante palas, se aplica calor para disminuir la viscosidad y todo ello reúna las gotas de aceite y rompa los geles.

Seguidamente, la desigualdad de densidades entre el aceite y el orujo juega un papel clave ya que se utiliza este factor para separarlos en la centrífuga horizontal o decánter, a partir de la pasta que se obtiene de la batidora. Todo el aceite que el proceso no ha logrado extraer hasta ahora junto con los residuos sólidos y la fase acuosa compone el subproducto que recibe el nombre de orujo (Figura 6).

Por otro lado, antes de colocar el aceite en un lugar o recipiente para su almacenaje y conservación, será necesario eliminar componentes que presenta el aceite tras aflorar del decánter como son la elevada humedad que muestra y los restos sólidos.

Para que el aceite tenga los requisitos adecuados para su idoneidad y preservación tendremos que utilizar una centrífuga vertical, a la cual se añade agua, o usar depósitos de acero inoxidable, con los que generamos la decantación del aceite mediante la acción de la gravedad. De esta forma el aceite ya tendremos un aceite con unas condiciones óptimas que será almacenado en una bodega (Cano et al., 2011).



**Figura 6.** Organización clásica de una almazara convencional (Fuente: Cano et al., 2011).

### 1.3.2. Parámetros de calidad en AOV

A continuación, se detallan los parámetros a los que obedece el aceite de oliva para evaluar la calidad que este posea. A partir de los datos recabados, se podrá clasificar dentro de un tipo u otro de aceite y tener un valor concreto.

#### Determinación de la acidez libre

Este método determina el contenido de ácidos grasos libres, expresado como acidez y calculado como el porcentaje de ácido oleico. La muestra se disuelve en una mezcla de disolventes y los ácidos grasos libres presentes se titulan utilizando una solución de hidróxido de potasio o de hidróxido de sodio (COI, 2017).

#### Determinación del valor de peróxido

Este método determina el valor de peróxido, o sea, la cantidad de esas sustancias en la muestra, expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo, que oxidan el yoduro de potasio. Por ello, se aplica el tratamiento de la porción de prueba, en solución en ácido acético y cloroformo, por una solución de yoduro de potasio. Luego, se realiza una valoración del yodo liberado con una disolución de tiosulfato de sodio estandarizado (COI, 2017).



### Determinación de la absorbancia en el ultravioleta

La absorción a las longitudes de onda especificadas en el método se debe a la presencia de dieno conjugado y los sistemas trienales resultantes de los procesos de oxidación y/o las prácticas de refinamiento. La muestra se disuelve en el disolvente requerido y se mide la absorbancia de la disolución en las longitudes de onda especificadas con referencia al disolvente puro (COI, 2019).

### Determinación de la evaluación organoléptica:

El método descrito sólo es aplicable a los aceites de oliva vírgenes y a la clasificación de tales aceites según la intensidad de los defectos percibidos y del afrutado, mediante un grupo de catadores seleccionados, entrenados y supervisados como un panel (COI, 2018).

**Tabla 1.** Parámetros de calidad limitados legalmente del aceite de oliva virgen (AOV).

| PARÁMETROS  | ESPECIFICACIONES  |
|---|-------------------|
| Acidez (%)  | $\leq 2.0$        |
| Índice de peróxidos (meq O <sub>2</sub> /kg)                | $\leq 20$         |
| K <sub>232</sub>  | $\leq 2.50$       |
| K <sub>270</sub>  | $\leq 0.22$       |
| Delta-K   | $\leq 0.01$       |
| Evaluación organoléptica: Mediana del defecto (Md)          | $0 < Md \leq 3.5$ |
| Evaluación organoléptica: Mediana del atributo frutado (Mf) | $Mf > 0$          |

### 1.3.3 Parámetros de pureza en AOV.

A la hora de valorar la pureza que posee un aceite se tienen en cuenta una serie de componentes los cuales se detallan a continuación, junto con la forma de ser cuantificados mediante métodos internacionales de arbitraje.

### Determinación del contenido de triglicéridos con ECN 42 (diferencia entre composición real y composición teórica).

El método se aplica para determinar el posible contenido de aceites de semilla. El contenido teórico de triglicéridos expresados en su número equivalente de carbonos (ECN42) (calculado sobre la base de la determinación de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases) y el contenido de triglicéridos con ECN42 determinado mediante HPLC se engloban dentro de un cierto límite para aceites de oliva genuinos (COI, 2017).

#### Determinación de la composición de ésteres metílicos.

El método permite determinar los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de C12 a C24, incluidos los ésteres metílicos de ácidos grasos saturados, tanto *cis* y *trans* monoinsaturados y poliinsaturados. Para su análisis se emplea una cromatografía de gases de relleno o capilar (COI, 2017).

#### Determinación de la composición en ácidos grasos:

El método se basa en la preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos del aceite de oliva y del aceite de orujo de oliva (COI, 2013).

#### Determinación del contenido en ácidos grasos *trans*:

Se establece la determinación de los ácidos grasos isómeros *trans* mediante análisis a través de cromatografía de gases con columna capilar (COI, 2013).

#### Determinación de la composición y el contenido de esteroides y compuestos alcohólicos por cromatografía capilar de gases.

El método describe un procedimiento para determinar el contenido de compuestos alcohólicos individuales y totales (alcoholes alifáticos, esteroides y dialcoholes triterpénicos). Se parte de la fracción insaponificable del aceite para separar las fracciones de compuestos alcohólicos mediante cromatografía en capa fina utilizando una placa de gel. Las fracciones recuperadas en la separación anterior con gel de sílice se transforman en ésteres de trimetilsililo previo a su análisis por cromatografía de gases en columna capilar (COI, 2020).

#### Determinación del contenido de ceras y ésteres alquílicos

Este método se utiliza para establecer el contenido de ceras y ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos en los aceites de oliva. Para el análisis, se añaden estándares internos al aceite y se separan mediante cromatografía en una columna de gel de sílice hidratado. Luego, la fracción eluida es recuperada con las condiciones de prueba y es analizada de forma directa a través de cromatografía capilar de gases (COI, 2017).

#### Determinación del contenido en eritrodiol + uvaol

Calcular el porcentaje de eritrodiol y uvaol:

$$\text{Eritrodiol} + \text{uvaol} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

Donde:

$A_{Er}$  = El área de eritrodiol;  $A_{Uv}$  = El área de uvaol;  $\Sigma A_T$  = Suma el área para el esterol + el eritrodiol + el uvaol.

Junto con el cálculo del porcentaje relativo de esteroides simples y dialcoholes triterpénicos y la concentración total de esteroides, se debe calcular la concentración de eritrodiol y de uvaol y su suma, en mg/kg de material graso, de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$\text{Eritrodiol} = (A_{Er} \times m_s / A_s \times m) \times 1000; \text{Uvaol} = (A_{Uv} \times m_s / A_s \times m) \times 1000$$

Donde:

$A_{Er}$  = Área de pico de Eritrodiol;  $A_{Uv}$  = Área de Uvaol;  $A_s$  = Área del pico de colestanol  $\alpha$ ;  $m_s$  = Masa de  $\alpha$ -colestanol añadido;  $m$  = Masa de la muestra utilizada para la determinación, en gramos (COI, 2020).

#### Determinación del contenido de estigmastadienos

La presencia de estigmastadienos indica la presencia de aceites refinados, ausentes en aceites vírgenes. En su determinación, se aísla la fracción insaponificable del aceite, y de esta, se separa la fracción de hidrocarburos esteroideos por cromatografía en columna sobre gel de sílice y se analiza mediante cromatografía de gases capilar (COI, 2017).

#### Determinación del contenido de monopalmitato de 2-glicerilo

Este método describe el procedimiento analítico para la determinación del porcentaje de ácido palmítico en la posición 2 de los triacilglicérols mediante la evaluación del monopalmitato de 2-glicerilo. Para ello, la muestra se prepara adecuadamente y se somete a la acción de la lipasa pancreática. A continuación, se hidroliza de forma parcial las posiciones 1 y 3 de la molécula de triacilglicérol, se originan 2-monoacilglicérols como productos de reacción. El % de monopalmitato de 2-glicerilo en la fracción de monoacilglicérol se determina a través de cromatografía capilar de gases (COI, 2017).

**Tabla 2.** Parámetros de pureza del aceite de oliva virgen (AOV) limitados por la legalidad.

| PARÁMETROS                                    | ESPECIFICACIONES  |
|---|---|
| Estigmastadieno (mg/kg)                       | ≤ 0.10  |
| Isómeros <i>trans</i> de ácidos grasos (%)    | tC18:1 ≤ 0.05<br>t(C18:2+C18:3) ≤ 0.05  |
| <b>Composición de ácidos grasos (en %):</b>   |   |
| Palmítico                                     | 7.5 – 20.0  |
| Palmitoleico                                  | 0.3 – 3.5   |
| Heptadecanoico                                | ≤ 0.3   |
| Heptadecenoico                                | ≤ 0.3   |
| Esteárico                                     | 0.5 – 5   |
| Oleico  | 55.0 – 83.0   |
| Linoleico                                     | 3.5 – 21.0  |
| Mirístico                                     | ≤ 0.03  |
| Linolénico                                    | ≤ 1.0   |
| Araquídico                                    | ≤ 0.6   |
| Eicosenoico                                   | ≤ 0.4   |
| Behénico                                      | ≤ 0.2   |
| Lignocérico                                   | ≤ 0.2   |
| Diferencia ECN42 (HPLC) y ECN42               | ≤ 0.2   |
| <b>Composición de esteroides:</b>             |   |
| Colesterol (%)                                | ≤ 0.5   |
| Brassicasterol (%)                            | ≤ 0.1   |
| Campesterol (%)                               | ≤ 4.0   |
| Estigmasterol (%)                             | < Campesterol   |
| β-sitosterol (%)                              | ≥ 93.0  |
| δ-7-estigmastenol (%)                         | ≤ 0.5   |
| Esteroides totales (mg/kg)                    | ≥ 1000  |
| Eritrodiol + Uvaol (%)                        | ≤ 4.5   |
| Esteres metílicos y etílicos de ácidos grasos | Σ FAMEs + FAEEs ≤ 75 mg/kg o<br>75 mg/kg < Σ FAMEs + FAEEs ≤ 150 mg/kg y<br>(FAEEs/FAMEs) ≤ 1,5 |

## **2. OBJETIVOS**

Este trabajo basado en una revisión bibliográfica, persigue como objetivo principal conocer y analizar la importancia de los pigmentos clorofílicos y carotenoides en aceite de oliva virgen (AOV) y haciendo un especial énfasis en el pigmento pirofeofitina, para ello se abordarán los siguientes subobjetivos:

1. Examinar las rutas biosintéticas por las cuales se forman los pigmentos clorofílicos y carotenoides en la aceituna.
2. Estudiar las distintas transformaciones de los pigmentos durante la producción y almacenamiento del aceite de oliva virgen.
3. Revisar las distintas técnicas analíticas adecuadas para la determinación de los pigmentos en el AOV.
4. Evaluar la importancia del pigmento pirofeofitina como posible marcador de la frescura del AOV.

### 3. METODOLOGÍA

Para la realización de esta revisión bibliográfica ha sido necesario realizar una búsqueda de artículos científicos en buscadores como Scopus, pubmed, Scholar google y Dialnet, junto con el empleo para la traducción de textos de DeepLtranslator. Por otro lado, para la búsqueda de información sobre el tema del trabajo se han empleado palabras claves como pueden ser: olive, oil, fruit, extraction, maturation, varieties, chlorophylls, carotenoids, pheophytin *a* o pyropheophytin *a* (escrito en letra mayúscula y AND entre palabras para tener resultados del buscador), así como búsqueda en tesis doctorales, libros y páginas web que tratan sobre el aceite de oliva como por ejemplo la página web del COI (Consejo Oleícola Internacional) o esencia de olivo.com. Se ha utilizado programas como Power Point para elaborar esquemas y el programa Paint para modificar o mejorar alguna imagen.

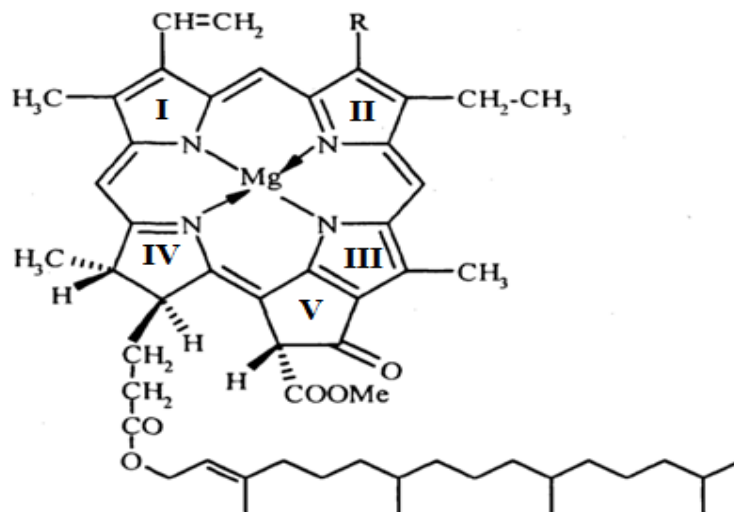
El procedimiento para seleccionar los artículos en los que está fundamentado el trabajo se ha llevado a cabo de la siguiente manera: se empezó estudiando artículos acerca del aceite de oliva en general, su historia, su procedencia, la forma de extraer el aceite, composición y parámetros de calidad y pureza. A continuación, se procedió a investigar acerca de los pigmentos que contiene el aceite, las rutas que siguen para su biosíntesis, las modificaciones que sufren estos desde que se extrae el producto oleico hasta que se lleva a conservar, los métodos analíticos empleados para analizar y cuantificar los pigmentos y se indaga sobre el pigmento pirofeofitina *a* y la posibilidad de establecer una fecha de consumo preferente del aceite.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Pigmentos clorofílicos

Una de las funciones más básicas de las plantas es la fotosíntesis la cual se realiza gracias al predominio de un pigmento como es la clorofila, que ayuda a recoger la energía lumínica mediante fotones y generar poder reductor, además de proporcionar el característico color verde de las plantas.

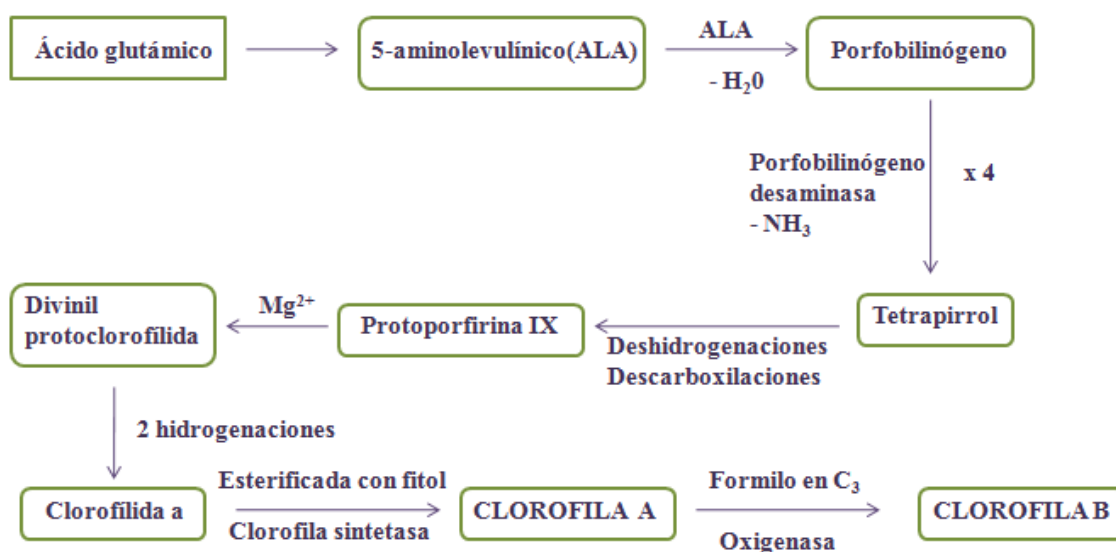
El armazón molecular de la clorofila (Figura 7) queda fijado por cuatro anillos pirrólicos (siendo designados con numeración hasta IV, con uno de ellos reducido). Por ello, el conjunto de estos anillos conforma un anillo tetrapirrólico enlazados todos a partir de átomo de nitrógeno que posee cada unidad y encerrado en su centro un átomo de  $Mg^{2+}$ , quedando una disposición meramente planar y de gran estabilidad. Presenta cierto carácter hidrofóbico a causa de la esterificación del anillo IV anexo a un fitol. Se aprecia, en la molécula de clorofila, el anillo V el cual está unido al anillo III que forma parte del conjunto de anillos tetrapirrólicos enlazados.



**Figura 7.** Disposición molecular tanto de clorofila *a* ( $R = -CH_3$ ) como de clorofila *b* ( $R = -CHO$ ) (Mínguez-Mosquera et al., 2008).

Partimos desde el ácido glutámico para sintetizar el primer intermediario, de la biosíntesis de las clorofilas, como es el ácido 5-aminolevulínico (ALA) que tras unirse con otra molécula de ALA y mediante una deshidratación queda compuesta la molécula de porfobilinógeno. A su vez, entra en juego la enzima porfobilinógenodesaminasa para retirar el  $NH_3$  del enlace de cuatro moléculas de porfobilinógeno originando un tetrapirrol. Seguidamente, obtenemos la molécula

protoporfirina IX, con deshidrogenaciones y descaboxilaciones experimentadas de forma anterior (tetrapirrol). La protoporfirina IX, a su vez, origina la divinilprotoporfirina tras formar un complejo con un catión  $Mg^{2+}$  (fijado en su centro). A continuación, resulta la clorofilida *a*, debido a dos hidrogenaciones sobre la divinilprotoporfirina. A partir de ahí, se forma la clorofila *a* por esterificación con fitol, mediante la enzima clorofila sintetasa. Partiendo de la clorofila *a*, al padecer la inserción de un grupo formilo por acción de la enzima oxigenasa en el C3 previamente ocupado por un metilo, conlleva a la formación del otro subtipo de la clorofila denominado clorofila *b* (Figura 8) (Casanovas Castro, 2012).

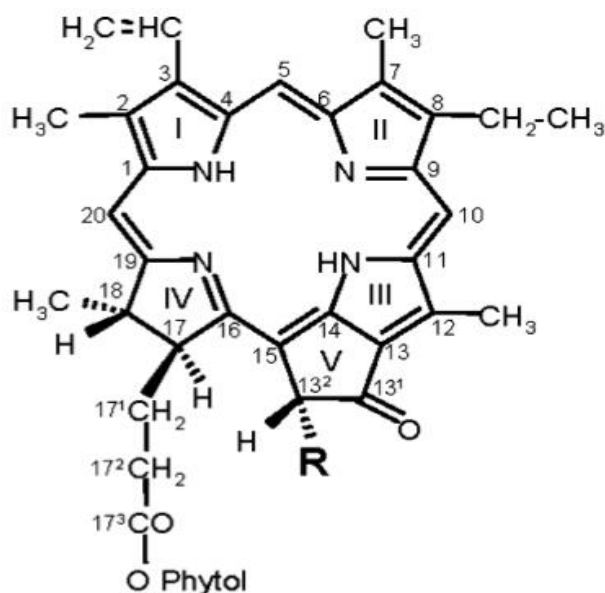


**Figura 8.** Esquema sobre la ruta de biosíntesis de clorofilas *a/b*.

En el aceite de oliva, la parte clorofílica se basa principalmente por feofitinas (*a* y *b*). Cuando se lleva a cabo la extracción del aceite, las clorofilas originales (contenidas en la drupa de la aceituna) pasan a feofitinas en el momento en que el ión central  $Mg^{2+}$  presente en el anillo de porfirina se cambia por  $H^+$ . Los ácidos que se liberan, cuando se muele la aceituna y se bate, son los responsables de este cambio y, además, se visualiza mediante una transformación cromática ya que afecta al grupo cromóforo de la clorofila y torna desde un color verde brillante a marrón oliva. Ciertos aceites pueden contener rastros de las clorofilas originales. La cantidad presente de feofitina (*a* + *b*) supone un 90% de la fracción de la clorofila de un aceite de oliva. Además, en un aceite de oliva virgen, pasados 3-4 meses tras ser conservado el aceite las clorofilas han sido transformadas por completo en feofitinas. Por otro lado, algunos aceites de oliva muestran rastros de derivados de clorofilas fácilmente formados y oxidados en el carbono 13 (OH-feofitinas y lactona-feofitinas), los cuales aparecen como consecuencia de la actividad de enzimas oxidantes en el fruto o las condiciones propias del proceso de extracción. Finalmente, cuando se conserva el aceite en un período prolongado, la feofitina puede transformarse en pirofeofitina. Este compuesto resulta de la de carbometoxilación del C-13<sup>2</sup>. La presencia de este



compuesto en el aceite siempre se ha vinculado con la exposición a fuertes tratamientos térmicos, como puede ser la esterilización. De esta forma, en el aceite de oliva sólo deben aparecer pigmentos del fruto más los derivados relacionados con el proceso de extracción y almacenamiento como: feofitinas (*a* y *b*), algunas clorofilas oxidadas, pirofeofitinas y, a veces, derivados de clorofila desesterificada (Roca et al., 2010).



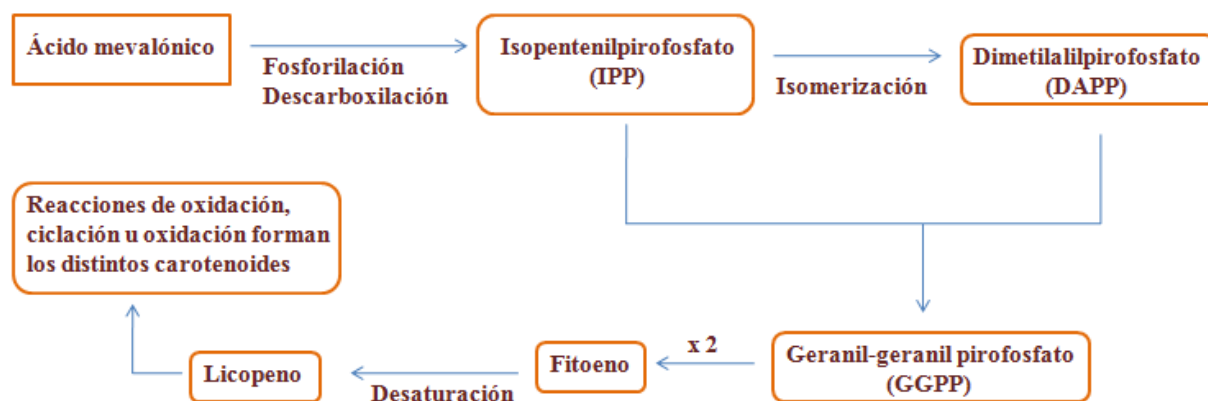
**Figura 9.** Configuración de feofitina *a* (R= COOMe) y pirofeofitina *a* (R= H) (Aparicio-Ruiz et al., 2012).

#### 4.2. Pigmentos carotenoides

Los pigmentos carotenoides tienen la capacidad de captar luz y transferirla a las clorofilas para la vital función de la fotosíntesis. Estos pigmentos, proporcionan las diferentes tonalidades amarillas, anaranjadas y rojas a todo tipo de vegetales. Cuando se habla sobre su composición química, son nombrados como terpenoides. Son 40 átomos de carbonos los que componen su estructura a través de ocho unidades de isopreno. Sin embargo, pueden ocurrir diferentes procesos (deshidrogenación, ciclación, epoxidación, etc) que modifiquen el esqueleto elemental originando diferentes estructuras.

El comienzo de la biosíntesis de los pigmentos carotenoides parte desde el ácido mevalónico para llegar al compuesto isopentenilpirofosfato (IPP), tras ser fosforilado y descarboxilado. A su vez, el IPP sufre una reacción de isomerización originando dimetilalilpirofosfato (DAPP). Seguidamente, como consecuencia de la unión de moléculas de IPP y DAPP se crea el compuesto geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP). Son dos moléculas de GGPP enlazadas las que

producen una molécula denominada fitoeno. Esta última, tras ser desaturada da lugar a licopeno que es el origen de la mayoría de carotenoides tras sufrir esta molécula reacciones de oxidación, ciclación o hidroxilación, o con una mezcla de estas reacciones (Figura 10).

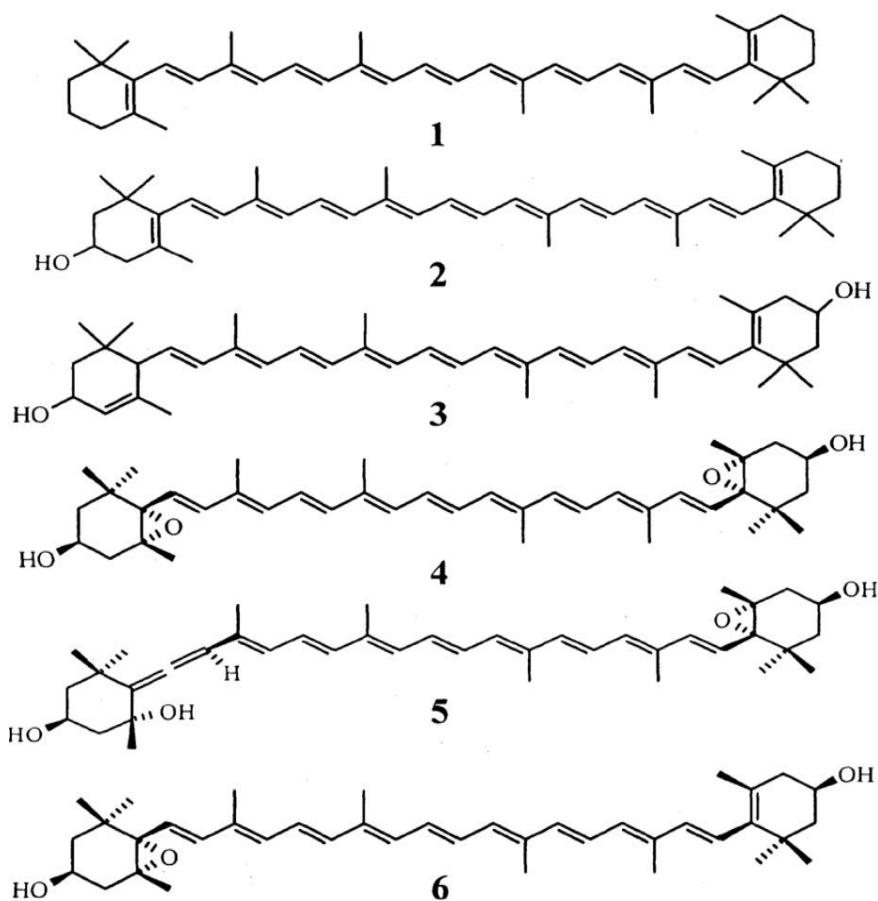


**Figura 10.** Proceso de biosíntesis de pigmentos carotenoides.

Dentro de los pigmentos carotenoides aparecen algunos como el anteraxanteno, neoxanteno, violaxanteno, auroxanteno,  $\beta$ -criptoxanteno,  $\beta$ -caroteno y luteína (presente en mayor cantidad) (Figura 11). Estos elementos, pertenecen al grupo de las xantofilas (formados por C, H y O), excepto el  $\beta$ -caroteno localizado en el grupo de los carotenos (formados por C y H). Además, cabe destacar la función de provitamina A del  $\beta$ -caroteno, ya que la ruptura de su molécula origina dos moléculas de retinol (vitamina A).

Cuando la aceituna va adquiriendo su madurez experimenta una pérdida proporcional de carotenoides, junto con la exhibición en concreto de luteína como pigmento presente en mayor magnitud, en todas las fases de la maduración y en los productos como la aceituna de mesa o aceite de oliva.

Al igual que en el caso de los pigmentos clorofílicos, a medida que avanza la extracción del aceite oliva se origina un ambiente ácido donde las xantofilas (anteraxanteno, neoxanteno y violaxanteno), con grupos epóxidos en su estructura, sufren una reacción de isomerización apareciendo xantofilas epoxidadas (mutatoxanteno, neocromo y auroxanteno). Esto conlleva a un detrimento en cuanto a las tonalidades amarillas. Sin embargo, otros pigmentos carotenoides como luteína,  $\beta$ -criptoxanteno y  $\beta$ -caroteno no experimentan ninguna modificación estructural (Mínguez-Mosquera et al., 2008).



**Figura 11.** Formas moleculares referentes a pigmentos carotenoides presentes en el AOV, ordenados numéricamente: 1, β-caroteno; 2, β-criptoxanteno; 3, luteína; 4, violaxanteno; 5, neoxanteno; 6, anteraxanteno. (Mínguez-Mosquera et al., 2008).

#### 4.3. Métodos analíticos de identificación de pigmentos

A continuación, se describen dos métodos centrados en la obtención de un concentrado de pigmentos como son la extracción líquido-líquido y la extracción mediante fase sólida. Seguidamente, se comenta la cuantificación de pigmentos a través de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

##### Método de extracción líquido-líquido (LLE):

La finalidad de esta técnica consiste en preconcentrar la muestra y eliminar interferentes antes de la separación y cuantificación por otras técnicas. Para ello, se extraen ciertos componentes de una muestra jugando con la solubilidad de estos compuestos sobre dos disolventes inmiscibles.

Esta extracción, utiliza un disolvente denominado N,N-dimetilformamida (DMF), el cual conforma la fase acuosa donde (debido a una polaridad compatible) quedarán retenidos

componentes como: xantofilas, clorofilas y derivados clorofílicos. Por otro lado, habrá otro disolvente orgánico denominado hexano que compondrá la fase orgánica, donde se adhieren xantofilas esterificadas, carotenos y lípidos de interferencia.

La actuación para llevarlo a cabo comienza disolviendo unos 10-15 gramos de muestra a analizar (aceite de oliva) con 100 mL de DMF llevado saturada con  $MgCO_3$ . De la disolución anterior se realizan cinco extracciones en un embudo de decantación utilizando 50 mL de hexano (en este extracto queda retenido principalmente el pigmento  $\beta$ -caroteno). Para conseguir los pigmentos a partir de la fase DMF es necesario incorporar 400 mL de NaCl al 10% a una temperatura de unos 4 °C; removiendo de forma suave para luego extraer con 100 mL de éter etílico; se aplica una temperatura baja debido a la formación de una reacción exotérmica. A continuación, se produce de nuevo la extracción de la fase acuosa de fondo con éter etílico para asegurar que se extraiga de forma cuantitativa los pigmentos que queden en esta, y discriminar otros compuestos como pueden ser polifenoles o aquellos solubles en esta fase. Posteriormente, se unen las fases de éter etílico y se filtran con agente desecante como es el  $Na_2SO_4$ . Se obtiene, por tanto, una fase sin agua que se lleva a evaporar en rotavapor aplicándose temperaturas inferiores a 30 °C. Finalmente, se obtiene un residuo que se reconstituye en un volumen adecuado de acetona (1,5 mL) y queda almacenado a una temperatura de -20 °C en condiciones de ausencia de luz, de forma previa al análisis cromatográfico. Antes de ser analizada, la muestra se tiene que centrifugar o filtrar (tabla 3).

Por ello, ocurren cinco extracciones consecutivas con hexano que se combinan, se secan con  $Na_2SO_4$  y se concentran mediante evaporación hasta un volumen de 25 mL en un matraz volumétrico. Luego, se utiliza una medición espectrofotométrica a 454 nm para determinar la concentración de carotenos ( $\beta$ -caroteno).

#### Método de extracción mediante fase sólida (SPE):

Esta es una técnica (SPE) la cual tiene un bajo costo, resulta versátil y es simple. Se describe la técnica de purificación mediante el uso de distintos absorbentes como pueden ser el C18, el diol y el gel de sílice. Los pigmentos carotenoides luteína y  $\beta$ -caroteno se retienen adecuadamente en las fases C18 y C30 (apolares), en cambio son más apropiadas, para la retención de luteína, las fases de diol y gel de sílice (polares). Para los derivados clorofílicos se aprecia que la fase C18 no retiene totalmente la feofitina *a* (Gandul-Rojas et al., 2013).

Cuando al análisis del aceite de oliva, se inicia una activación del cartucho con metanol, siendo acondicionado con hexano. Seguidamente, se mezcla 1g de la muestra (aceite) junto con 4-6 mL de hexano se vierte en la columna (Cartucho SPE). Un matraz volumétrico será el encargado de recoger el disolvente. Además, hay una serie de lípidos que producen interferencias y los cuales

se retiran aplicando un lavado del cartucho con hexano, siendo recogido en el mismo matraz volumétrico, hasta 10 mL. Seguidamente, se emplean 3-5 mL de acetona para eluir los analitos y el disolvente se evapora con una temperatura menor a 30 °C en rotavapor hasta secarse. Finalmente, se obtiene un residuo que se disuelve en un volumen adecuado de acetona (0,2-0,3 mL) y se conserva al abrigo de la luz a -20 °C, a la espera del análisis cromatográfico (Gandul-Rojas et al., 2013).

Después del lavado con hexano, algunos pigmentos como  $\beta$ -caroteno y cierta cantidad de feofitina *a* y pirofeofitina *a*, no son retenidos en los cartuchos con C18. Sin embargo, estos analitos pueden llevarse a medir de forma cuantitativa con el uso de técnicas espectrofotométricas, tras llevar a 10 mL en el matraz volumétrico la fase de hexano. Por ello, feofitina *a* y pirofeofitina *a*, se miden conjuntamente a 660 nm (tabla 4) y  $\beta$ -caroteno a 454 nm en el espectrofotómetro. Además, se deduce que el uso de dos cartuchos de C18 (con carácter apolar) reducen las pérdidas, obteniéndose un mejor porcentaje de recuperación de derivados clorofílicos. Por otro lado, cartuchos que utilizan una fase de diol (con carácter polar) posibilitan una retención elevada de compuestos clorofílicos y xantofilas (tabla 3) (Gandul-Rojas et al., 2013).

**Tabla 3.** Comparativa entre los dos métodos analíticos de preconcentración de la muestra.

| TÉCNICA                          | COMPONENTES  | OBJETIVOS   | CARACTERISTICAS  |
|----------------------------------|--|---|--|
| Extracción líquido-líquido (LLE) | N,N-dimetilformamida (DMF) (acuoso), hexano (orgánico), éter etílico, acetona. | Separación de compuestos, mediante su polaridad, empleando dos disolventes inmiscibles.                                 | de<br>mediante<br>empleando<br>dos disolventes<br>necesidad<br>cantidad considerable de disolventes. |
| Extracción en fase sólida (SPE)  | Cartucho con adsorbente (C18, diol o gel de sílice), metanol, hexano, acetona. | Separar compuestos de interés mediante la adsorción en una fase sólida y posterior elución de los compuestos retenidos. | Económica, versátil, simple, única etapa, recupera 100% del analito.                                 |

Método de separación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

Para cuantificar los pigmentos que contiene el aceite de oliva, distinguimos dos tipos de técnicas cromatográficas como son: las que emplean una fase estacionaria normal, con carácter polar, y las que usan una fase estacionaria inversa, con carácter apolar. En el caso de utilizar el método de HPLC con fase normal para determinar clorofilas, feofitinas y  $\beta$ -caroteno en aceite de oliva

se emplea hexano/2-propanol (98,5:1,5 v/v) mediante condiciones isocráticas, es decir, el uso de un único disolvente como fase móvil. Esto tiene el inconveniente de que no favorece la elución de luteína debido a una escasa polaridad, pigmento carotenoide relevante en el aceite de oliva virgen. Por ello, con el objetivo de poner remedio a este problema, se fija un gradiente entre n-Hexano/2-propanol (99:1, v/v) (A) y 5% de 2-propanol (B) logrando la determinación de forma conjunta de  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, clorofilas *a* y *b*, feofitinas *a* y *b*, y luteína en un intervalo de tiempo de unos 20 minutos.

Desde otro punto de vista, el gradiente final puede ajustarse para comprobar la presencia de una adición de compuesto Cu-clorofilas (colorante E-141i) en el aceite de oliva. Para ello, se mantiene 100% B durante 15 minutos ya que estos compuestos tienen una polaridad inferior a los derivados clorofílicos (Gandul-Rojas et al., 2013).

De forma reciente, se ha planteado una inyección directa de la muestra de aceite cuando se diluye al 33% en metil ter-butyl éter (MTBE)/metanol (1:1) consiguiendo una separación efectiva para luteína,  $\beta$ -caroteno y feofitina *a*. Por otro lado, otra forma de plantear la separación cromatográfica se basa en emplear un extracto concentrado de pigmentos (obtenidos mediante una técnica de extracción) y una fase estacionaria C30. Con ello, se aumenta el tiempo de análisis y se consigue una buena resolución de unos 19 pigmentos. Con el empleo de fase estacionaria C30, se logra una separación más eficiente respecto a isómeros *cis-trans*, luteína,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno. Sin embargo, esta forma sería más adecuada para aceites altamente pigmentados como es el caso del aceite de palma, por ello, no resulta adecuado su uso en el aceite de oliva (Gandul-Rojas et al., 2013).

Cuando se pretende determinar clorofilas y carotenoides se utiliza la medición de su absorbancia con el uso de un detector de fotodiodos. Entonces, se usa una longitud de onda con un valor de 430 nm para una detección conjunta, porque está situada entre la absorbancia máxima de feofitina *a* (410 nm) y de clorofila *b* (466 nm); los otros pigmentos tienen sus máximos de absorción entre las dos longitudes de onda mencionadas. El uso de sus respectivos patrones permite identificar los pigmentos y conocer las características del espectro UV-vis registrado en el rango de 350 a 800 nm empleándose un detector de fotodiodos. Por otro lado, otras longitudes de onda tales como 650 nm o 633 nm son utilizadas para la medición fraudulenta de los ya mencionados compuestos cúpricos de clorofilas (colorante E-141i) en el aceite de oliva. (Gandul-Rojas et al., 2013).

De forma general, cuando se establecen condiciones analíticas con 10 g de aceite de oliva virgen concentrados mediante extracción líquido-líquido en 1,5 mL de acetona, de los cuales se inyectan 20  $\mu$ L en el cromatógrafo de líquidos (HPLC) unido a una matriz de diodos (Diode Array Detector, DAD), proporciona límites de detección inferiores a 6,6 ppb. Además, se

aprecia mayor selectividad y límites de detección más bajos cuando se usan detectores de fluorescencia para compuestos clorofílicos (tabla 4) (Gandul-Rojas et al., 2013).

**Tabla 4.** Equiparación entre los métodos de separación.

| TECNICA  | CARACTERISTICAS   | VENTAJAS  |
|--|---|---|
| <b>Técnicas espectrofotométricas</b>                   | Medición de analitos de forma cuantitativa  | Mide conjuntamente feofitina <i>a</i> y pirofeofitina <i>a</i> a 660 nm                             |
| <b>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</b> | Cuantificación e identificación de pigmentos clorofílicos y carotenoides, presentes en la muestra | Elevada sensibilidad, determinación cuantitativa con exactitud, adecuada para especies no volátiles |
| <b>Detector de fotodiodos (DAD)</b>                    | Acoplado al HPLC, determina pigmentos mediante diferentes longitudes de onda                      | Detección conjunta a longitud de onda de 430 nm   |
| <b>Detector de fluorescencia</b>                       | Determinan compuestos clorofílicos  | Mayor selectividad e inferior límite de detección   |

#### 4.4. Utilidad de los pigmentos como indicadores de calidad.

Cabe mencionar que el color del aceite de oliva se debe a una variedad cromática reflejada como consecuencia de pigmentos clorofílicos y carotenoides. Cuando visualizamos una aceituna con una maduración más pronunciada, se hace presente el color negro de la drupa debido al aumento de antocianinas y con una respectiva disminución del contenido en clorofilas. Sin embargo, posteriormente sólo quedarán en el aceite de oliva las clorofilas y los carotenoides, ya que serán retiradas las antocianinas dentro de la fase acuosa, al poseer un carácter hidrófilo.

A medida que avanza la maduración del fruto, los pigmentos clorofílicos y carotenoides muestran cambios. En cuanto a la clorofila, se observa una disminución continua con el progreso de la maduración pasando de un color verde a negro. Durante las etapas de maduración, el pigmento clorofila *a* está en concentración 2-3 veces superior al pigmento clorofila *b*. En variedades como Blanqueta, el pigmento clorofila se retira casi de forma completa en la etapa de maduración y, como consecuencia, las drupas de aceituna adquieren una tonalidad amarilla pálida produciendo un aceite de oliva de color pálido.

Respecto a la fracción carotenóide se visualiza un detrimento de la concentración a medida que avanza la maduración. La luteína será el pigmento principal en todas las etapas de maduración. Para el caso de las aceitunas de la variedad Arbequina, donde se han visto xantofilas esterificadas, el detrimento de la concentración de carotenoides es menor a causa de la compensación del catabolismo por el proceso carotenógeno que produce la biosíntesis de los ésteres (Mínguez-Mosquera et al., 2008).

Desde otro punto de vista, estableciendo las mismas concentraciones iniciales de un aceite respecto a sus pigmentos, la velocidad a la que se degradan estos pigmentos son constantes. Por ello, el vínculo entre pigmento carotenoides y clorofílicos se mantiene alrededor de la unidad. Se observa que la tasa de degradación de pigmentos carotenoides es más elevada que en el caso de pigmentos clorofílicos. Sin embargo, esta relación entre pigmentos va disminuyendo durante la temporada de producción del aceite de oliva virgen. Por lo tanto, la velocidad de decoloración que existe entre los pigmentos es mayor cuando se alcanza el final de la temporada de molienda (Aparicio-Ruiz y Gandul-Rojas, 2014).

Por otro lado, ciertas variedades de aceituna manifiestan diferentes rutas biosintéticas de formación de pigmentos que caracterizan en este sentido a ciertas variedades, tales como, la variedad Blanqueta y Arbequina. En estas variedades se encuentran pigmentos exclusivos que indican la autenticidad de un aceite monovarietal producido a partir de estas variedades. Más concretamente, para el caso de los frutos de la variedad Arbequina aparecieron (neoxanteno y violaxanteno) esterificadas con ácidos grasos (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996). Así, la presencia de xantofilas esterificadas con ácidos grasos nos permitiría discernir entre distintos tipos de variedades de aceite.

En el caso de la variedad Blanqueta se observan derivados de la hidroxiclороfila tras un mecanismo de catabolismo clorofílico específico de esta variedad Blanqueta. De esta forma, se llega a razonar la posibilidad de distinguir algunos cultivares en función del contenido total de pigmentos (clorofílicos y carotenoides) y mediante el análisis de la composición individual de carotenoides.

Hasta ahora se ha hablado sobre los cambios endógenos que experimenta el perfil de pigmentos. A continuación, se pretende comentar los cambios exógenos del perfil de pigmentos y su vinculación con la calidad y autenticidad. Por ello, otro punto a tener en cuenta ocurre cuando los pigmentos clorofílicos se afectan por un entorno ácido y su color cambia desde un color verde a marrón grisáceo, proceso denominado feofitización de clorofilas donde se sustituye un  $Mg^{2+}$  por  $H^+$  dentro del grupo cromóforo (en el anillo de porfirina). Como consecuencia de ello, hay fabricantes que añaden algunos colorantes alimentarios para obtener un color verde permanente y enmascarar un color marrón-grisáceo en el envase, posiblemente causa una de



mala praxis. Se observan dos colorantes naturales con mayor uso como son E-140 y E-141 vinculados de forma estructural con la clorofila. La normativa de la Unión Europea impide aplicar colorantes al aceite de oliva. Estos dos colorantes se clasifican según la solubilidad que posean como "i" para formas liposolubles o "ii" para hidrófilas. Existen métodos analíticos capaces de identificar colorante E-141i (complejos cúpricos de clorofilas) en un aceite adulterado. Por otro lado, el E-141ii (también se denomina como complejo cúprico de clorofilas) presenta un empleo más pronunciado como colorante verde debido a su carácter hidrófilo e intensa estabilidad del color verde, siendo este colorante el más fácil de usar para fortalecer el color verde de un aceite de forma fraudulenta. Este colorante (E-141ii) procede de la mezcla de distintos tipos de compuestos cuclóricos derivados de la clorofila natural mediante alcalino hidrólisis. Debido al alto contenido en lípidos y composición de pigmentos del aceite requieren una metodología específica para su análisis. De esta forma, con un análisis adecuado de los pigmentos de un aceite se pueden observar compuestos usados de forma fraudulenta para ocultar defectos del producto como un cambio de color pardo con la presencia de pirofeofitina *a* (Romero del Río, 2015), como en este caso el uso del colorante E-141ii (Gandul-Rojas et al., 2012).

#### **4.5.Importancia de la pirofeofitina**

Ciertos productos como pueden ser los vinos tintos manifiestan un aumento en cuanto a la calidad con el proceso de envejecimiento. En este caso, cuando se habla del aceite de oliva virgen ocurre todo lo contrario puesto que a medida que transcurre el tiempo se producen procesos oxidativos que deterioran el producto. Se deduce, por tanto, la continua oxidación del aceite (aunque sea congelado, incluso) desde que es extraído, llegando a alcanzar connotaciones indeseables o defectos sensoriales como pueden ser un sabor rancio tras un largo e inadecuado almacenamiento (Aparicio-Ruiz et al., 2014).

Por otro lado, la relación entre calidad y frescura puede llevar en muchos casos a confusión puesto que son términos que no están relacionados. Existen componentes que varían su concentración a lo largo de la vida de un aceite, aunque estos no siempre implican un detrimento sobre las propiedades de aroma o sabor.

Así, se estima que parámetros que evalúan la frescura tienen que ser aislados de los que analizan la calidad sensorial. De este modo, el tiempo que pasa desde que se elabora un aceite se asocia a

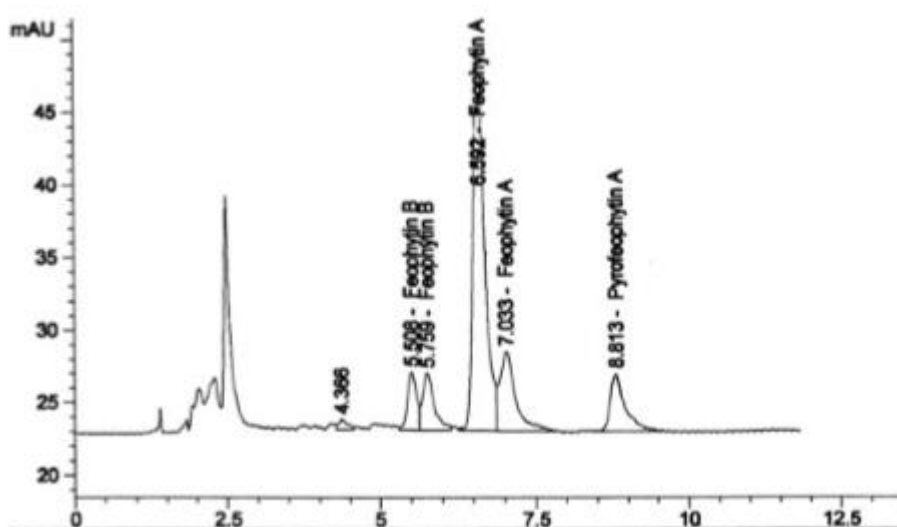
la frescura y se tiene que medir con compuestos químicos que no produzcan una sobreestimación o subestimación (Aparicio-Ruiz et al., 2014).

La aparición del derivado clorofílico (pirofeofitina *a*), cuando la feofitina pierde un grupo carbometoxi en el C13<sup>2</sup> (Mínguez-Mosquera et al., 2008), muestra un aumento debido a la presencia de energía (ya sea una fuente de temperatura o de luz) durante la vida útil del aceite de oliva virgen (García-González et al., 2017). El contenido de pirofeofitina *a* que contiene un aceite se determina mediante el área del pico cromatográfico de la pirofeofitina *a* en relación con las áreas del pico de las feofitinas (*a* y *a'*) individuales y de la pirofeofitina *a*. A su vez, el contenido de pirofeofitina *a* queda expresado como porcentaje (% de PPP) de área. Se utiliza la letra W asignada al % de área de pirofeofitina *a*, y se emplea la siguiente fórmula:

$$W = (PPP_A * 100) / (PPP_A + \sum (PP))$$

Donde:

- PPP<sub>A</sub> es el pico del área de la fracción de pirofeofitina *a*
- $\sum (PP)$  es el sumatorio de las áreas de picos de feofitina *a* y *a'* (Gertz y Fiebig, 2006).



**Figura 12.** Cromatograma mediante HPLC de un aceite de oliva con un 13% de pirofeofitina *a*. Se aprecia, de izquierda a derecha, picos de feofitina *b*, feofitina *a* y pirofeofitina *a* (Fuente: Gertz y Fiebig, 2006).

Además, se ha demostrado que la formación de este compuesto se produce aun cuando es conservado el aceite de oliva virgen durante un año a 15 °C, sin llegar a superar un 3% de pirofeofitinas, mientras que, tras 24 meses a temperatura de 25 °C se alcanza alrededor del 14% de pirofeofitinas (Figura 12) (Mínguez-Mosquera et al., 2008). Para medir la cantidad de

pirofeofitina *a* en un aceite, tras haber sido extraído, este debe contener sólo los pigmentos derivados relacionados con el proceso de extracción y almacenamiento como son: feofitinas (*a* y *b*), clorofila oxidada, pirofeofitina *a* y, a veces, derivados de clorofila desesterificada (Roca et al., 2010).

De esta forma, con la conversión de feofitina *a* a pirofeofitina *a*, algunos investigadores han llegado a valorar esta información para detectar la presencia de aceites de oliva virgen sometidos a desodorización suave. Estos componentes, revelan de forma exclusiva, por tanto, si un aceite ha sufrido un almacenamiento inadecuado desde su extracción hasta llegar a ser tomado por el consumidor. Sin embargo, los organismos californianos, australianos y sudafricanos han establecido la presencia de pirofeofitina *a* como una forma de comprobar la frescura de un aceite de oliva virgen extra. Así mismo, estos tres organismos determinan un 17% como el porcentaje máximo de pirofeofitina *a* (PPP<sub>A</sub>) que puede contener un aceite de oliva virgen extra. Debido a esto, los foros científicos debaten a día de hoy la relación entre la calidad sensorial y la pirofeofitina *a* puesto que no existe una relación causal entre estos dos aspectos. Sin embargo, es evidente que el porcentaje de PPP<sub>A</sub> se incrementa con el paso del tiempo, a causa de la temperatura y, también de forma menor, a causa de la luz. De esta forma, se trata de un marcador apropiado para el adecuado o inadecuado almacenamiento de los recipientes de aceite de oliva virgen extra mientras es transportado o almacenado en la estantería de un supermercado. (García-González et al., 2017).

Así pues, los organismos reguladores han determinado ciertos requisitos específicos referentes a las condiciones en las que se almacena el aceite de oliva. Por ello, el Consejo Oleícola Internacional (COI) ha aprobado un documento con una serie de normas para unas adecuadas prácticas de conservación del aceite de oliva. Sin embargo, es complicado establecer una forma de evaluación para conocer la fecha de “consumo preferente”. Por tanto, cuando se intenta conocer mejor la vida útil de los aceites de oliva virgen es necesario un estudio en profundidad sobre los parámetros que influyen en el proceso, y las relaciones que se establecen entre ellos (Lobo-Prieto et al., 2020).

## 5. CONCLUSIONES

1. Los pigmentos clorofílicos y carotenoides son compuestos extremadamente lábiles cuando no están dentro de su entorno o ambiente natural (fruto íntegro). Así, varían su estructura debido a los ácidos generados durante el proceso de extracción y ciertas enzimas presentes en la aceituna.
2. Determinados pigmentos pueden revelar la presencia de un aceite monovarietal concreto, tales como la variedad Arbequina o Blanqueta.
3. La determinación del perfil pigmentos de un aceite de oliva virgen puede discernir la presencia de pigmentos exógenos (colorantes) con motivos de mejorar el aspecto visual del aceite de oliva virgen a causa de una mala praxis (fraude).
4. La pirofeofitina *a* se puede considerar como un marcador de frescura del aceite de oliva virgen y a través de este, valorar la fecha de consumo preferente bajo condiciones adecuadas de almacenamiento.
5. La producción mundial del aceite de oliva tiene la necesidad de unificar criterios, sobre la utilidad de la pirofeofitina *a*, y evitar problemáticas al comercio entre países.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Adakalic M., Lazovic B. Morphological, Chemical and Molecular Characterization of ‘Old olive’ (*Olea europaea* L.) from Montenegro. 2018; *Braz. Arch. Biol. Technol.* 61: e18170767.

Aparicio-Ruiz R., Aparicio R., García-González. Does “Best Before” Date Embody Extra-Virgin Olive Oil Freshness?. 2014; *J. Agric. Food Chem.* 62: 554–556.

Aparicio-Ruiz R., Gandul-Rojas B. Decolouration kinetics of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by autoxidation. 2014; *Food Research International.* 65: 199- 206.

Aparicio-Ruiz R., Mínguez-Mosquera M. I., Gandul-Rojas B. Thermal Degradation Kinetics of Chlorophyll Pigments in Virgin Olive Oils. 1. Compounds of Series a. 2010; *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58: 6200-6208.

Aparicio-Ruiz R., Roca M., Gandul-Rojas B. Mathematical Model To Predict the Formation of Pyropheophytin a in Virgin Olive Oil during Storage. 2012; *J. Agric. Food Chem.* 60: 7040–7049.

Barbaro B., Toietta G., Maggio R., Arciello M., Tarocchi M., Galli A., Balsano C. Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. 2014; *Int. J. Mol. Sci.* 15: 18508-18524.

Besnard G., Terral J. F., Cornille A. On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. 2018; *Annals of Botany.* 121: 385-403.

Cano Marchal P., Gómez Ortega J., Aguilera Puerto D., Gámez García J. Situación actual y perspectivas futuras del control del proceso de elaboración del aceite de oliva virgen. 2011; *Revista Iberoamericana de Automática e Informática industrial.* 8: 258–269.

Casanovas Castro M. Metabolismo de compuestos fenólicos en olivas y estudio de aceites de oliva singulares de la provincia de Lleida. 2012; Tesis Doctoral. Universidad de Lleida.

Cichelli A., Pertesana G. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification. 2004; *Journal of Chromatography A*, 1046: 141–146.

Clodoveo M. L., Dipalmo T., Schiano C., La Notte D., Pati S. What’s now, what’s new and what’s next in virgin olive oil elaboration systems? A perspective on current knowledge and future trends. 2014; *Journal of Agricultural Engineering*; 45: 193.

COI (International Olive Council). Consultado en octubre de 2020. Disponible en: <https://www.internationaloliveoil.org/olive-world/olive-tree/>.

COI. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. 2019; COI/T.15/NC n° 3/Rev. 7.

COI. Determination of free fatty acids, cold method. 2017; COI/T.20/Doc. N° 34/Rev. 1.

COI. Determination of peroxide value. 2017; COI/T.20/Doc. N° 35/Rev.1.

COI. Spectrophotometric investigation in the ultraviolet. 2019; COI/T.20/Doc. N° 19/Rev. 5.

COI. Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. 2018; COI/T.20/Doc. N° 15/Rev. 10.

COI. Method for the determination of stigmastadienes in vegetable oils. 2017; COI/T.20/Doc. N° 11/Rev. 3.

COI. Determination of fatty acid methyl esters by gas chromatography. 2017; COI/T.20/Doc. N° 33/Rev.1.

COI. Determination of the difference between actual and theoretical content of triacylglycerols with ECN 42. 2017; COI/T.20/Doc. N° 20 /Rev. 4.

COI. Consultado en noviembre de 2020. Determination of the sterol composition and content and alcoholic compounds by capillary gas chromatography. COI/T.20/ Doc. N° 26/Rev. 4.

COI. Determination of the percentage of 2-glyceryl monopalmitate. 2017; COI/T.20/Doc. N° 23/ Rev. 1.

COI. Determination of the content of waxes, fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography. 2017; COI/T.20/Doc. N° 28/Rev.2.

COI. Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. 2019; COI/T.15/NC N° 3/Rev. 13.

Díez C. M., Moral J., Cabello D., Morello P., Rallo L., Barranco D. Cultivar and Tree Density As Key Factors in the Long-Term Performance of Super High-Density Olive Orchards. 2016; Front. Plant Sci. 7: 1226.

Esencia de Olivo, 2020. Consultado en octubre de 2020. Disponible en: <https://www.esenciadeolivo.es/aceite-de-oliva/tipos-de-aceite-de-oliva/>.

Gandul Rojas B., Gallardo Guerrero L., Garrido Fernández J., Mínguez Mosquera M. I. Control de pigmentos clorofílicos y carotenoides por HPLC en el aceite de oliva virgen. 1991; *Grasas y Aceites*. 42(1): 56-60.

Gandul Rojas B., Mínguez-Mosquera M. I. Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oil oils from various spanish olive varieties. 1996; *J. Sci. Food Agric*. 72: 31-39.

Gandul-Rojas B., Gallardo-Guerrero L., Roca M., Aparicio-Ruiz R. Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Color Issues. 2013; Chapter 7, *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 219-260. Aparicio R. y Harwood J. (Editores). 2º Edición, Springer, New York.

Gandul-Rojas B., Roca M., Gallardo-Guerrero L. Detection of the color adulteration of green table olives with copper chlorophyllin complexes (E-141ii colorant). 2012; *LWT - Food Science and Technology*. 46: 311-318.

García-González D. L., Tena N., Romero I., Aparicio-Ruiz R., Morales M. T., Aparicio R. A study of the differences between trade standards inside and outside Europe. 2017; *Grasas y Aceites* 68(3): e210.

García-González D. L., Aparicio-Ruiz R., Morales M. T. Chemical characterization of organic and non-organic virgin olive oils. 2014; *OCL*, 21(5): D506.

Gertz C., Fiebig H-J. Pyropheophytin a – Determination of thermal degradation products of chlorophyll a in virgin olive oil. 2006; *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 108: 1062–1065.

Jiménez Márquez A., Hermoso Fernández M., Uceda Ojeda M. Elaboración del aceite de oliva virgen mediante sistema continuo en dos fases. Influencia de diferentes variables del proceso en algunos parámetros relacionados con la calidad del aceite. 1995; *Grasas y Aceites*. 46(4-5): 299-303.

Lobo-Prieto A., Tena N., Aparicio-Ruiz R., Morales M. T., García-González D. L. Tracking Sensory Characteristics of Virgin Olive Oils During Storage: Interpretation of Their Changes from a Multiparametric Perspective. 2020; *Molecules*, 25: 1686.

Martínez F., Moyano M. J., Alba J., Ruiz M. A., Hidalgo F., Heredia F. J. Método rápido de obtención de aceite de oliva virgen para determinación de acidez. 1999; *Grasas y Aceites*. 50(2): 122-126.

Mínguez-Mosquera M. I., Gandul-Rojas B., Gallardo-Guerrero L., Roca M., Hornero-Méndez D. Color Quality in Olive Products. 2008; In color quality of fresh and processed foods. Chapter 22p 294-310. ACS Symposium Series Vol. 983.

Nissim Y., Shloberg M., Biton I., Many Y., Doron-Faigenboim A., Zemach H., Hovav R., Kerem Z., Avidan B., Ben-Ari G. High temperature environment reduces olive oil yield and quality. 2020; PLoS ONE. 15(4): e0231956.

Roca M., Gallardo-Guerrero L., Mínguez-Mosquera M. I., Gandul-Rojas B. Control of Olive Oil adulteration with copper-chlorophyll derivatives. 2010; J. Agric. Food Chem. 58: 51–56.

Tena N., Wang S. C., Aparicio-Ruiz R., García-González D. L., Aparicio R. An in-depth assessment of analytical methods for olive oil purity, safety and quality characterization. 2015; J. Agric. Food Chem. 63: 4509-4526.

Torres M., Pierantozzi P., Searles P., Rousseaux M. C., García-Inza G., Miserere A., Bodoira R., Contreras C., Maestri D. Olive cultivation in the southern hemisphere: flowering, water requirements and oil quality responses to new crop environments. 2017; Front. Plant Sci. 8: 1830.

Vekiari S. A., Koutsaftakis A. The effect of different processing stages of olive fruit on the extracted olive oil polyphenol content. 2002; Grasas y Aceites. 53(3): 304-308.

Vergara-Domínguez H., Ríos J. J., Gandul-Rojas B., Roca M. Chlorophyll catabolism in olive fruits (var. Arbequina and Hojiblanca) during maturation. 2016; Food Chem. 212: 604-611.