

R. 4267

I
356

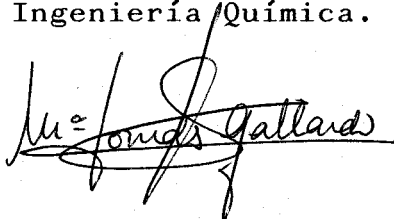
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

" COMPOSICIÓN CLOROFÍLICA Y CAROTENOIDE
DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.
FACTORES DETERMINANTES "

Memoria presentada por la Licenciada
LOURDES GALLARDO GUERRERO, al Plan de
Doctorado en Ingeniería Química.



Sevilla, Enero 1990

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA

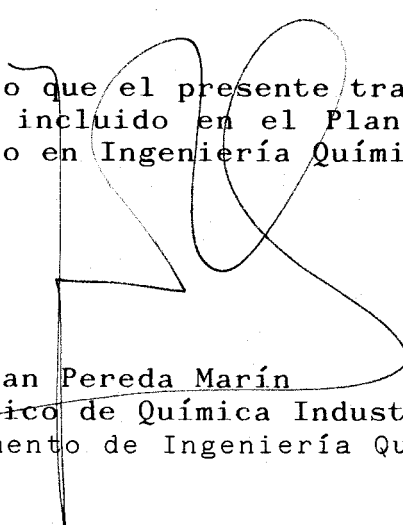
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA



Certifico que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad Estructural de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa y sus Derivados. Sevilla.

f/ Dra. M. Isabel Mínguez Mosquera
Investigador Científico del
C.S.I.C.

Certifico que el presente trabajo está incluido en el Plan de Doctorado en Ingeniería Química.



f/Dr. Juan Pereda Marín
Catedrático de Química Industrial
Departamento de Ingeniería Química

AGRADECIMIENTO

Al Dr. D. Juan Pereda Marín, Tutor del Plan de Doctorado en Ingeniería Química del que esta Memoria forma parte, por sus apreciadas sugerencias.

A la Dra. Dña. M^a Isabel Mínguez Mosquera, Directora de esta Memoria, por su constante estímulo y apoyo.

Al Dr. D. Juan Garrido Fernández, por su inestimable y constante ayuda en el desarrollo de este trabajo .

A Dña. Beatriz Gandul Rojas, por su valiosa colaboración y compañerismo.

Al Dr. D. Antonio Garrido Fernández, Jefe de la Unidad Estructural de Biotecnología de Alimentos, a la Dra. Dña. M^a del Carmen Dobarganes García, Directora del Instituto de la Grasa y sus Derivados, y al resto de compañeros, que de una u otra forma han contribuido a la realización de este trabajo.

A la Escuela de Capacitación Agraria de Cabra (Córdoba), a la Cooperativa Ntra. Sra. de los Desamparados de Puente Genil (Córdoba), y a la Almazara Experimental del Instituto de la Grasa y sus Derivados por las muestras suministradas.

I N D I C E

I N D I C E

	<u>Página</u>
1.- INTRODUCCION	1
2.- OBJETIVO	5
3.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	7
3.1.- EVOLUCION DEL MERCADO DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN DURANTE LAS UL- TIMAS DECADAS	7
3.2.- ALMACENAMIENTO DE ACEITUNAS EN TROJES	11
3.2.1.- INFLUENCIA SOBRE LA ACIDEZ LIBRE	15
3.2.2.- INFLUENCIA SOBRE LA ESTABI- LIDAD	15
3.2.3.- INFLUENCIA SOBRE EL OLOR Y SABOR	16
3.2.4.- INFLUENCIA SOBRE EL COLOR ..	17
3.3.- PIGMENTOS CLOROPLASTICOS	17
3.3.1.- GENERALIDADES	17
3.3.2.- CLOROFILAS	20
- Estructura y función	20
- Derivados clorofílicos ...	22
3.3.3.- CAROTENOIDES	26
- Estructura y función	26

	- Valor nutritivo y farmacológico de los carotenoides	31
3.4.-	ENZIMAS OXIDATIVAS:LIPOXIGENASA	33
3.4.1.-	GENERALIDADES	33
3.4.2.-	INFLUENCIA SOBRE EL AROMA DE ALIMENTOS	35
3.4.3.-	DECOLORACION DE PIGMENTOS ...	37
	- Decoloración de carotenoides	37
	- Decoloración de clorofilas	39
3.4.4.-	INHIBICION DEL ENZIMA	41
3.4.5.-	EXTRACCION DEL ENZIMA	41
3.4.6.-	MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPOXIGENASA	42
4.-	MATERIALES Y METODOS	43
4.1.-	MATERIA PRIMA EMPLEADA	43
4.1.1.-	PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS .	43
	- Experiencia de maduración .	43
	- Experiencia de almacenamiento	43
	- Experiencia industrial	43
4.1.2.-	PREPARACION DE LAS MUESTRAS .	44
	- Formación del troje	44
	- Extracción del aceite en laboratorio a nivel experimental	44
	- Extracción del aceite a nivel industrial	45

4.1.3.- TOMA DE MUESTRAS	45
4.2.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LIPOXIGENASA	46
4.2.1.- PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO	46
4.2.2.- PREPARACION DEL SUSTRATO	47
4.2.3.- ENSAYO ENZIMATICO	47
4.3.- PREPARACION DE EXTRACTOS DE PIGMENTOS	49
4.3.1.- EXTRACTO PURIFICADO DE MATERIA GRASA	49
4.3.2.- EXTRACTO DE CAROTENOIDES	51
4.4.- SEPARACION DE PIGMENTOS	53
4.5.- IDENTIFICACION DE PIGMENTOS.....	54
4.5.1.- CLOROFILAS	54
4.5.2.- FEOFITINAS	54
4.5.3.- CAROTENOIDES	55
4.6.- CUANTIFICACION	56
4.7.- APARATOS UTILIZADOS	57
5.- RESULTADOS Y DISCUSION	59
5.1.- IDENTIFICACION DE PIGMENTOS	59
- Pigmentos clorofílicos	59
- Pigmentos carotenoides	61
5.2.- EXPERIENCIA DE LA MADURACION	62
- Frutos	63
- Aceite virgen	65

5.3.- EXPERIENCIA DE ALMACENAMIENTO	66
- Frutos	67
- Actividad de lipoxigenasa .	69
- Aceite extraido de aceitunas atrojadas	71
5.4.- EXPERIENCIA INDUSTRIAL	73
5.5.- EFECTO DE LA MADURACION DE LOS FRUTOS TIEMPO DE ALMACENAMIENTO Y PROCESO DE EXTRACCION, SOBRE EL CONTENIDO FINAL EN PIGMENTOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN	76
- Pérdida de clorofilas	76
- Aumento de carotenoides ..	78
5.6.- VALOR DE PROVITAMINA A DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN	80
6.- CONCLUSIONES	81
7.- BIBLIOGRAFIA	83

1.- INTRODUCCION.

El cultivo del olivar comenzó hace unos 6000 años en los países del Mediterráneo oriental y se atribuye a sirios y palestinos el desarrollo de las variedades que, con destino a la producción de aceite, habían de extenderse por todos los países mediterráneos (1).

El olivo, *Olea europaea* L., es la especie más conocida y difundida de la familia de las Oleáceas, extendiéndose principalmente su cultivo por los países de la cuenca del Mediterráneo. Las variedades principales son dos: *Olea europaea* L. var. *Sativa*, que es la forma cultivada y la *Olea europaea* L. var. *Oleaster*, que es la forma salvaje.

El olivo cultivado puede alcanzar una altura de 6 - 10 metros. Las hojas son lanceoladas o ligeramente elípticas y de color gris-verdoso por su parte inferior. La variedad salvaje, conocida vulgarmente como acebuche, tiene forma de arbusto, con ramas más o menos espinosas, hojas oblongas y frutos pequeños elípticos de color rosado oscuro.

El árbol florece en Mayo con flores blancas y pequeñas, y casi inmediatamente después, en Mayo o Junio, empieza a formarse el fruto que madura hacia el final del otoño. Esta oliva o aceituna es una drupa verde, carnosa, comestible y más o menos ovalada según la variedad. Durante la maduración el color se va oscureciendo hasta adquirir un tono púrpura negruzco, al mismo tiempo que aumenta su contenido en aceite.

Una parte de la cosecha mundial de aceitunas, sobre todo las de ciertas variedades, son aderezadas según diversos tratamientos y se utilizan directamente como aceitunas de mesa (2) (3), pero la mayor parte de los frutos se destinan a la producción de aceite de oliva. Las aceitunas maduras contienen un 15 - 30 % de aceite de extraordinaria calidad que, cuando se extrae en las debidas condiciones, posee un aroma y sabor muy agradables y puede destinarse sin más tratamientos para el consumo humano (4).

En España, el olivo es la especie frutal más importante en cuanto a superficie plantada. Sus dos millones de hectáreas representan el 12 % del área total cultivada y sus productos igual porcentaje de la producción total agrícola. Además, su cultivo es fundamental en numerosas comarcas agrícolas, tanto por su considerable aportación a la economía de las mismas como por su valor social como generador de mano de obra (5).

El aceite de oliva virgen es el que se extrae de los frutos del olivo mediante procedimientos mecánicos, con exclusión de cualquier tratamiento químico. El mejor aceite se consigue a partir de frutos sanos cosechados con el grado exacto de maduración.

Gracias a las recientes investigaciones en el campo médico, bioquímico y de la nutrición, el aceite de oliva ha sido notoria y justamente revalorizado, y situado, por sus propiedades biológicas y sus características organolépticas, en una posición privilegiada de la alimentación humana.

Desde el punto de vista dietético resulta ser la más digestible de las grasas y además, el elevado contenido de ácido oléico hace de él una excelente fuente de energía para los cardiopáticos. La presencia de cantidades apropiadas de ácido linoleico, ácido graso esencial, satisface equilibradamente las exigencias del hombre de cualquier edad.

El aceite de oliva tiene además la capacidad de proteger la mucosa intestinal, de prevenir la úlcera y de actuar favorablemente en caso de enfermedades biliares. Contrariamente a las grasas animales, tienen la propiedad de reducir el exceso de colesterol en la sangre.

Con la entrada de España en el Mercado Común se abren nuevas expectativas hacia el gran mercado europeo, y el aceite de oliva virgen está empezando a tener una entidad y valoración desconocida hasta la fecha, lo cual va a permitir una mayor libertad de intercambio, pero a su vez, para que nuestros productos sean competitivos se necesitarán unos determinados niveles de calidad.

Las campañas de información a través del COI dirigidas a aumentar el consumo de aceite de oliva virgen en países potencialmente consumidores, en particular EE.UU., han surtido el efecto esperado, superando en estos momentos, la tendencia alcista del consumo a la de producción.

Es por ello, que todos los esfuerzos que se realicen para mejorar la calidad de los productos

derivados del olivo, serán una inversión rentable que ayudará a mantener y aumentar las vías de calidad para el comercio interior y exterior.

2.- OBJETIVO.

Durante la maduración y post-recolección de los frutos, la degradación celular está acompañada de la oxidación de los ácidos grasos insaturados que forman parte de los componentes lipídicos de las membranas. Esta reacción está catalizada por el enzima lipoxigenasa. El color y el aroma del aceite de oliva virgen podría verse afectado por la ausencia o presencia de este tipo de enzimas oxidativas, durante el tiempo que los frutos permanecen almacenados en trojes antes de la molturación.

Los pigmentos que dan color a la aceituna y posteriormente al aceite de oliva son clorofilas y carotenoides. Estos compuestos en determinadas condiciones pueden sufrir oxidación y degradarse a productos incoloros. En esta reacción median los radicales libres formados por la acción de la lipoxigenasa sobre los ácidos grasos insaturados con sistema cis-cis 1,4 pentadieno (6) (7).

Aunque no se conoce exactamente los mecanismos de esta catálisis de co-oxidación, si se sabe que se requiere la presencia del sustrato específico de la lipoxigenasa.

Es un hecho conocido que, durante el almacenamiento, los frutos suelen sufrir alteraciones que llegan a provocar la desintegración de las paredes celulares.

Estas reacciones se inician después de la recolección con la autólisis o autodescomposición de

la materia orgánica, que poco a poco va reemplazando a la respiración y a la madurez organizada. La célula vegetal pierde su resistencia vital y, con ella, el control sobre los compuestos químicos presentes, cuya distribución y reactividad había regulado anteriormente para conservar las características de los tejidos vivos.

Al acometer el presente estudio, en el aceite de oliva virgen, se ha tratado de dilucidar cómo inciden sobre el contenido y clase de pigmentos, el estado de madurez en que se recolectan los frutos, tiempo de almacenamiento en trojes y el proceso de extracción de aceite. Así mismo se controla la evolución cualitativa y cuantitativa de pigmentos en frutos y aceites procedentes de una almazara industrial, durante la época de campaña.

El carácter provitamínico, anticancerígeno y antiúlcera que últimamente se atribuye a los pigmentos carotenoides, unido a la polémica intervención, en unión de clorofilas y sus productos derivados, en los procesos oxidativos por su papel potencial en la estabilidad del aceite de oliva, hacen que su estudio sea objeto de la mayor importancia (8) (9).

3.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

3.1.- EVOLUCION DEL MERCADO DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN DURANTE LAS ULTIMAS DECADAS.

En el periodo de 1979-1983, el valor medio de la aceituna recolectada en España para almazara fue de 1.909.100 Tm. En relación a la producción de aceite, en este mismo periodo, se obtuvo un rendimiento del 21,5 % de aceites vírgenes, correspondiendo a la Comunidad Andaluza el 76,75 % (10).

Respecto al número de almazaras, cuya actividad se centra fundamentalmente en la molturación y extracción de los aceites vírgenes, desde el periodo 1955-1960 en el que se contabilizaban 7.000, en la actualidad su número se ha reducido por debajo de los 3.000. La regresión registrada en el número de este tipo de industrias se correlaciona con el descenso originado en el consumo medio de aceite de oliva por habitante y por la creación de cooperativas (11).

Los estadísticos demuestran, que en el transcurso de las últimas décadas en los principales países mediterráneos, productores y consumidores de aceite de oliva, su consumo está decayendo en beneficio de otros aceites vegetales. En España e Italia, que juntos representan el 60 % del consumo mundial de aceite de oliva, en el periodo anteriormente indicado se ha incrementado de forma muy sustancial la utilización de otros aceites vegetales, cuyo consumo, al principio de los años cincuenta, era varias veces inferior al del aceite de oliva (12).

La sustitución del aceite de oliva por aceites de semillas, tiene una evolución diferenciada según los países. En España, Turquía y Túnez es consecuencia directa de importaciones masivas de aceite de soja. En Italia el consumo de aceites de oliva se degradó por los años setenta a causa de los desequilibrios de la oferta por el aumento de precios. Grecia es el único país entre los productores en el que el consumo de aceite de oliva sigue ocupando un lugar dominante entre los aceites vegetales.

El fenómeno de sustitución del aceite de oliva por aceites de semillas, ha hecho que la zona mediterránea, precisamente la de los países productores de aceite de oliva, se convierta en el principal mercado para los aceites de semillas oleaginosas, aceites de soja, cacahuete y girasol.

El factor precio, ha tenido gran importancia en el crecimiento de demanda de aceite de semillas, ya que sus precios con frecuencia han sido inferiores en casi un 50 % a los del aceite de oliva.

Por otra parte, la política americana alentó la exportación de soja en los años 50 ante la amenaza de la superproducción agrícola. El congreso Americano votó una ley para dar salida a los excedentes de aceite de soja y penetrar en numerosos mercados. Mediante esta ley votada en 1966 para la "ayuda alimentaria y la paz" se abrieron rápidamente nuevos mercados, como los de España y Túnez, grandes productores y consumidores de aceite de oliva y modificó los hábitos alimenticios. En 1981, el consumo de aceites de semillas por habitante sobrepasó el de

aceite de oliva en todos los países del Mediterráneo excepto Grecia (13).

En la actualidad, a pesar de que en EE.UU. la difusión del aceite de oliva es bastante reducida, Italia se ha asegurado ya un porcentaje superior al 67 % del mercado. Gracias a la divulgación de la dieta mediterránea, el potencial aumenta y se debería aprovechar la ocasión mejorando cada vez la calidad del producto.

En los últimos años se está observando una tendencia en el consumidor a conocer mejor los problemas relacionados con una dieta alimentaria correcta y el americano por ejemplo es consciente de que su dieta es excesivamente rica en azúcares, sobre todo edulcorantes, y en grasas animales cocidas, y que sin embargo, carecen de fibras vegetales, hidratos de carbono complejos y grasas vegetales crudas. De hecho en los tres últimos años, el aceite de oliva ha tenido una considerable difusión en los EE.UU., hasta el punto de que el consumo anual ha aumentado en casi un 17 %. La tendencia de los americanos a cocinar mejor y con sabores más refinados y el uso cada vez más frecuente de alimentos naturales son los principales motivos de este aumento.

La gente está abandonando el mito de que el aceite de oliva es rico en colesterol y en calorías y por fin se da cuenta de que se trata del único aceite natural, sin colesterol y con un contenido calórico no superior al de otros aceites (14).

La apertura de este vasto mercado americano permite una clara y libre competencia entre los productores de aceite de oliva, mercado al que mira toda la oleicultura mundial, ya que puede desbloquear con su potencial de absorción, la crisis que lo atenaza. Conviene por tanto apostar por la calidad antes que por la cantidad. La ley debería garantizar mediante los análisis químicos y organolépticos oportunos que nos encontremos no sólo ante un producto genuino sino también de altísima calidad. El aceite virgen extra debería estar sometido a controles idóneos que permitieran establecer la genuinidad y la tipología. En este camino deberán empeñarse las regiones, los investigadores y el Estado, al objeto de poder dar garantías de tipo económico al productor y de denominación de origen al consumidor.

Introducirse en un mercado en el que el consumidor gasta mil millones de dólares en aceites de oliva, daría por compensados todos los esfuerzos realizados.

La consolidación y robustecimiento de esta tendencia podrían verse favorecidos tanto por la reducción de los precios como por la mejora de la calidad a través del empleo de apropiadas técnicas de cultivo y, a nivel de transformación, deberán concurrir las modernas tecnologías de extracción con el fin de mantener lo más íntegras posible, las características originales del producto.

3.2.- ALMACENAMIENTO DE ACEITUNAS EN TROJES.

La recolección de la aceituna de molino ha de verificarse necesariamente en un plazo relativamente corto de tiempo, que puede oscilar entre 40 - 70 días según la climatología . Si se pretende realizar la extracción del aceite al mismo ritmo de la recolección, necesariamente se debe de disponer de una gran capacidad extractora en fábrica. Este tipo de maquinarias en almazaras exige el empleo de un capital muy elevado de difícil amortización dado el corto tiempo de funcionamiento de las mismas.

Dada la dificultad que presenta el desequilibrio entre la producción de aceitunas y los medios disponibles para extraer su aceite, en la mayoría de los casos se amontonan grandes cantidades de aceitunas formando los denominados trojes, a la espera de su molturación durante un plazo más o menos largo de tiempo que puede ser de incluso meses.

Los frutos así almacenados se alteran con mayor o menor rapidez, produciendo aceites de mala calidad y que en general requieren ser sometidos a una refinación más o menos completa antes de que puedan destinarse a la alimentación. Naturalmente, esto lleva consigo importantes pérdidas, puesto que aceites que originalmente podían ser de buena calidad la pierden irremediabilmente durante el atrojado.

Rodríguez de la Borbolla y col.(15), en un trabajo sobre la conservación de aceitunas de molino

hacen especial hincapié en la clasificación previa de la materia prima según llega a la almazara y distinguen los siguientes grupos:

1. Aceitunas maduras, sanas y frescas, cuyos aceites posean las características de olor, sabor, color, acidez, etc., determinantes de su mejor apreciación.

2. Aceitunas maduras, sanas y frescas, cuyos aceites, aún reuniendo excelentes características, tengan, sin embargo, para paladares exigentes, algún defecto (exceso de frutado, amargor, etc.) fácilmente subsanable mediante mezclas con otros aceites vírgenes o refinados de oliva.

Los aceites procedentes de estos dos grupos no han de experimentar, por consiguiente, ninguna forma de refinación parcial o total y, además, podrán destinarse a los mercados más exigentes. De aquí que su precio ha de ser sensiblemente más elevado que el de los grupos siguientes.

3. Aceitunas frescas y sanas cuyos aceites tengan un defecto esencial que obligue a su refinación total o parcial, o, cuando menos, determine para los mismos, en libre competencia, un precio sensiblemente inferior al de los anteriores.

En este caso deben estudiarse las causas del defecto o defectos correspondientes (madurez, variedad, terreno, cultivo, etc) procurando en lo posible la oportuna corrección de los mismos.

4. Aceitunas dañadas antes de su llegada a la almazara (caídas, picadas, etc.), cuyos aceites tengan defectos suficientemente graves para exigir una refinación más o menos completa.

Es evidente, comentan, que para las aceitunas de los dos primeros grupos citados cualquier procedimiento de conservación a emplear debería mantener en los aceites correspondientes las características de olor, sabor, color, acidez, etc., que determinan su superior calidad. En cambio, para las aceitunas de los dos últimos grupos bastaría con evitar, en lo posible, las alteraciones posteriores y, sobre todo, la acidificación, causa de grandes pérdidas de aceite potencialmente comestible en la refinación.

Sin embargo, el único procedimiento aconsejable para la obtención de aceites de calidad superior que conserven inalteradas las excelentes cualidades de los buenos aceites de oliva, es la extracción inmediata o casi inmediata de las aceitunas correspondientes.

Estos mismos autores estudian en profundidad algunas de las alteraciones del aceite correspondiente a frutos procedentes de un troje.

Las aceitunas suelen recolectarse cuando alcanzan completa madurez, y en este estado pasan a formar las grandes masas de los trojes. Es un hecho conocido que durante el almacenamiento los frutos suelen sufrir alteraciones que llegan a provocar la desintegración de las paredes celulares.

Estas reacciones se inician después de la recolección con la autólisis o autodescomposición de la materia orgánica, que poco a poco va reemplazando a la respiración y a la madurez organizada. La célula vegetal pierde su resistencia vital y, con ella, el control sobre los compuestos químicos presentes, cuya distribución y reactividad había regulado anteriormente para conservar las características de los tejidos vivos.

Durante este proceso se producen reacciones completamente distintas a las que tienen lugar durante el desarrollo y maduración de las aceitunas destruyendo su estructura organizada. La autólisis provoca la desintegración de las paredes celulares y hace perder al epicarpio su cualidad de barrera antimicrobiana. Este hecho posibilita que tanto los microorganismos del ambiente como los intrínsecos a las aceitunas, encuentren fácil camino para invadir los tejidos, uniéndose la acción bacteriana a la autólisis para completar su efecto destructor.

Este tipo de reacciones, están además favorecidas y aceleradas por la existencia de una temperatura apropiada para el crecimiento de microorganismos que se pueden mantener durante largos periodos de tiempo, a causa de los procesos respiratorios celulares y de la mala conductividad térmica de la masa de aceitunas.

Como consecuencia de todo lo anterior las principales alteraciones que se producen en los aceites extraídos de esos frutos se comentan a continuación:

3.2.1.- INFLUENCIA SOBRE LA ACIDEZ LIBRE.

En todas las aceitunas atrojadas hay acidificación del aceite, pero la velocidad depende de la procedencia del fruto. Además, la acidificación es siempre mucho más elevada en la parte superior de los trojes.

Cuando los trojes no son homogéneos en cuanto al fruto que contienen, o no se han hecho de una vez, como ocurre con frecuencia en las almazaras, pueden encontrarse capas intermedias de acidez más elevada. Por otra parte, en trojes de poca altura las diferencias de acidez entre las distintas capas son, en ciertos casos, mucho menores, lo que se puede atribuir al menos en parte, a las distintas condiciones que determinan, en el seno del troje, mayor o menor apelmazamiento de los frutos.

3.2.2- INFLUENCIA SOBRE LA ESTABILIDAD.

Al aumentar el tiempo de atrojado disminuye notablemente la estabilidad de los aceites, siendo los procedentes de la capa superior de los trojes menos estables que los de la capa inferior.

La estabilidad de un aceite bruto procedente de aceitunas atrojadas sólo tendrá importancia en el caso de que tales aceites no hayan de ser sometidos a la refinación, pues, de lo contrario, lo que verdaderamente interesa es conocer la influencia de la conservación sobre la estabilidad de los refinados que puedan obtenerse a partir de los brutos correspondientes.

Estos dos puntos fueron estudiados en profundidad por Rodríguez de la Borbolla y col (15) y entre las causas principales que pueden contribuir al desarrollo de las alteraciones, reacción química, actividad enzimática y actividad microbiana, llegan a la conclusión de que es la última la principal responsable.

3.2.3.- INFLUENCIA SOBRE EL OLOR Y SABOR.

Los autores del trabajo que se está comentando decían textualmente al respecto "Hemos considerado innecesario de momento estudiar detenidamente este punto por cuanto las desastrosas consecuencias del atrojado ordinario sobre estas tan importantes características del aceite de oliva son bien conocidas y han ocasionado graves perjuicios a la industria y comercio del mismo".

Posteriormente en el Instituto de la Grasa el Profesor Gutiérrez y col, iniciaron el estudio de los componentes volátiles presentes en aceites procedentes de frutos atrojados para constatar la posible correlación entre los análisis químicos y la valoración sensorial. En base a los componentes volátiles identificados llegan a la conclusión de que durante el atrojado se produce una sobremaduración del fruto, una clara oxidación de los ácidos grasos insaturados y un ataque extremo por mohos y bacterias, siendo este último proceso el que tiene una importancia destacada desde el punto de vista organoléptico (16) (17) (18).

3.2.4.- INFLUENCIA SOBRE EL COLOR.

El aceite contenido en las aceitunas atrojadas experimenta importantes cambios de color, que dependen del tiempo de conservación, de la calidad del fruto y de la posición que las aceitunas ocupen en el troje.

La identificación y clasificación de los aceites vírgenes por su color sigue siendo en la actualidad un problema aún no resuelto. Dicha valoración se realiza por adaptación de métodos desarrollados para el aceite de palma (19) (20) (21) (22) y aceites vegetales en general. Ultimamente se ha desarrollado un método simple basado en el ABT (UNE 5502) utilizado para aceites refinados adaptado a la gama de color que muestran los aceites vírgenes y que de momento puede dar solución a la problemática planteada en el comercio e industria del aceite de oliva virgen (23).

En general, el aceite intensifica su color con el tiempo de atrojado y el aceite obtenido de la capa superior de un troje es más coloreado que el de la capa inferior.

3.3.- PIGMENTOS CLOROPLASTICOS.

3.3.1.- GENERALIDADES.

Se encuentran localizados en los llamados plastidios, que son diferenciaciones del protoplasma

típicamente vegetal, separados del resto del citoplasma por membranas propias y que con frecuencia son portadores de pigmentos como la clorofila y los carotenoides, en cuyo caso se denominan cromatóforos (24).

Se presentan en tres formas: cromatóforos fotosintéticamente activos, cromatóforos fotosintéticamente inactivos y leucoplastos incoloros, inactivos en la fotosíntesis.

El pigmento más importante que interviene en la fotosíntesis, la clorofila, se encuentra en todos los cromatóforos fotosintéticamente activos, incluido en una masa fundamental, el estroma, incolora y rica en lipoides. Los plastidios que debido a su gran contenido en clorofila presentan color verde, se llaman cloroplastos. En ellos también se hallan siempre, al lado de las clorofilas verdes, carotenoides liposolubles rojo-anaranjados y amarillos, en general, en menor cantidad.

Las coloraciones amarillas y anaranjadas que suelen mostrar las flores, así como el rojo brillante de muchos frutos, son producidas, al menos en parte, por cromoplastos que son cromatóforos fotosintéticamente inactivos, que se desarrollan inmediatamente a partir de los protoplastidios incoloros o proceden por pérdida de la clorofila de cloroplastos verdes. El color de los cromoplastos se debe a su contenido en carotenos y xantofilas, semejantes e incluso idénticos a los carotenoides de los cloroplastos verdes.

La tonalidad amarilla de las hojas otoñales de muchas plantas leñosas responde a que, en primer lugar, se descomponen las clorofilas que entonces son eliminadas por las vías conductoras mientras los carotenoides permanecen. También las coloraciones amarillas o anaranjadas de los limones y naranjas se deben a un enriquecimiento en pigmentos carotenoides acompañados de desaparición de la clorofila. En cambio, la coloración roja de las hojas otoñales es debida a que el jugo celular se tiñe por antocianinas.

No es fácil definir como incide el envejecimiento de la planta sobre los pigmentos. Se puede ciertamente describir una secuencia de transformaciones en la maduración de los frutos, cuyo crecimiento se combina con cambios en el sabor, textura, color, etc. Sin embargo, antes de llegar al estado de madurez muchos frutos han quedado libres de clorofilas y los cloroplastos han sido reemplazados por los cromoplastos. La degradación de clorofilas durante la biosíntesis de carotenoides y/o antocianinas y betalainas es un fenómeno complicado.

En muchos de ellos, al acercarse la maduración, hay un estado en el cual los cambios bioquímicos se inician por la producción autocatalítica de etileno. Este incremento de respiración marca el cambio entre desarrollo y maduración, produciéndose entonces la variación de coloración en la piel (25).

3.3.2.- CLOROFILAS.

- Estructura y función.

Las clorofilas son los pigmentos funcionales de la fotosíntesis en todas las plantas verdes y se encuentran localizadas junto con una serie de carotenoides, en las membranas de los cloroplastos, que son los orgánulos responsables de la fotosíntesis de las células vegetales.

En la actualidad, se pueden distinguir, por lo menos, ocho tipos de clorofilas: "a", "b", "c", "d" y "e", bacterioclorofila "a", bacterioclorofila "b" y clorofila de clorobio (bacterioviridina).

Las clorofilas "a" y "b" son las que más se han investigado y se encuentran en todos los organismos autotróficos, excepto en las bacterias pigmentadas. La clorofila "b" está ausente en las cianofíceas y en las algas pardas y rojas. Normalmente se considera que la clorofila "a" es verde azulada, mientras que la "b" es verde-amarillenta. Las otras clorofilas ("c", "d" y "e") sólo están presentes en algas, combinadas con la clorofila "a". Las bacterioclorofilas "a" y "b" y la bacterioviridina son los pigmentos que se encuentran en las bacterias fotosintetizadoras.

Todas las células fotosintéticas contienen uno o más tipos de pigmentos, pero no todos son verdes. Las algas fotosintéticas y las bacterias pueden ser pardas, rojas o púrpuras.

Esta variedad de colores se debe a que, además de la clorofila, muchas células fotosintéticas contienen otras clases de pigmentos que capturan la luz: los carotenoides amarillos y las ficobilinas azules o rojas, denominados frecuentemente pigmentos accesorios, postulándose que actúan como receptores de la luz suplementarios, para porciones del espectro visible que no están cubiertos completamente por la clorofila. Los carotenoides actúan también protegiendo a la clorofila del ataque degradativo del oxígeno molecular.

Por ser la clorofila "a" el pigmento común a todos los organismos fotosintéticos, se ha postulado que es el único que proporciona energía directamente a la reacción fotosintética, y que todos los demás transfieren la energía que han absorbido a la clorofila "a" (26) (27).

La estructura de la clorofila "a" fue establecida mediante estudios de degradación y comprobada por síntesis total. Contiene cuatro anillos pirrólicos sustituidos, uno de los cuales está reducido. Los anillos pirrólicos se hallan coordinados con un ión Mg^{++} para formar un complejo esencialmente planar muy estable. Posee una cadena lateral terpenoide larga e hidrófoba formada por el alcohol fitol, esterificado con un resto de ácido propiónico. La diferencia entre la clorofila "a" y "b" estriba en que la "a" tiene un grupo metilo en el C-3 mientras que la "b" posee un grupo formilo (Figura 1).

CLOROFILA "a" R = CH₃
 CLOROFILA "b" R = CHO

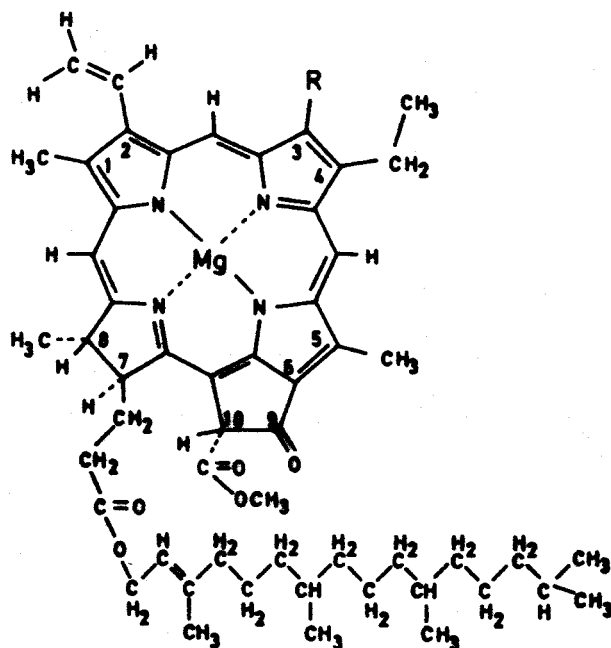


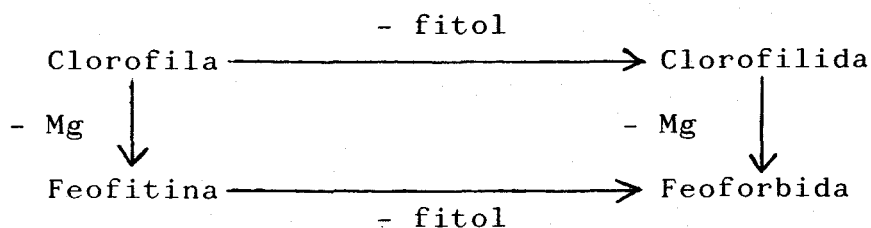
FIGURA 1.- ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS DE CLOROFILA "a" Y CLOROFILA "b".

Las moléculas de clorofila están íntimamente asociadas a lípidos por la afinidad del fitol con los componentes lipofílicos de las membranas, y a las proteínas, por el anillo porfirínico que es la parte hidrófoba de la molécula de clorofila. Así, dentro del cloroplasto, las clorofilas se hallan entre una capa de proteínas y otra de lípidos con un carotenoi- de situado a lo largo de la cadena de fitol de la clorofila, Figura 2 (28).

- Derivados clorofílicos.

Cuando se separa el fitol de la clorofila "a" por hidrólisis, la estructura residual recibe el nombre de clorofilida, que es un intermediario en la biosíntesis de la clorofila. Las clorofilidas son verdes y presentan prácticamente las mismas propiedades espectrales que las clorofilas, aunque son más solubles en agua. Por eliminación del Mg de las clorofilidas, se originan las correspondientes feoforbidas, cuya coloración y propiedades son análogas a las de feofitinas, procediendo éstas últimas de las clorofilas por pérdida del Mg (29).

Esquemáticamente, estas afinidades se representan de la forma siguiente:



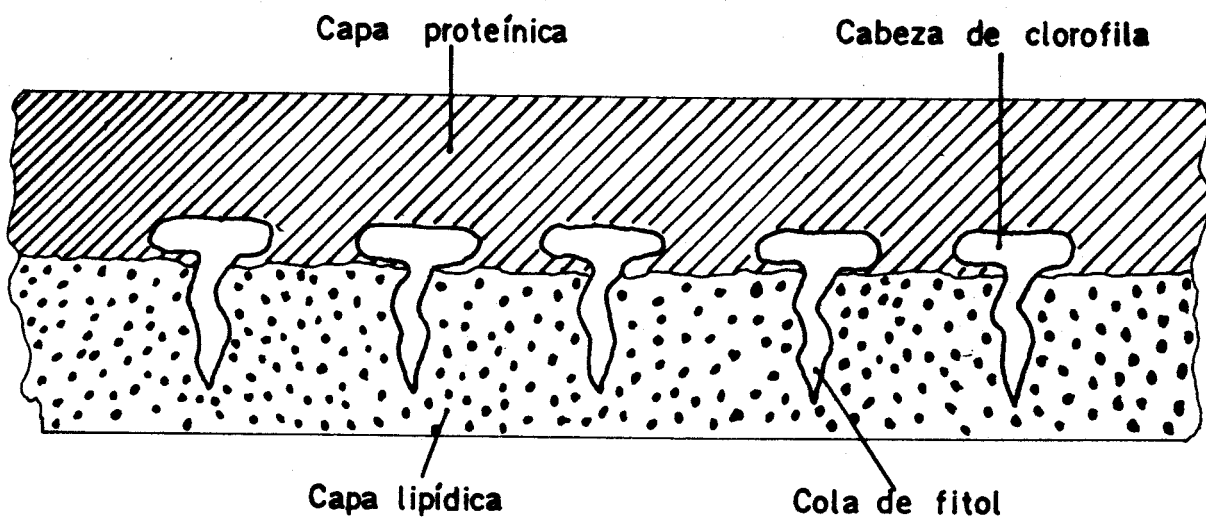
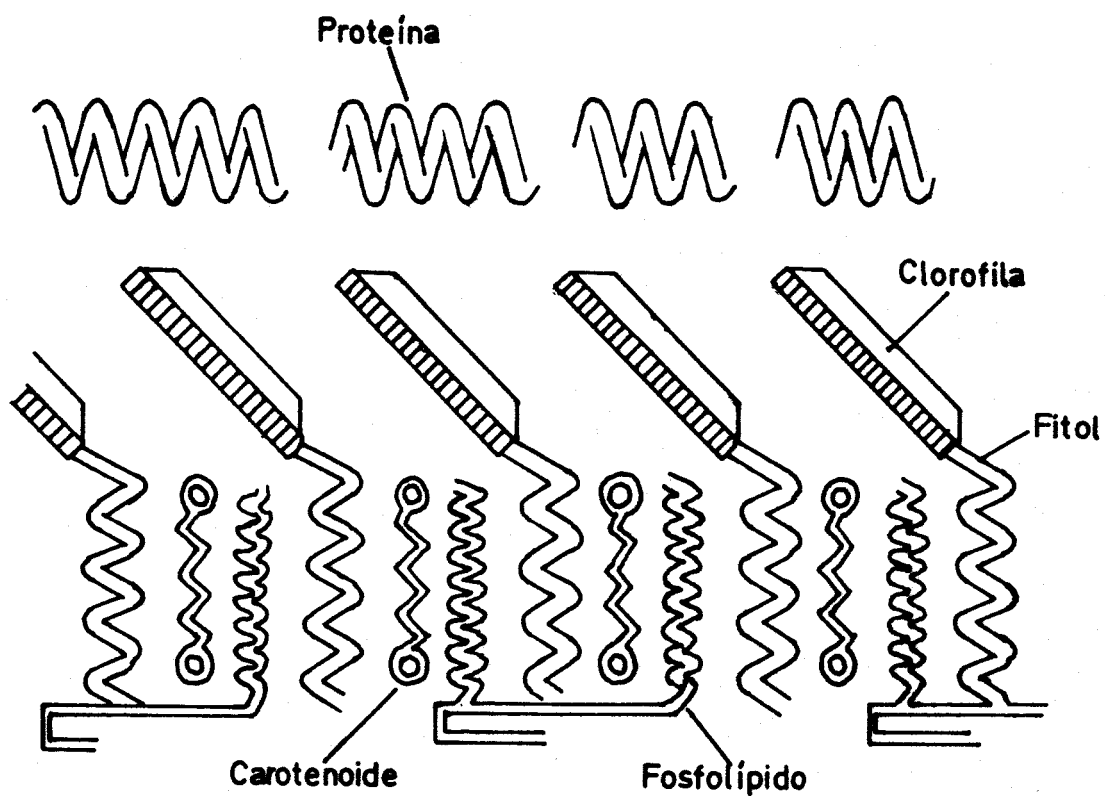


FIGURA 2.- LOCALIZACION DE LA CLOROFILA EN EL CLO-
ROPLASTO.

Debido a los grupos funcionales laterales de las clorofilas, pueden producirse otras muchas reacciones, como oxidación del anillo isocíclico para formar clorofilas alomerizadas y rotura del anillo tetrapirrólico, originando, a veces, productos finales incoloros (30).

El mecanismo de la degradación de la clorofila sólo se conoce parcialmente y parece que puede seguir varios caminos. En la Figura 3 se muestran las posibles vías de degradación según varios autores (31) (32).

Los principales pasos de la descomposición de clorofilas implican: pérdida de fitol para dar clorofilidas, oxidación e isomerización de clorofilas en sus correspondientes productos de reacción, y finalmente la descomposición de clorofilas y derivados en productos incoloros de bajo peso molecular, después de la destrucción del anillo de porfirina (33) (34) (35). La alomerización tiene lugar cuando la clorofila se extrae con disolventes orgánicos conteniendo oxígeno y se mantiene en la oscuridad. Es un proceso lento de oxidación en el que se sustituye el H del C-10 de la clorofila por un grupo -OH ó alquiloxi cuando se usan alcoholes como disolventes.

La clorofilasa, descubierta por Willstätter y Stoll en 1928, cataliza la pérdida de fitol para formar clorofilidas. No está claro si esta enzima cataliza la esterificación o la reacción hidrolítica, ya que los datos no son concluyentes para ambos o cada una de estas posibilidades (33) (36) (37) (38).

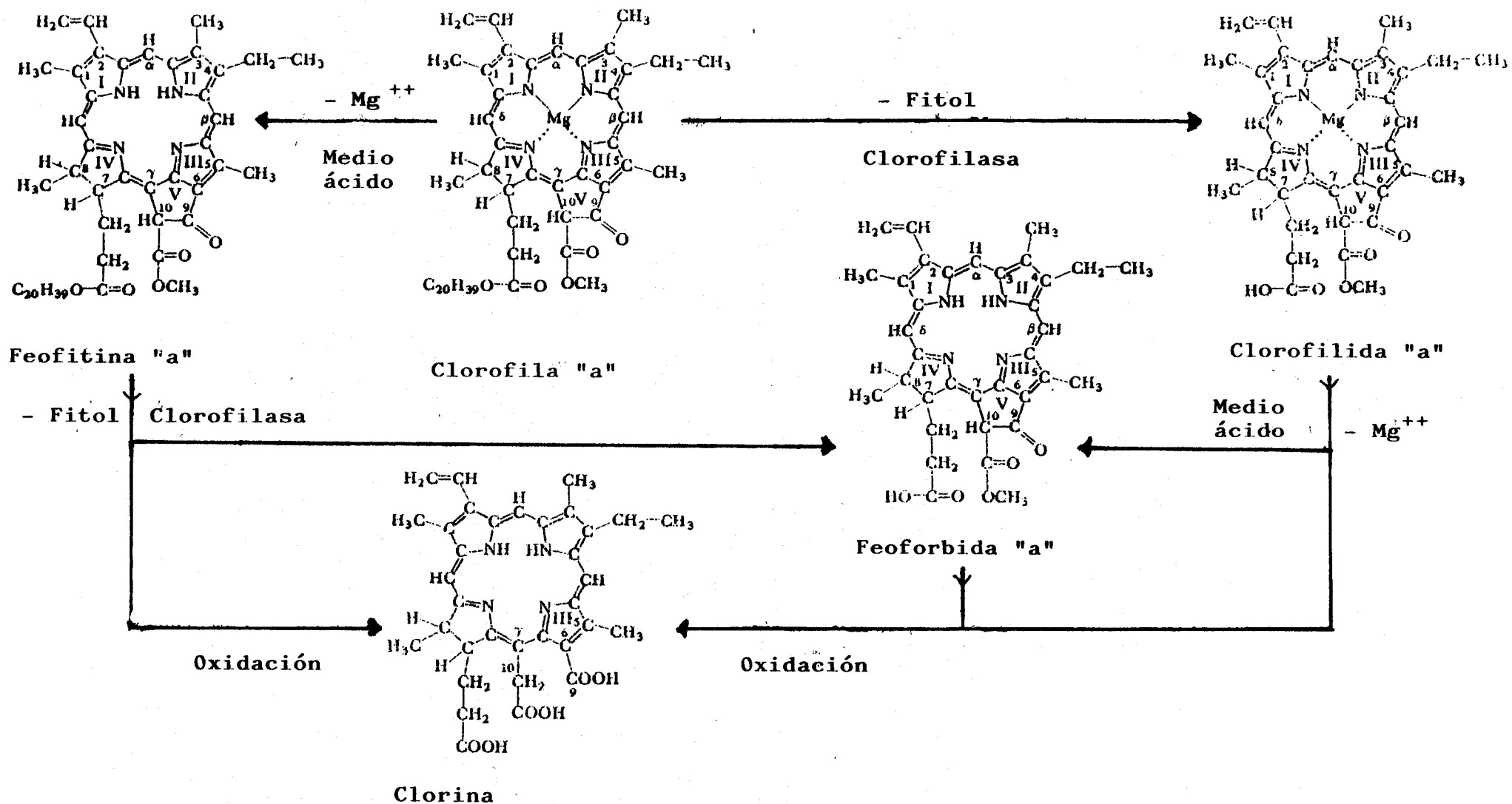


FIGURA 3.- RUTA DE DEGRADACION DE LA CLOROFILA "a".

Los conocimientos actuales parecen insinuar que la clorofilasa no cataliza la fase inicial de la degradación de la clorofila en los tejidos senescentes de las plantas. La fase inicial requiere oxígeno molecular, y la eliminación de la cadena fitol se produce en ulteriores fases. Se ha podido observar como la actividad de la clorofilasa es más simultánea a la síntesis que a la degradación (39).

En este proceso tienen más efectividad los enzimas oxidantes, tales como la lipoxigenasa, que la clorofilasa. Se ha observado como la lipoxigenasa aparece durante la senescencia de las plantas (35) (40).

La clorofila se blanquea por extractos que tengan actividad de lipoxigenasa pero no en los que se les añada dicha enzima purificada. Este efecto blanqueante puede inhibirse por adición de antioxidantes comerciales (41).

Desde que los primeros trabajos de Willstätter y Stoll mostraron que los valores de clorofila eran menores en las hojas amarillas que en las hojas verdes, la degradación de los pigmentos en otoño ha sido un tema de particular interés científico. Las hojas contienen una alta, pero variable, concentración de clorofilas y carotenoides a lo largo de los meses de verano. Durante el periodo de envejecimiento en otoño, precedentes a la desecación y caída, las clorofilas decrecen rápidamente, produciendo cantidades bajas de feofitinas con sólo ocasionales trazas de feoforbidas y clorofilidas. El contenido en carote-

noides empieza a declinar, al mismo tiempo que las clorofilas pero a una velocidad mucho menor.

La salida del ión magnesio está catalizada por los iones hidrógeno, así como por el calor. El calor provocaría la coagulación de una lipoproteína, a la cual la clorofila está normalmente fija y por la que estaría protegida, favoreciendo la actuación de los propios ácidos del fruto. Se puede atenuar la acción del calor utilizando tratamientos cortos a alta temperatura, o elevando el pH del medio por adición de sosa o bicarbonato sódico. Sin embargo, estas condiciones muestran un efecto indeseable sobre la textura, sabor y aroma, además de favorecer la pérdida de las vitaminas C y B₁ o tiamina (32).

La eliminación del fitol está catalizada por la clorofilasa. Este enzima, bastante resistente al calor, sólo se encuentra en algunos vegetales localizada en los cloroplastos y únicamente se activaría durante la maduración.

La oxidación por foto-oxidación (oxígeno + luz) que implica apertura oxidativa del anillo isocíclico, da lugar a fuertes alteraciones del color y se llevaría a efecto por contacto con lípidos oxidados o por la acción de una lipoxidasa. Estas oxidaciones pueden producirse en vegetales deshidratados, almacenados a una humedad relativa inferior al 30 %, pero si la humedad relativa de la atmósfera ambiente es superior, lo que ocurre es una pérdida de Mg y su transformación a feofitinas.

La oxidación en medio ácido de clorofilidas y feoforbidas provoca la rotura del anillo dando lugar a una profunda modificación de la estructura inicial, formándose clorinas y purpurinas, de color marrón o pardo.

La oxidación enzimática promueve la degradación oxidativa de la clorofila por los peróxidos de las grasas. Este fenómeno es el responsable del pardeamiento en vegetales deshidratados o congelados, cuyos sistemas enzimáticos no han sido adecuadamente inactivados por el escaldado previo.

Algunos compuestos volátiles aceleran, como el etileno, o retardan como el anhídrido carbónico, la degradación de la clorofila y por eso se utilizan en el almacenamiento de algunos vegetales.

Durante el periodo de conservación de vegetales congelados, se observa una degradación de la clorofila que depende del pH del producto.

3.3.3.- CAROTENOIDES.

- Estructura y función.

Los carotenoides son los pigmentos responsables de la mayoría de los colores amarillos y anaranjados de los frutos y verduras. Químicamente se clasifican como terpenoides, sustancias derivadas en la naturaleza del intermediario metabólico, ácido mevalónico, que aporta la unidad básica estructural.

No cabe duda, que los carotenoides se encuentran entre los pigmentos más importantes y ampliamente distribuidos, estando su presencia, a menudo, enmascarada por las clorofilas. Son responsables de muchas de las tonalidades rojas y amarillas en flores y frutos. También están presentes en insectos, pájaros y otros animales (42) (43) (44).

Se han formulado numerosas hipótesis acerca de la carotenogénesis (45), no obstante el mecanismo no es aún muy conocido. La capacidad para producir carotenoides parece que se pudo haber desarrollado en una primera etapa de evolución. Algunas bacterias, las algas y plantas superiores la conservan aún, pero los animales, parece ser que deben ingerirlos en su dieta. Sin embargo, la posterior transformación de los carotenoides ingeridos, conduce, a veces, a pigmentos característicos de animales, los cuales no se encuentran en organismos capaces de carotenogénesis "de novo".

Están formados básicamente por ocho unidades de isopreno, de tal forma que la unión de las unidades isoprénicas se invierte en el centro de la molécula. Como resultado de ello, los dos grupos metilo del centro de la cadena de polieno están separados por seis átomos de carbono y los otros grupos metilo, sólo por cinco átomos de carbono (Figura 4). Parece ser, que a partir del licopeno, todos los demás carotenoides se pueden considerar formalmente derivados, por hidrogenación, ciclación u oxidación, o bien por combinación de estos procesos. La numera-

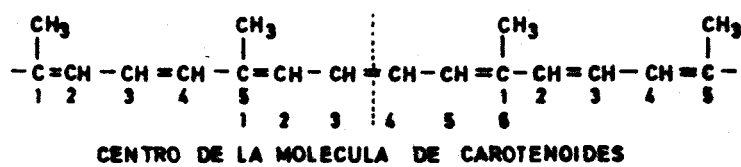


FIGURA 4.- ESTRUCTURA DE CAROTENOIDES.

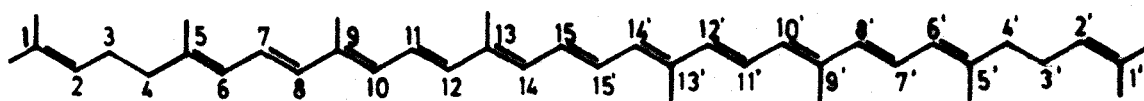
ción de los carbonos en los carotenoides va de los extremos hacia el centro del 1 al 15 y del 1' al 15', siendo la numeración de los metilos del 16 al 20 y del 16' al 20', respectivamente.

Los carotenos que se forman por ciclación de los extremos de la cadena dan lugar a dos posibles estructuras cíclicas, la α -ionona y la β -ionona, como el α -caroteno y β -caroteno, Figura 5.

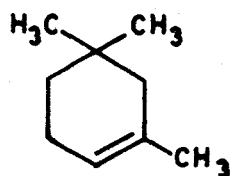
Pueden dividirse en dos grandes grupos: hidrocarburos denominados carotenos, que son la minoría, y sus derivados oxigenados, llamados xantofilas.

Las xantofilas se forman inicialmente por hidroxilación de carotenos, y la mayoría de los tejidos de las plantas contienen trazas de precursores monohidroxílicos como criptoxanteno y de las xantofilas dihidroxílicas como zeaxanteno o luteína. Posteriores reacciones de oxidación conducen a la formación de epóxidos, como violaxanteno y de cetonas, como el capxanteno. El neoxanteno es un extraño ejemplo natural de un aleno. Los apocarotenoides, constituyen un reducido grupo de xantofilas, en las que se ha perdido algún fragmento, a uno o a ambos lados de la cadena, como el β -apo-8'-carotenal y la croceti-na, Figura 6.

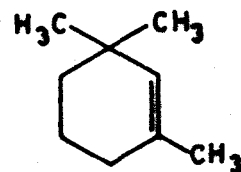
Exceptuando los apocarotenoides ácidos, los cuales forman sales solubles en agua en condiciones alcalinas, los carotenoides sólo son solubles en disolventes orgánicos apolares (29) (31).



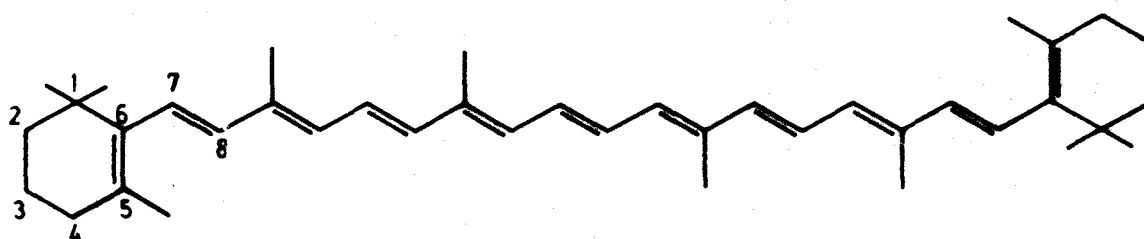
Licopeno



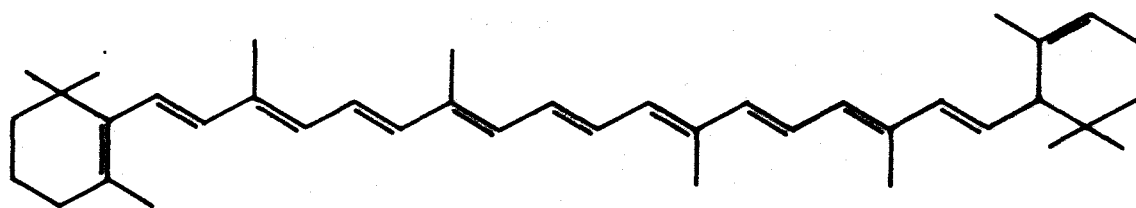
α - ionona



β - ionona



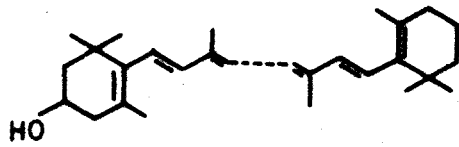
β - Caroteno



α - Caroteno

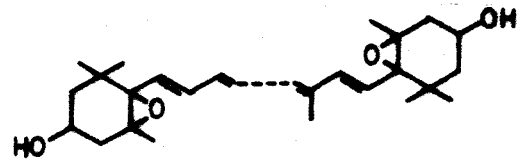
FIGURA 5.- ESTRUCTURA DE CAROTENOS.

MONOHIDROXIDERIVADOS



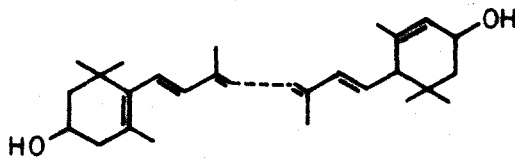
Criptoxanteno

EPOXIDERIVADOS

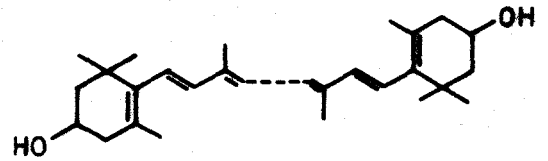


Violaxanteno

DIHIDROXIDERIVADOS

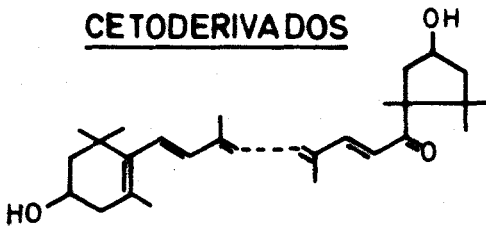


Luteina



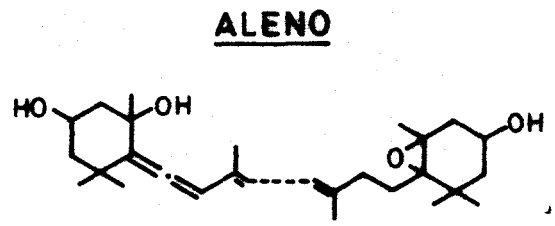
Zeaxanteno

CETODERIVADOS



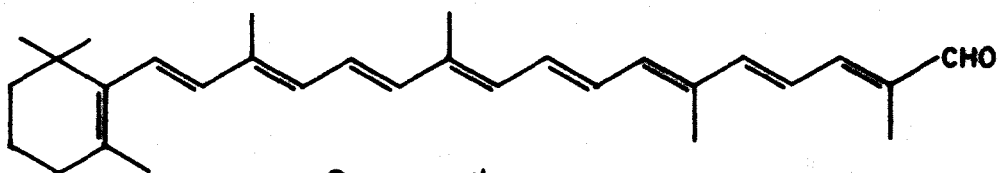
Capsanteno

ALENO

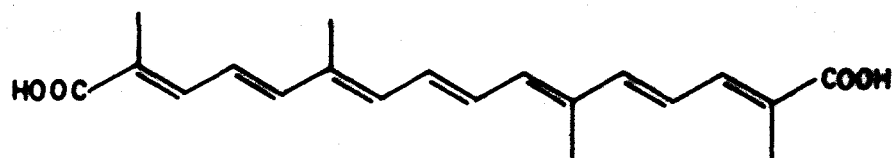


Neoxanteno

APOCAROTENOIDES



β -Apo-8'-Carotenal



Crocetina

FIGURA 6.- ESTRUCTURA DE XANTOFILAS.

No se han encontrado en carotenoides naturales elementos distintos de C, H y O. El oxígeno puede estar presente como grupo hidroxilo, metoxilo, epoxi, carboxilo o carbonilo. Los derivados hidroxilados pueden existir en estado libre o esterificado con ácidos grasos, como el ácido palmítico (46).

Poseen diferentes grupos terminales, con la misma estructura central, conociéndose unos sesenta grupos distintos, que abarcan unos trescientos compuestos conocidos, y continuamente se describen nuevos carotenoides. La mayoría de ellos tienen un esqueleto central de C_{40} , aunque en la actualidad se han consignado algunos que poseen más de 40 carbonos. También se les conoce como carotenoides constituidos en C_{40} (29) (45) (47).

A los carotenoides se les atribuyen propiedades para absorber oxígeno (48) (49) (50), sin embargo, también parecen tener un efecto protector antioxidante sobre la vitamina C. Nuevos elementos de controversia se introducen, cuando se les asigna un papel prooxidante a la luz y antioxidante en la oscuridad (29).

La mayoría de estos compuestos son de coloraciones brillantes debido a la presencia en la molécula de un cromóforo, consistente principal o totalmente en una cadena de dobles enlaces conjugados. Sin embargo, algunos tienen polienos cromóforos que son demasiado cortos para ser detectados por el ojo humano. Algunas de estas sustancias se postula que son intermediarios en la biosíntesis de otros carotenoides.

Las concentraciones a las que normalmente se encuentran son bajas, pero varían enormemente de unas fuentes a otras.

Los tres carotenoides principales en hojas verdes son luteína, violaxanteno y neoxanteno. En comparación, todos los demás se producen en pequeña proporción; algunos como β -caroteno y zeaxanteno, se dan ampliamente, y otros, como licopeno y capsanteno constituyen el principal pigmento de algún organismo en particular (42) (46) (51).

En las plantas superiores, están presentes en los cloroplastos y como en todos los organismos fotosintéticos, las xantofilas no están esterificadas. En hojas de otoño, las xantofilas liberadas en la desintegración de cloroplastos, se esterifican y por eso se vuelven más lipofílicas.

En los tejidos animales, los carotenoides se encuentran disueltos en la grasa. Las proteínas en las que los carotenoides están presentes en proporciones estequiométricas, como grupos prostéticos, constituyen un grupo muy interesante de compuestos, ya que la combinación carotenoide-proteína, puede extender el rango de colores a verde, azul y negro.

Un aspecto muy significativo, que ha contribuido al desarrollo en el conocimiento de estas sustancias y que se le presta especial atención, es que algunos de ellos están siempre presentes en alimentos naturales y son muy adecuados como colorantes (49).

Desde el punto de vista práctico, muchos carotenos y carotenoides son responsables del color en los animales o en productos animales usados como alimento humano. Además, el contenido en tales pigmentos se considera como un signo de calidad.

El término "pigmentadores" se emplea para referirse a los carotenoides que estando presentes en la dieta de los animales pueden mejorar la coloración de tejidos como piel, grasa, patas o productos derivados como huevos, mantequilla y queso. La adición de los mismos a la ración se puede emplear como un método indirecto de coloración del alimento y puede mejorar la impresión visual o la concentración actual de un pigmento en el producto animal (52).

- Valor nutritivo y farmacológico de los carotenoides.

Aunque los carotenoides como tales no tienen un papel fisiológico en el hombre, el hecho es que algunos presentan actividad vitamínica A, lo que les confiere valor nutricional.

El nombre químico de la vitamina A es retinol y se encuentra sólo en alimentos de origen animal. Los alimentos de origen vegetal que contienen carotenos, y muestran un color amarillo o anaranjado, pueden ser también fuente de actividad vitamínica A, ya que en el organismo los carotenos dan lugar a retinol.

Todos los carotenoides hidrocarburos tienen actividad de provitamina A. De todos ellos es el β -caroteno el que presenta mayor actividad, ya que la rotura enzimática central de su molécula da lugar a dos moléculas de vitamina A. Otros carotenos como α -caroteno, γ -caroteno ó criptoxanteno sólo dan lugar a una molécula de vitamina A porque sólo presentan una estructura de anillo de β -ionona.

La vitamina A es esencial para la visión con poca luz y necesaria para mantener sanos la piel y tejidos superficiales. La vitamina A no se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos. Las fuentes naturales son el aceite de hígado de pescado y en menor proporción el hígado de mamíferos, los riñones, productos lácteos y huevos. En las zanahorias, verduras y hortalizas, de color verde oscuro o amarillo, se encuentran cantidades variables de β -caroteno. En la mantequilla se añade vitamina A en forma de retinol o β -caroteno(25) (31).

Este grupo de compuestos, últimamente están siendo motivo de gran cantidad de estudios en base a la utilidad que presentan en el campo de la farmacología.

Su uso terapéutico es bastante conocido y ampliamente extendido en el caso de enfermedades carenciales. Actualmente, además del valor nutritivo que se les reconoce, se sabe también que pueden actuar beneficiosamente ante ciertas enfermedades.

Estudios epidemiológicos ponen de manifiesto que el riesgo de cáncer es menor cuando aumenta

el contenido en la dieta de β -caroteno, y estudios citológicos en laboratorio evidencian este hecho, ya que el β -caroteno es capaz de inhibir el crecimiento de cultivos de líneas celulares cancerosas (53) (54) (55).

Recientemente se ha puesto también de manifiesto que algunos carotenoides tienen una marcada actividad antiulcerosa y que en general retardan el envejecimiento en los mamíferos, aumentando la esperanza de vida (56).

3.4.- ENZIMAS OXIDATIVAS: LIPOXIGENASA.

3.4.1.- GENERALIDADES:

La lipoxigenasa (linoleato: oxígeno oxidoreductasa, E.C, 1.13.11.12) también conocida como "lipoxidasa", es un enzima extensamente distribuido en plantas (7) (57) (58), principalmente en las legumbres como la soja, alubias, judías verdes y en los cereales como el trigo, avena, cebada y maíz. También se ha identificado en los tubérculos de la patata, coliflor, manzanas y en una amplia variedad de hojas vegetales. Cataliza la oxigenación estereoespecífica de los ácidos grasos poliinsaturados, sus ésteres y glicéridos, que contienen el sistema doble enlace cis-cis-1,4-pentadieno, para originar un hidroperóxido que contiene un sistema doble enlace cis-trans conjugado. El ácido linoleico es el ácido graso más importante y estudiado como sustrato para la lipoxigenasa, aunque también lo es el linolénico.

Con el nombre genérico de lipoxigenasa se engloban distintos isoenzimas. La lipoxigenasa tipo 1 (L-1) actúa sólo sobre los ácidos grasos poliinsaturados no esterificados, y tiene a pH = 9 su actividad óptima. La lipoxigenasa tipo 2 (L-2) es más específica para los ácidos grasos esterificados y tiene un pH óptimo de actividad algo inferior, entre 6,5 - 7.

En el caso de que el sustrato enzimático sea el ácido linoleico el isoenzima 1 provoca la formación del 13-hidroperóxido mientras que el isoenzima tipo 2 genera la mezcla de los isómeros 9- y 13-hidroperóxidos.

Se ha encontrado otro isoenzima, aunque de menor importancia, la lipoxigenasa tipo 3 (L-3) que al igual que el tipo 2 tiene su actividad óptima a pH 6,5 - 7 (40).

Se sabe que los ácidos grasos juegan un papel esencial en la estructura y función de las membranas cloroplásticas (59). La acción sobre dichas membranas de la L-1 podría necesitar la acción precedente de un enzima hidrolítico de lípidos, pero la L-2 puede atacar membranas biológicas aún en ausencia de un enzima lípido-hidrolítico.

Muchos frutos y semillas han mostrado un alto contenido en actividad lipoxigenasa. Es razonable pensar, que la lipoxigenasa puede estar involucrada en la ruptura de membranas intracelulares durante el proceso de reestructuración como ocurre en

la germinación de semillas, maduración de frutos, secado de hojas, etc. Se sabe que la maduración de los frutos está relacionada con una transformación de cloroplastos verdes a cromoplastos o amiloplastos.

Para determinar si la lipoxigenasa es capaz de producir inactividad y ruptura de las membranas tilacoides, Kockritz et al (59) estudiando el efecto de la L-1 de soja sobre los cloroplastos de trigo, obtuvieron que el tratamiento de la lipoxigenasa mostraba una marcada disminución en la actividad fotoquímica. Sin embargo, tanto el contenido como la composición de los lípidos, así como los extensos restos de ácidos grasos totales, no cambiaban excepto para una ligera pero significativa disminución en el contenido total de ácido linolénico. Se piensa que la L-1 de soja ataca selectivamente al ácido linolénico presente en cloroplastos, seguida por una reacción del ácido hidroxiperoxilínolénico con intervención de la clorofila.

La lipoxigenasa tiene importancia práctica para el bromatólogo por diversas razones (57) algunas de las cuales se examinan a continuación.

3.4.2.- INFLUENCIA SOBRE EL AROMA DE ALIMENTOS.

Este enzima es importante para la calidad de muchas plantas básicas en la alimentación, por su participación en la formación de sustancias aromáticas de ácidos grasos insaturados (7) (58).

La mayoría de las verduras contienen ácidos linoleico y linolénico, que están sometidos a peroxidación por la lipoxigenasa. El deterioro en la calidad en vegetales congelados no escaldados, como son la aparición de mal olor, color y sabor, se atribuye a la degradación oxidativa de lípidos insaturados por acción del enzima (6). Por ejemplo, la acumulación de compuestos carbonilos en los guisantes congelados no tratados con calor se debe a la lipoxigenasa y si no se someten a tratamiento térmico los tejidos vegetales que contienen este enzima, cabe que se produzca una rápida pérdida de gustos (57).

Los hidroperóxidos resultantes de la actividad de lipoxigenasa contribuyen (60) (61) a la formación de muchos compuestos volátiles, como aldehidos, alcoholes, ácidos y cetonas, que son los responsables del flavor deseable de los vegetales frescos, asociados con el metabolismo normal de crecimiento de la planta así como del flavor no deseable que se produce después de la recolección y durante el almacenamiento o procesamiento de estos vegetales.

Yoon y Klein (6) al estudiar algunas propiedades de los isoenzimas lipoxigenasa de guisantes, encontraron que el tipo 1 era más efectivo en la producción de compuestos carbonilos frente al tipo 2 que no los producían.

Grosch et al (58) diferencian la lipoxigenasa de trigo, patata, judías y lino con respecto a la formación de compuestos carbonilos volátiles durante la oxidación del ácido linoleico y encuentran

que el enzima de haba forma significativamente más compuestos carbonilos que los demás. Como componentes mayoritarios del flavor se han identificado el 2,6-nonadienal (patata) y 2-hexenal (haba). Estos compuestos se detectan fuertemente en las habas totalmente crudas, manteniéndose incluso con la ruptura de la estructura celular y su presencia es clara aún después del cocinado (62).

Como se ha mencionado ya anteriormente, para inactivar o minimizar la actividad de enzimas como la lipoxigenasa durante la conservación de verduras, es necesario aplicar un tratamiento térmico antes de su congelación o desecación.

3.4.3.- DECOLORACION DE PIGMENTOS.

El efecto destructor de la lipoxigenasa sobre los pigmentos carotenoides y clorofílicos se debe a la formación de los radicales libres durante la peroxidación y la descomposición de los peróxidos (57) (61).

- Decoloración de carotenoides.

La oxidación acoplada de β -caroteno se ha usado frecuentemente como criterio para determinar la actividad de enzimas causantes de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y sus ésteres, así como para la evaluación comparativa de antioxidantes en oxidaciones enzimáticas y no enzimáticas (63).

Muchos investigadores (64) han encontrado que la lipoxigenasa ácida de soja (L-2 y L-3) es un catalizador más activo en la oxidación de β -caroteno que la lipoxigenasa alcalina (L-1). Por otro lado, se ha demostrado (40) que los isoenzimas L-2 y L-3 de soja, purificados, no son catalizadores efectivos del blanqueamiento de carotenos en presencia de linoleato de metilo o ácido linoleico y oxígeno. Sin embargo, combinaciones de L-1 y L-3 ó L-2 y L-3 tienen un efecto sinergista sobre la destrucción de caroteno. La L-3 también decolora β -caroteno cuando se reemplaza la L-1 ó L-2 por el isómero 13-hidroperóxido de la peroxidación del ácido linoleico.

Los resultados de Grosch and Laskawy (65) indican que los isoenzimas no actúan sinérgicamente en la oxidación de carotenos encontrando en cambio, que el 13-hidroperóxido del ácido linoleico, estimula la oxidación del ácido linoleico así como el blanqueamiento de polienos tales como el β -caroteno.

Ikediodi y Snyder (64) investigan la co-oxidación de β -caroteno usando lipoxigenasa de soja L-1, y los resultados sugieren una nueva interpretación del papel de este isoenzima en la decoloración de β -caroteno. Admiten que la L-1 co-oxida al β -caroteno mientras cataliza la oxidación del ácido linoleico. Se establece además que la L-1 también co-oxida al β -caroteno cuando el hidroperóxido de linoleico se sustituye por ácido linoleico. La proporción de β -caroteno oxidado es menor con el hidroperóxido que con el ácido linoleico. Los productos de la oxidación enzimática del β -caroteno son esencialmente

los mismos con ácido linoleico que con el hidroperóxido del ácido linoleico. Los estudios de relación de β -caroteno oxidado indican que el ácido linoleico y β -caroteno son inhibidores competitivos, pero el hidroperóxido y β -caroteno no compiten.

Puesto que la L-1 es el isoenzima predominante presente en la harina de soja y es mucho más estable que la L-2 y L-3, la L-1 puede ser un importante catalizador en el blanqueamiento de harina de trigo por harina de soja.

Grosman et al (66) afirman que la L-1 sólo interviene en el blanqueamiento de pigmentos y producción de carbonilos bajo condiciones anaeróbicas.

Iminabo y Gordon (67) estudian la co-oxidación de β -caroteno por una mezcla natural de isoenzimas de lipoxigenasa de soja, encontrando que la relación de oxidación del ácido linoleico y β -caroteno es 23,3:1 y que la proporción de β -caroteno decolorado aumenta con la concentración de dicho caroteno. Por otro lado la relación entre la oxidación del ácido linoleico y del β -caroteno es independiente de la temperatura puesto que las dos reacciones tienen idéntica energía de activación dentro del error experimental.

- Decoloración de clorofilas.

Según varios autores (68) (69), Strain en 1941, fue el primero en observar que las clorofilas "a" y "b" se oxidaban a sustancias incoloras en pre-

sencia de oxígeno en un sistema formado por un extracto acuoso de soja y lípidos.

Posteriormente, otros investigadores encontraron que se habían destruido las clorofilas de los guisantes verdes congelados que no habían sido escalados. Se demostró que esto era debido a la acción de lipoxigenasa. También se relacionó la degradación de clorofilas en judías verdes congeladas con la peroxidación de ácidos grasos.

Holden (68) establece que la lipoxigenasa de semilla de soja interviene en el blanqueamiento de la clorofila por co-oxidación durante una reacción en cadena que involucra la peroxidación de ácidos grasos y la destrucción del hidroperóxido lipídico por un factor de calor lábil. Los ácidos más efectivos son los sustratos conocidos para la lipoxigenasa.

Estudios adicionales (40) confirman que los hidroperóxidos lipídicos resultantes de la acción de lipoxigenasa sobre el ácido linoleico aceleran el blanqueamiento de clorofilas, pero tendrán que identificarse otros enzimas que probablemente estén implicados en esta reacción.

Según Yoon y Klein (6) la lipoxigenasa 1 de guisante produce decoloración de clorofila mientras que la lipoxigenasa 2 no muestra dicha actividad.

En relación al poder destructor de la lipoxigenasa (7) cabe citar por último su acción sobre

otras sustancias de vital importancia como son por ejemplo el colesterol y la vitamina A.

3.4.4.- INHIBICION DEL ENZIMA.

Iminato y Gordon (67) estudiando la co-oxidación del β -caroteno por lipoxigenasa de soja, encuentran que ésta se reduce en presencia de BHT y α -tocoferol.

En este mismo sentido Grossman y Waksman (70) aclaran que la lipoxigenasa se inhibe por la formación del complejo α -tocoferol-lipoxigenasa.

Clorofilas y carotenoides inhiben la actividad aeróbica de la lipoxigenasa-2, (66).

La inhibición parece ser no competitiva a bajas concentraciones de pigmentos mientras que con concentraciones superiores pasa a ser competitivas.

3.4.5.- EXTRACCION DEL ENZIMA.

En líneas generales, los métodos encontrados en la bibliografía para proceder a la extracción del enzima, se basan en un tratamiento con batido del fruto correspondiente con un tapón adecuado, seguido de una centrifugación y filtración del sobrenadante, que constituye el extracto activo.

Bonnet y Crouzet (71) usan tampón tris-HCl 0,5 M a pH = 8, conteniendo ácido ascórbico 1 % (W/V) y EDTA 1 % (W/V). Kermasha y Metche (60) sólo utilizan tampón tris-HCl 0,1 M a pH = 7,3.

Yoon y Klein (6) extraen el enzima con fosfato sódico 50 mM, pH = 6,8, en cambio Olías y Valle (72) emplean el mismo tampón pero conteniendo además ditiotreitól (DTT) 0,3 mM y Tritón X-100 al 0,2 %.

3.4.6.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPOXIGENASA.

El sustrato comunmente utilizado es una solución de ácido linoleico. Algunos investigadores emplean para este fin el mismo tampón con el que extraen el enzima, como Kermasha y Metche (60), quienes además adicionan Na_2CO_3 1 % para neutralizar la mezcla, y Tween 0,5 % (W/V).

Otros autores, Yoon y Klein (6), emplean la mezcla Tween 20 y KOH al 5,6% en H_2O desionizada mientras que Bonnet y Crouzet (71) preparan la solución de forma análoga, pero neutralizan con NaOH al 4 % y agitan primero fuertemente con una pequeña cantidad de agua, diluyendo después hasta un volumen determinado.

La actividad de la lipoxigenasa se obtiene generalmente por medidas espectrofotométricas y polarográficas (6) (61) (70).

4.- MATERIALES Y METODOS.

4.1.- MATERIA PRIMA EMPLEADA.

4.1.1.- PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS.

- Experiencia de maduración.

Para estudiar la influencia del proceso de extracción del aceite sobre el contenido inicial de pigmentos en frutos maduros y sanos, se apartan dos olivos de la variedad Hojiblanca en la finca de la Escuela de Capacitación Agraria de Cabra (Córdoba).

Durante la etapa de recolección se analizan los pigmentos presentes en aceitunas, tanto cualitativa como cuantitativamente. Paralelamente se efectúan análogos controles en dos muestras de aceite procedente de aceitunas con distinto grado de madurez.

- Experiencia de almacenamiento.

Con el propósito de conocer si hay alguna degradación de pigmentos durante el almacenamiento de los frutos del olivo, se forma un troje con aceitunas maduras de la variedad Hojiblanca. Periódicamente, durante un mes, se investiga la actividad lipoxigenasa y el contenido y clase de pigmentos, tanto en los frutos como en el aceite correspondiente extraído en la Almazara Experimental del Instituto de la Grasa.

- Experiencia industrial.

Análogamente a la experiencia de campo, se controlan los pigmentos en frutos y aceites procedentes de una

industria de la zona de Puente Genil (Córdoba), tal y como se reciben y molturan durante todo el periodo de funcionamiento normal en campaña.

4.1.2.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

- Formación del troje.

En la Almazara Experimental del Instituto de la Grasa se forma un troje de 2.000 kg de frutos maduros y se diferencian tres zonas para la toma de muestras: fondo, media y superior.

- Extracción del aceite en laboratorio a nivel experimental.

Se trituran aproximadamente 2 kg de frutos en un molino de martillo. La pasta resultante se homogeneiza y se reparte en el interior de dos cazos para proceder a la operación de batido en aparato AVENCOR durante 20 minutos. A continuación se añaden a la pasta 200 ml de agua caliente y aproximadamente 5 g de talco para ayudar a la extracción, continuando el batido durante 10 minutos. Finalizada esta operación se procede a centrifugar separándose la fase sólida-orujo y la líquida en alpechín y aceite.

Por último se vierte el aceite sobre una probeta y se adiciona nuevamente a la centrifugadora 200 ml de agua caliente. Se pone en funcionamiento para facilitar el arrastre del aceite que pueda que-

dar en las paredes; la fase líquida se reúne con la anterior en la probeta y se incorpora la cantidad de agua caliente necesaria para que ayude a decantar el alpechín. Transcurrido un mínimo de media hora, se filtra a través de papel jarabe para obtener el aceite puro.

- Extracción del aceite a nivel industrial.

El aceite suministrado por la industria lo extraen según sistema continuo de centrifugación Pieralisi. En este proceso, la pasta una vez batida es bombeada a las centrífugas horizontales donde se le hace girar a 3000 - 3500 rpm. Son aparatos que trabajan en "fase dinámica", en los que los sólidos se van desplazando a lo largo del eje de giro y son descargados continuamente (73).

4.1.3.- TOMA DE MUESTRAS.

En el troje los controles se efectúan cada ocho días, disponiendo para cada análisis de $\frac{1}{2}$ kg de frutos y 300 ml de aceite según las tres zonas establecidas: fondo, media y superficie.

Para la experiencia de campo y la efectuada en la almazara industrial, la toma de muestras se realiza cada 15 días disponiendo para tal fin de 2 - 3 kg de frutos en cada caso y 300 ml y 1 litro de aceite, respectivamente.

4.2.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LIPOXIGENASA.

4.2.1.- PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO.

Entre los distintos métodos que da la bibliografía (6) (60) (72), existen pequeñas variaciones en la elección y preparación del tampón para la extracción del enzima. Generalmente la operación se realiza entre valores de pH que oscilan entre 6,5-7 unidades. En el presente estudio la forma operativa adoptada es la siguiente:

Se pesan seis aceitunas deshuesadas en un vaso de batidora previamente tarado. Se añade el peso en pulpa de PVP hidratado (polivinilpirrolidona Sigma Chemical Co) para retener los compuestos fenólicos y tres volúmenes de tampón fosfato sódico 50 mM a pH = 6,8 que contiene 0,2 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, Panreac) y 10 mM de metabisulfito sódico (Panreac).

Esta mezcla se homogeneiza a 4°C con un ultra-turrax durante cinco sesiones de 20 segundos a intervalos de un minuto. El PVP se retira por filtración a vacío y el filtrado resultante se centrifuga a 15000 rpm durante 20 minutos a 4° C. El sobrenadante se pasa por cuatro capas de gasa hidrófila para eliminar los lípidos flotantes y el líquido resultante constituye el extracto crudo enzimático.

4.2.2.- PREPARACION DEL SUSTRATO.

La solución de sustrato se obtiene modificando ligeramente los métodos usados por distintos investigadores (6) (60) (71).

Se pesan 70 mg de ácido linoleico 99 % (ácido cis-9-cis-12 octadecadienoico, Sigma Chemical Co) en tubo de ensayo y se añaden 5 ml de H₂O bidestilada y desoxigenada, que contiene 0,09 ml de Tween 20 (Sigma Chemical Co). Después de agitar, se añaden 0,14 ml de NaOH al 8% hasta total transparencia. Se agita un poco, y si no se consigue total transparencia se añaden algunas gotas más. Se lleva hasta 25 ml con H₂O, separándose de esta solución alícuotas de 2 ml que son congeladas a -30° C. Cada una no se usa más de dos veces. La concentración final de ácido linoleico en la solución es de 10,7 mM.

4.2.3.- ENSAYO ENZIMATICO.

La actividad de lipoxigenasa se obtiene por medida espectrofotométrica (6) (60) (71), y está basada en el aumento de absorbancia a 234 nm, longitud de onda a la que absorben los dienos conjugados resultantes de la hidroperoxidación del ácido linoleico.

La unidad internacional de actividad enzimática (catal) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μ mol de producto por minuto.

En la célula espectrofotométrica se pone la mezcla de reacción, consistente en 3 ml de tampón fosfato sódico 200 mM pH = 6,2 y 2 μ l o más de extracto enzimático. La cantidad de extracto será la suficiente para obtener un incremento de 0,09 unidades de absorbancia por minuto. Se agita bien tapando la cubeta con parafilm. La reacción se inicia añadiendo 25 μ l de sustrato, solución de ácido linoleico, cuya concentración pasa a ser $8,8 \times 10^{-2}$ mM.

El espectrofotómetro se programa para que cada 3 segundos mida la absorbancia a 234 nm de longitud de onda durante 1 minuto.

Obtenida la diferencia de absorbancia ΔE en este tiempo, se sustituye en la ecuación:

$$\Delta E = E_o \cdot C$$

E_o : es la absorbancia molar específica medida en una celda de 1 cm.

Los resultados se dan en μ moles de producto formado por ml de extracto enzimático y minuto.

Realizadas las operaciones oportunas, la ecuación resultante es:

$$C = \frac{\Delta E}{E_o} \cdot \frac{V_T}{V_E}$$

C = concentración en $\mu\text{moles/ml. min.}$

V_T = volumen total de la mezcla de reacción (ml).

V_E = volumen del extracto enzimático que cataliza la reacción (ml).

El coeficiente de extinción (E_o) en tampón fosfato sódico es:

$$E_o = 25 \text{ mM}^{-1}$$

4.3.-PREPARACION DE EXTRACTOS DE PIGMENTOS.

4.3.1.- EXTRACTO PURIFICADO DE MATERIA GRASA.

Se sigue el método puesto a punto por Mínguez y Garrido (74) para aceitunas, incluyendo las modificaciones oportunas para la adaptación a frutos muy maduros y aceites.

Se pesan de 15 a 30 g de aceitunas deshuesadas ó 15 g de aceite de oliva. En el caso de las aceitunas, se pasan rápidamente a un vaso de batidora que contiene unos 100 ml de solución de N,N-dimetilformamida saturada de MgCO_3 (0,1 g de MgCO_3 en 250 ml de N,N-dimetilformamida y filtrar), al objeto de prevenir la formación de feofitinas durante la maceración. Se tritura durante un minuto, se deja en maceración unos 10 minutos y se filtra a vacío. El residuo se recoge y se procede como antes hasta que los filtrados son totalmente incoloros. Normalmente tres extracciones son suficientes.

Los filtrados se reúnen en un embudo de decantación de 500 ml y se tratan con 70 ml de hexano al objeto de extraer la materia grasa. Se agita durante un minuto y se deja reposar hasta la completa separación de fases. La fase superior, con ligera tonalidad amarilla, retiene los lípidos y los carotenos. La fase inferior, correspondiente a la N,N-dimetilformamida, con el resto de pigmentos en solución, se vuelve a tratar con hexano dos veces más para eliminar totalmente los restos de lípidos.

Cuando la muestra es aceite, se disuelve directamente en 150 ml de N,N-dimetilformamida, separando la materia grasa de forma análoga a las aceitunas pero en 4 ó 5 extracciones con 50 ml de hexano.

La fase de N,N-dimetilformamida, tanto si procede de aceite o aceituna, se pasa a un embudo de decantación de 1000 ml que contiene 400 ml de solución de sulfato sódico al 2 %, a una temperatura próxima a los 0° C. En el caso de muestras de aceitunas, se añaden 70 ml de hexano y 70 ml de éter etílico y en las correspondientes al aceite las cantidades se rebajan a 50 ml. Se agita y se deja reposar hasta perfecta separación de fases (30 min.). La fase acuosa se desprecia. En ella quedan retenidos polifenoles y demás compuestos solubles en agua. La fase orgánica que contiene clorofilas y xantofilas en solución se filtra a través de un lecho de sulfato sódico anhidro. Se lava con éter etílico y la solución, exenta de agua, se concentra en rotavapor hasta sequedad, a temperatura inferior a 30° C. El residuo se recoge con 3 ó 5 ml de éter etílico, ciclohexano o acetona según finalidad.

Las fases de hexano que retienen lípidos y carotenos se transfieren a 100, 200 ó 300 ml de éter etílico, según sean muestras de aceitunas menos o más maduras o aceite, respectivamente. La saponificación se lleva a efecto con 100, 200, 300 ml de hidróxido potásico al 20 % en metanol a temperatura ambiente, según el tipo de muestra, con el objeto de hidrolizar los lípidos y purificar los carotenos. Esta operación necesita distinta cantidad de hidróxido potásico según sea la concentración en grasas de la muestra. Después de 2 horas se añade agua destilada para separar los jabones. La fase acuosa se despreja y la etérea se lava sucesivamente con agua destilada hasta conseguir un pH neutro, tratándose entonces con sulfato sódico acuoso al 2 %. Se filtra en lecho de sulfato sódico anhidro y se evapora en rotavapor hasta sequedad, a temperatura inferior a 30° C. El residuo seco se eluye con 3 ó 5 ml de éter etílico, ciclohexano o acetona según finalidad.

4.3.2.- EXTRACTO DE CAROTENOIDES.

Se pesan 30 g de aceitunas deshuesadas, y se realiza la extracción de pigmentos con acetona hasta decoloración total del residuo. Se pasan los filtrados a un embudo de decantación de un litro y se añaden 150 ml de éter etílico. Agitar y seguidamente adicionar agua destilada hasta una separación clara de fases. Desprejar la fase acuosa, y la etérea con los pigmentos en solución, se lava algunas veces más con agua destilada, hasta eliminar los restos de acetona.

Se agregan entonces 100 ml de KOH en metanol al 20 % y se agita fuertemente. Repetir la agitación a intervalos de unos 10 minutos, durante una hora. Las cantidades de éter etílico y KOH se aumentan en función del menor o mayor contenido en aceite de las aceitunas maduras.

Después de que la saponificación ha tenido lugar, se añade agua destilada para producir la separación de fases. La acuosa se pasa a otro embudo de decantación, se le añade éter etílico, se agita y se vuelve a proceder como antes, hasta que la fase etérea no tome color.

El extracto etéreo, con todos los pigmentos carotenoides en solución, debido al tratamiento con potasa tiene un pH elevado. Se lava por consiguiente sucesivas veces, con agua destilada, hasta conseguir la neutralidad y por último se trata con sulfato sódico acuoso al 2 %. Finalmente, se pasa a través de filtro con lecho de sulfato sódico anhidro a un matraz de rotavapor para concentrar, a presión reducida y a temperatura menor de 30° C. El residuo seco se disuelve con 5 ml de éter etílico se pasa a un frasco Supelco Inc. y se guarda en congelador a -30° C, hasta su utilización.

En las muestras de aceite, se pesan 15 g y se disuelven en 300 ml de éter etílico, saponificando con 300 ml de KOH en metanol al 20 %. Se sigue el proceso de forma análoga a las aceitunas, recogiendo el residuo final en 5 ml de ciclohexano.

Todas las operaciones de extracción, saponificación, cromatografía y elución de pigmentos se realizan bajo luz verde difusa o en completa oscuridad, al objeto de evitar la alteración de compuestos.

4.4.- SEPARACION DE PIGMENTOS.

La separación de pigmentos se efectúa por cromatografía en capa fina.

Con fines cualitativos se emplean placas flexibles de aluminio, recubiertas de gel de sílice con indicador fluorescente UV₂₅₄, (Scharlau), de 0,10 mm de espesor.

Para la cuantificación de pigmentos se usan placas de vidrio (20 x 20 cm) revestidas en el laboratorio con gel de sílice 60 GF₂₅₄ (Merck nº 7730) y de espesor 0,7 mm. Una vez secas al aire se activan durante una hora en estufa a 120° C.

La cromatografía se desarrolla en cámara saturada, empleando los siguientes líquidos de desarrollo.

- Eter de petróleo (65 -95° C)/acetona/dietilamina (10:4:1), para separación general de pigmentos.
- Benceno/etanol (22: 1) para separar luteína de auroxanteno.

4.5.- IDENTIFICACION DE PIGMENTOS:

4.5.1.- CLOROFILAS.

Estos compuestos presentan una coloración particular en la placa de cromatografía bajo luz visible, así como una característica fluorescencia fresca bajo luz U.V.

Los valores de Rf en capa fina, y los espectros de absorción electrónica en éter etílico y acetona, completan su identificación (74).

La pureza de estos componentes se comprobó por co-cromatografía con clorofilas patrones suministradas por la Casa Sigma (clorofila "a", nº C-6144, y clorofila "b", nº C-3878) y patrones obtenidos en el laboratorio a partir de hojas frescas de espinacas, utilizando distintos líquidos de desarrollo.

4.5.2.- FEOFITINAS.

Tanto el color y los valores de Rf en capa fina, como los espectros de absorción electrónica caracterizan suficientemente la identidad de estos compuestos.

Los patrones puros de feofitina "a" y feofitina "b" se obtienen a partir de los de clorofilas por acidificación con HCl. Soluciones de clorofila "a" y clorofila "b" en éter etílico, se tratan con

HCl del 13 % (W/W) durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se lava repetidamente con agua destilada hasta eliminación del ácido.

4.5.3.- CAROTENOIDES.

Se identifican inicialmente teniendo en cuenta sus propiedades de adsorción, color y posición en la placa de cromatografía en capa fina, y por las características espectrales que muestran, tanto en el visible como en el ultravioleta, en distintos disolventes.

Asimismo, todos los compuestos se comparan con patrones puros, procedentes de la Casa Roche el β -caroteno, y obtenidos en el laboratorio a partir de alfalfa, los de luteína, violaxanteno y neoxanteno.

Posteriormente, para la caracterización de grupos funcionales, se ensayan distintas reacciones químicas específicas que se describen a continuación (42) (50).

- Espectro I.R:

Se parte del extracto purificado de materia grasa sin saponificar. Después de realizada la cromatografía se eluye el componente con éter etílico, se seca y se mezcla con 0,3 g de BrK en un mortero de ágata hasta homogeneización total y seguidamente se procede a prensar para obtener la pastilla.

- Prueba para los 5,6-epóxidos:

A una solución del pigmento en etanol absoluto, se le realiza el espectro de absorción antes y después de añadirle, en la misma cubeta, unas gotas de HCl concentrado. Un grupo epóxido, ocasiona un desplazamiento hipsocrómico de 15 a 20 nm, y la presencia de dos grupos epóxidos, de 35 a 40 nm.

Los carotenoides epóxidos también se caracterizan por su reacción con HCl en la placa de cromatografía. Una vez desarrollado el cromatograma se expone a vapores de HCl concentrado mediante un vaporizador. Los diepóxidos dan un color azul intenso mientras que los monoepóxidos adquieren una tonalidad azul verdosa. Los carotenoides dihidroxi-, toman un color marrón bordeado de verde. Los demás carotenoides, o no cambian de color o pasan a marrón.

4.6.- CUANTIFICACION.

Una vez concluido el desarrollo cromatográfico de una cantidad conocida del extracto de pigmentos, se raspa de la placa cada uno de los componentes y se eluyen con acetona hasta un volumen determinado. A continuación se obtiene el espectro de absorción, y el valor de la extinción E, a la longitud de onda de máxima absorción, se sustituye en la ecuación:

$$E = E_0 \cdot C$$

Donde: E_o es la absorbancia específica de una solución al 1 % (1 g por 100 ml) medida en una celda de 1 cm. Efectuadas las operaciones oportunas los resultados se dan en mg/kg de fruto deshuesado. La ecuación resultante es:

$$C = \frac{E \cdot V_i \cdot V_f}{E_o \cdot pm \cdot Vcr} \times 10.000$$

C = concentración (mg/kg).

V_i = volumen inicial del extracto de pigmentos (ml).

V_f = volumen final al que se eluye el pigmento (ml).

pm = peso de muestra (g).

Vcr = volumen cromatografiado (ml).

Los coeficientes de extinción (E_o) en acetona, se calculan a partir de los que da la bibliografía, en éter etílico para clorofilas y feofitinas y en etanol para carotenoides. En la Tabla I se indican estos coeficientes.

4.7.- APARATOS UTILIZADOS.

- Rotavapor Büchi, modelo R.110.
- Lámpara DESAGA UVIS, provista de luz blanca y ultravioleta, $UV_{254,366}$.
- Aparato Suthern, Mod. Unoplen para la elaboración de placas cromatográficas.
- Espectrofotómetro de I.R., Perkin Elmer 782, dotado de computador, mod. 3600.

TABLA I

Máximos de absorción y coeficientes de extinción.

Pigmento	Disolvente			
	Acetona			
	λ_{\max}	E_o	λ_{\max}	E_o
Clorofila "a"	428	840	662	670
Clorofila "b"	454	1450	646	518
Feofitina "a"	406	1290	666	540
Feofitina "b"	430	2060	654	395
Luteina	446	2340	472	2000
β -caroteno	450	2620		
Violaxanteno	440	2340		
Neoxanteno	438	2050		
Neocromo	420	2270		
	Acetona/piridina (1:1)			
	λ_{\max}	E_o	λ_{\max}	E_o
Clorofilida "a"	438	813	668	648
Clorofilida "b"	468	1471	654	504
Feoforbida "a"	410	1237	668	510
Feoforbida "b"	434	2075	660	400

- Homogeneizador "politrón", Ultra-Turrax, mod. T 25.
- Ultracentrífuga refrigerada, Sorvall, mod. RC-5.
- Espectrofotómetro UV/Vis Hewlett Packard 8452 A conectado a un computador HP 89500 A y provisto de impresora HP 2225 y trazado de gráficas HP 7550 A.

5.- RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1.- IDENTIFICACION DE PIGMENTOS.

La Tabla II muestra las características del cromatograma tipo obtenido al manchar en paralelo muestras de extracto purificado de materia grasa correspondientes al fruto fresco maduro y aceite de oliva virgen.

Por orden de aparición en la placa cromatográfica, se enumeran del 1 al 10 todas las bandas observadas, al margen de su procedencia. La primera, común en ambos desarrollos, tiene tonalidad amarillo-naranja. A continuación aparecen cuatro bandas que bajo luz ultravioleta muestran fluorescencia fresa. Las correspondientes a los nº 2 y 3, procedentes del aceite virgen, tienen a la luz natural una tenue coloración grisácea y marrón respectivamente. Las dos siguientes presentan fuerte coloración verde, la nº 4 con tonalidad azulada y la nº 5 amarilla, constituyendo los únicos componentes clorofílicos del fruto maduro.

La banda nº 6 muestra a la luz blanca un color naranja-amarillento, mientras que la nº 7 posee tonalidad amarillo-naranja.

Las dos bandas siguientes son de coloración amarillo intenso y la última aparece como amarillo-limón.

- Pigmentos clorofílicos.

Por su situación y color en la placa a la luz natural, y la fluorescencia fresa que muestran

TABLA II

Cromatograma obtenido a partir del extracto de pigmentos purificados de materia grasa, correspondiente a fruto fresco maduro y aceite de oliva virgen.

<u>Banda nº</u>	<u>Aceitunas maduras</u>		<u>Color en placa</u>		<u>Aceite de oliva virgen</u>
	<u>Valor</u>	<u>Rf</u>	<u>Luz blanca</u>	<u>Luz U.V.</u>	<u>Valor Rf</u>
1	1		Amarillo-naranja		1
2	-		Gris	Fluorescencia fresa	0,57
3	-		Marrón	Fluorescencia fresa	0,53
4	0,51		Verde-azulado	Fluorescencia fresa	0,51
5	0,44		Verde-amarillento	Fluorescencia fresa	0,44
6	0,41		Naranja-amarillento		0,41
7	0,35		Amarillo-naranja		0,35
8	0,28		Amarillo		0,28
9	-		Amarillo		0,19
10	0,15		Amarillo-limón		0,15

Placas recubiertas con sílicagel 60 GF₂₅₄.

Líquido de desarrollo: éter de petróleo (65-95° C)/acetona/dietilamina (10:4:1).

bajo luz ultravioleta, las bandas nº 2 y 3 se asocian con los derivados clorofílicos feofitina "a" y feofitina "b".

Una vez raspadas de la placa de manera individual las sustancias problema, se eluyen con acetona o éter etílico para obtener los respectivos espectros de absorción. Paralelamente y con la misma finalidad, se preparan patrones de feofitinas "a" y "b" a partir de clorofilas, por adición a dichas soluciones de HCl concentrado.

El estudio de los espectros de absorción obtenidos, así como el resultado de la co-cromatografía con los patrones puros, identifican la banda nº 2 como feofitina "a" y la nº 3 como feofitina "b".

La coloración que muestran las bandas nº 4 y 5 tanto bajo luz blanca como ultravioleta, orientan hacia clorofila "a" y clorofila "b" por orden de aparición en la placa cromatográfica.

Una vez raspadas dichas sustancias individualmente de la placa, se eluyen con acetona y se co-cromatografían con patrones puros de clorofila "a" y "b" suministrados por la casa SIGMA. Asimismo se obtienen los respectivos espectros de absorción. Los resultados obtenidos indican que se trata efectivamente de clorofila "a" y clorofila "b", respectivamente.

- Pigmentos carotenoides.

Para su identificación se tienen en cuenta las propiedades de adsorción de estos pigmentos en capa fina, su espectro de absorción y bandas de absorción en I.R.

La co-cromatografía con muestras patrones, y la caracterización de los grupos funcionales mediante distintas reacciones específicas, completan las pruebas realizadas con fines de identificación.

El desarrollo cromatográfico da la primera secuencia orientadora según los valores de Rf. Como es sabido, estos reflejan el poder de adsorción y, por consiguiente, establecen un orden en el grado de polaridad, que es una consecuencia directa del tipo y número de sustituyentes que forman la estructura de C₄₀.

La información que suministran los espectros de absorción en el visible, permite la selección de un número limitado de posibles pigmentos, con lo cual, las pruebas subsiguientes, pueden hacerse ya de una forma más completa y específica para confirmar o eliminar el componente en cuestión.

En la Tabla III se muestran las pruebas efectuadas para la caracterización de los distintos pigmentos presentes en los extractos de aceitunas maduras y en el aceite de oliva virgen. De dicho estudio se concluye que la banda nº 1 corresponde a β -caroteno. La nº 6, que en la aceituna se identifica

TABLA III

Características utilizadas para la identificación de pigmentos presentes en aceitunas maduras y aceite de oliva virgen.

Banda nº *	Máximos de absorción (nm)		IR		Prueba de epóxidos (tratamiento con HCl)		Pigmento identificado
	Eter de petróleo ligero	Cloroformo	-OH	Ester C = O	Desplazamiento hipsocrómico en etanol (nm)	Color en placa	
I. HIDROCARBUROS.							
1	(426), 444, 470	(434), 458, 476	-	-	0	Amarillo	β -caroteno
II. XANTOFILAS							
6	(418), 442, 472	(430), 454, 482	+	-	0	Marrón con bor- de verde	Luteína
6'	380, 400, 422	388, 410, 436	+	-	0	Azul	Auroxanteno
7		404, 428, 454	+	-	20	Azul verdoso	Luteoxanteno
8	414, 436, 466	422, 446, 476	+	-	40	Azul	Violaxanteno
9	410, 436, 466	420, 444, 476	+	-	0	Azul	Neocromo
10	399, 418, 446	402, 426, 454	+	-	14	Azul verdoso	Neoxanteno

Máximos de absorción (nm)

	Máximos de absorción (nm)		CLOROFILAS
	Acetona	Eter etílico	
2	406, 470, 501, 534, 558, 608, 666	406, 468, 504, 532, 558, 608, 666	Feofitina "a"
3	412, 432, 522, 558, 598, 654	412, 430, 522, 556, 598, 654	Feofitina "b"
4	428, 578, 616, 662	426, 576, 614, 660	Clorofila "a"
5	454, 595, 644	450, 594, 642	Clorofila "b"

Placas recubiertas con sílicagel 60 GF₂₅₄

Líquido de desarrollo: éter de petróleo (65-95° C)/acetona/dietilamina (10:4:1).

* Las bandas 6 y 6' se separan con benceno/etanol (22:1).

como luteína, durante su purificación en el aceite se desdobra en dos al cromatografiar sobre gel de sílice con el líquido de desarrollo benceno/etanol (22:1). El componente mayoritario sigue siendo luteína y el de menor proporción se identifica como auroxanteno.

Las bandas nº 7, 8, 9 y 10 corresponden respectivamente a luteoxanteno, violaxanteno, neocromo, presente sólo en el aceite y, neoxanteno.

5.2.- EXPERIENCIA DE MADURACION.

La aceituna de molino se suele recolectar cuando alcanza completa madurez. Durante este proceso el color del fruto se va oscureciendo hasta adquirir un tono púrpura negruzco, al mismo tiempo que aumenta el contenido en aceite, que suele oscilar entre un 20 - 30 %.

Por estudios previos a la iniciación de este trabajo, se conoce la evolución cualitativa y cuantitativa de pigmentos en los frutos del olivo durante las fases de crecimiento y desarrollo. Según Mínguez y Garrido (75) la concentración de clorofilas y carotenoides va decreciendo paulatinamente durante estas etapas, a la vez que el color de los frutos varía desde el verde fuerte, al verde-amarillento y morado. Este cambio de color, se atribuye, a la dilución de todos los pigmentos en el interior del fruto, por estar éste en pleno periodo de crecimiento, asimilación de aceite, y aumento de peso y volumen. Cuando el fruto alcanza su total desarrollo de tamaño es cuando se inicia el periodo de la maduración.

La investigación en aquel momento, orientada a la aceituna de mesa, no contempló el fruto con destino a almazara, ya que concluyó en la etapa del envero, cuando la coloración de la piel se torna morada.

Por tal motivo, se ha considerado de interés, analizar los pigmentos presentes en aceitunas maduras con destino almazara, sanas y frescas, recién cogidas del árbol para caracterizar adecuadamente la materia prima de partida.

Por otra parte, y con análoga finalidad, se eligen dos puntos de maduración en plena época de recolección de aceitunas de molino, y se efectúan los correspondientes análisis para identificar y cuantificar los pigmentos presentes en los frutos y en el aceite correspondiente, extraído en la Almazara Experimental del Instituto de la Grasa.

- Frutos.

En las aceitunas, el paso entre crecimiento y madurez viene definido por la aparición en su superficie de unas pintas moradas, que poco a poco van cubriendo la piel hasta que posteriormente invaden la pulpa. Esta coloración se debe a las antocianinas.

Con la finalidad de conocer si la evolución de pigmentos cloroplásticos durante el ciclo de maduración difiere o nó con la anterior fase de crecimiento y desarrollo, en la Figura 7 se muestra la evolución por fracciones, abarcando los cambios de color que experimentan los frutos a lo largo de

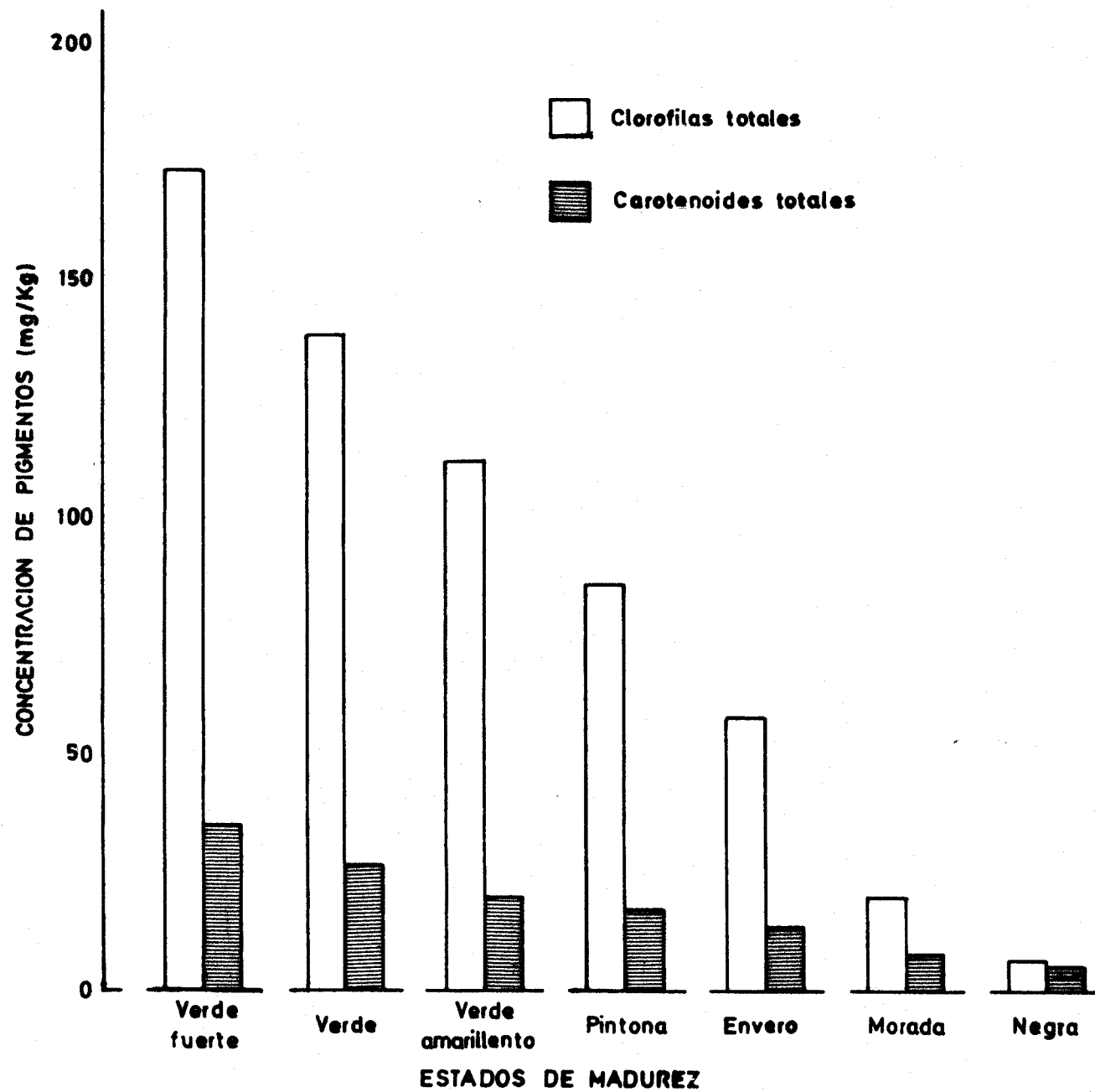


FIGURA 7.- EVOLUCION DE LA FRACCION CLOROFILICA Y CAROTENOIDE CONSIDERANDO LAS FASES DE CRECIMIENTO, DESARROLLO Y MADURACION.

todo el proceso. Al igual que ocurre en las primeras etapas, los pigmentos siguen disminuyendo durante la maduración pero a un ritmo totalmente distinto.

En la Tabla IV se recogen los valores individuales de pigmentos y la pérdida de los mismos, en porcentaje, durante las distintas etapas que incluye el ciclo de la maduración. El descenso paulatino de estos compuestos mientras que el fruto muestra tonalidad verde, se estima en un 19 % para clorofilas y en un 24 % para carotenoides. Sin embargo, al pasar al verde-amarillento la pérdida de clorofilas se acentúa mientras que la de carotenoides se mantiene. En el estado de moradas este ritmo se acelera para ambas fracciones experimentando la concentración de clorofilas una reducción del 64 % y situándose la de carotenoides en un 43 %.

Este drástico descenso en el contenido de pigmentos no se puede atribuir al efecto de dilución puesto que el fruto ya está formado, y la desaparición de clorofilas y carotenoides sólo puede explicarse porque o bien se destruyen o bien se eliminan por las vías conductoras.

El efecto de destrucción puede asociarse a la intervención de algún enzima oxidativo que los degradase a productos incoloros. Como el enzima lipoxigenasa está presente en los tejidos senescentes de los frutos, es probable que durante esta última etapa sea el causante indirecto de la caída de pigmentos.

Paralelamente, durante este mismo periodo la relación entre clorofilas "a" y "b", Tabla V, em-

pieza a disminuir, y la existente entre clorofilas y carotenoides totales, considerada constante en las etapas de crecimiento, a partir del estado de pintornas disminuye ostensiblemente.

Es evidente que al alcanzarse la maduración se rompe el equilibrio existente entre todos los pigmentos, desapareciendo las clorofilas más rápidamente que los carotenoides, lo cual vuelve a confirmar la hipótesis de la intervención de lipoxigenasa.

Por otro lado, hay que destacar que, como era de esperar, en las aceitunas sanas maduras, la composición cualitativa de pigmentos no difiere de la que poseen los frutos durante las etapas de crecimiento y desarrollo (75).

- Aceite virgen.

El estudio de pigmentos en frutos y aceite correspondiente, para dos grados de maduración en plena época de recolección, se recogen en la Tabla VI y la distribución porcentual de los mismos se muestran en la Tabla VII.

La presencia de feofitinas en el aceite, se atribuye a la degradación de clorofilas durante el proceso de extracción, ya que la proporción de ácidos que se liberan de los tejidos del fruto durante la molienda, en el tiempo de batido, y centrifugación, favorecen esta reacción. En un medio ácido, los iones hidrógeno transforman las clorofilas en sus co-

TABLA IV

Evolución de pigmentos durante las etapas de desarrollo y maduración de los frutos. Variedad Hojiblanca. (mg/kg).

	<u>Verde fuerte</u>	<u>Verde</u>	<u>Verde amarillento</u>	<u>Pintonas</u>	<u>Envero</u>	<u>Morada</u>	<u>Negra</u>
Clorofila "a"	137,82	112,16	89,90	67,92	44,04	15,68	5,10
Clorofila "b"	35,00	26,96	22,19	16,80	12,89	4,60	1,60
β -caroteno	8,41	6,34	5,08	4,16	3,67	2,24	1,50
Luteína	14,00	11,55	8,82	7,33	6,98	4,13	3,08
Violaxanteno	5,90	4,77	3,30	2,45	1,48	0,82	0,29
Neoxanteno	6,01	3,99	2,85	2,53	1,86	0,69	0,24

Pérdida de pigmentos entre las distintas etapas. (%).

Clorofilas totales		19,50	19,43	24,42	32,80	64,37	66,96
Carotenoides totales		22,35	24,76	17,85	15,06	43,67	35,15

TABLA V

Relación entre las principales fracciones de pigmentos cloroplásticos en la aceituna de la variedad Hojiblanca.

<u>Estado de madurez</u>	<u>Clorofila "a"/ clorofila "b"</u>	<u>Clorofilas totales/ carotenoides totales</u>
Verde fuerte	3,94	5,03
Verde	4,16	5,22
Verde amarillento	4,05	5,59
Pintonas	4,04	5,14
Envero	3,42	4,07
Morada	3,41	2,57
Negra	3,19	1,31

TABLA VI

Efecto de la maduración del fruto en el contenido individual de pigmentos (mg/kg).

<u>Fecha de recogida</u>	<u>Clorofilas y derivados</u>				<u>Carotenoides</u>			
	<u>Clorofila "a"</u>	<u>Clorofila "b"</u>	<u>Feofitina "a"</u>	<u>Feofitina "b"</u>	<u>β-caroteno</u>	<u>Luteína</u>	<u>Violaxan-teno</u>	<u>Neoxan-teno</u>
ACEITUNAS								
17-I-89	4,27	1,43	-	-	1,15	2,63	0,22	0,20
30-I-89	1,43	0,50	-	-	0,34	1,87	0,10	0,10
ACEITE								
17-I-89	1,70	0,38	1,46	0,66	3,33	6,88	0,59	0,44
30-I-89	1,30	0,16	0,43	0,18	1,66	5,14	0,57	0,24

TABLA VII

Composición porcentual de pigmentos en aceitunas maduras y aceite de la variedad Hojiblanca.

<u>Fecha de recogida</u>	<u>Clorofilas y derivados</u>				<u>Carotenoides</u>			
	<u>Clorofila "a"</u>	<u>Clorofila "b"</u>	<u>Feofitina "a"</u>	<u>Feofitina "b"</u>	<u>β-caroteno</u>	<u>Luteína</u>	<u>Violaxan-teno</u>	<u>Neoxan-teno</u>
ACEITUNAS								
17-I-89	43,13	14,44	-	-	11,62	26,57	2,22	2,02
30-I-89	32,95	11,52	-	-	7,83	43,09	2,30	2,30
ACEITE								
17-I-89	11,01	2,46	9,46	4,28	21,57	44,56	3,82	2,85
30-I-89	13,43	1,65	4,44	1,86	17,15	53,10	5,89	2,48

rrespondientes feofitinas, por sustitución del ión magnesio por protones en el anillo de porfirinas.

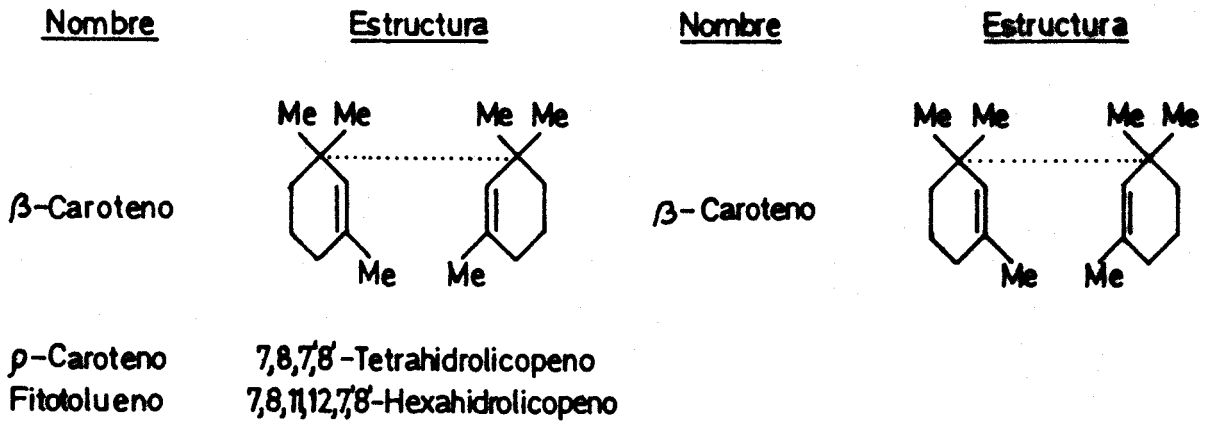
La formación de auroxanteno y neocromo en el aceite es también consecuencia de la acidez del medio, que favorece la transformación de xantofilas con grupos 5-6 epoxi a sus isómeros 5,8-furanoides. Estos pigmentos debido a su poca entidad no han sido valorados cuantitativamente. Violaxanteno y luteoxanteno dan lugar a auroxanteno, y neoxanteno a neocromo. Figura 8.

Respecto a la concentración de pigmentos en el aceite, se observa, así mismo, un descenso paralelo al que ocurre en el fruto. Sin embargo, en valor absoluto, las concentraciones encontradas para compuestos clorofílicos en el aceite son más o menos semejantes a las que poseen las aceitunas de las cuales proceden, pero el contenido individual de carotenoides es bastante superior, ya que aproximadamente se triplica.

5.3.- EXPERIENCIA DE ALMACENAMIENTO.

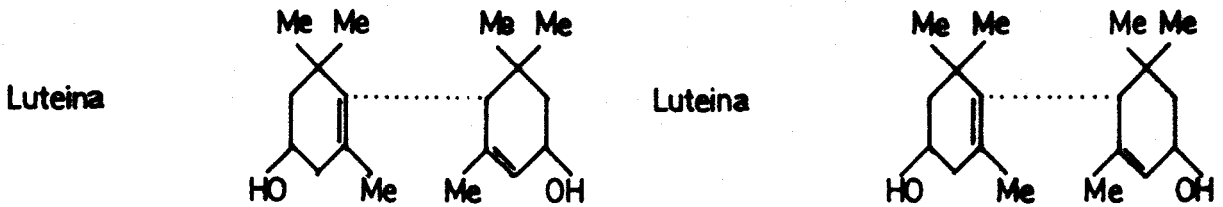
La falta de sincronización entre la recepción de aceitunas y la capacidad extractora de la almazara, obliga, a que los frutos se amontonen en los patios formando los denominados trojes, durante un plazo de tiempo más o menos largo. El tamaño de éstos, puede oscilar entre 1 - 10 metros de altura, produciéndose en las zonas más internas un calentamiento de la masa, que puede llegar hasta 50° C. Esto provoca en el fruto una serie de reacciones químicas, enzimáticas y microbiológicas que alteran notoriamente

1.- HIDROCARBUROS



2.-XANTOFILAS

2.1.-Hidroxiderivados



2.2.-Epóxidos

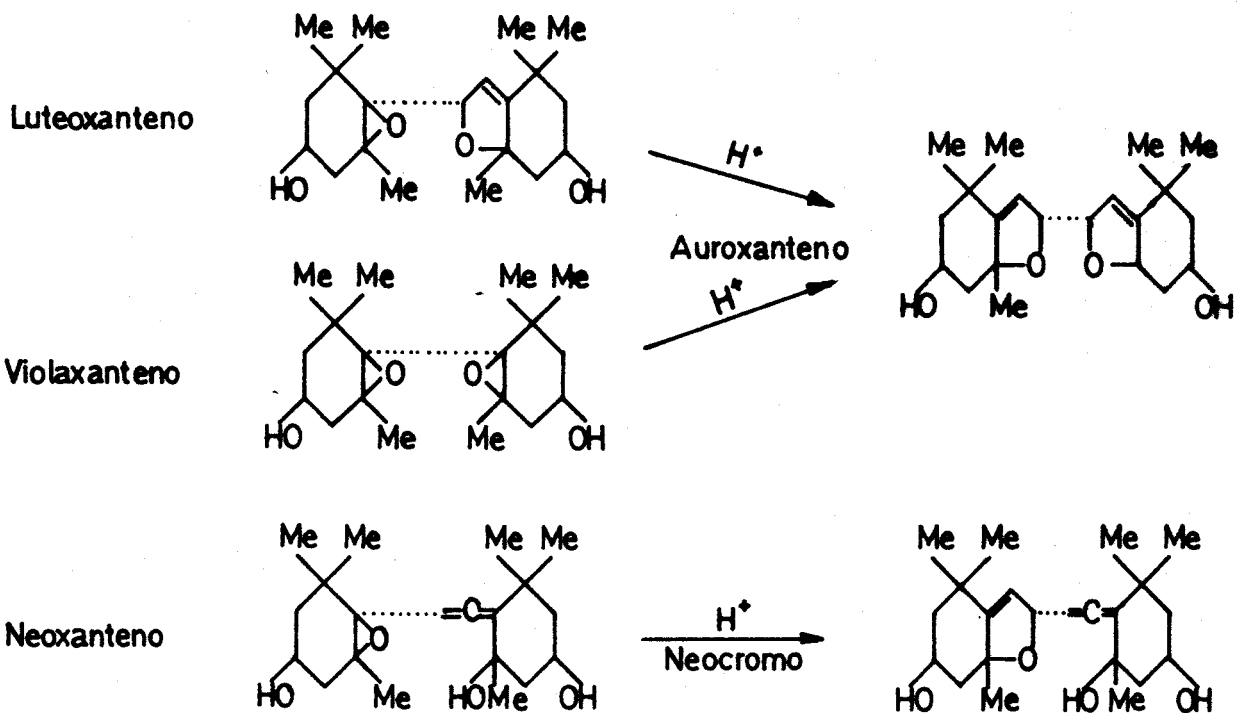


FIGURA 8.- TRANSFORMACION DE CAROTENOIDES.

la calidad del aceite extraído. Dichos aceites se caracterizan por su alta acidez, baja estabilidad, olor y sabor desagradables y aumento en el color.

- Frutos.

La evolución cualitativa de pigmentos clorofílicos y carotenoides durante el tiempo de almacenamiento de los frutos en el troje, distinguiendo las tres zonas encontradas, se muestran en la Tabla VIII. En todos los casos la secuencia seguida por los pigmentos es análoga y no se encuentran diferencias apreciables entre los resultados obtenidos en la parte superior, media e inferior del troje, para una misma fecha.

A título orientativo la cuantificación de cada pigmento se efectúa en función de la intensidad con que aparece cada sustancia en la placa cromatográfica. En general el color con que aparecen inicialmente se atenúa con el tiempo de atrojado. Las clorofilas experimentan un acusado descenso que se produce mayoritariamente a los ocho días de comenzar la experiencia. La fracción carotenoide disminuye de una manera más gradual.

Las clorofilas "a" y "b" sólo están presentes en las muestras iniciales y en los correspondientes a los ocho días del comienzo de la investigación, desapareciendo en su totalidad en las posteriores tomas.

TABLA VIII

Evolución cualitativa de pigmentos en aceitunas durante el almacenamiento en troje.

<u>Zonas</u>	<u>Tiempo de almacenamiento (días)</u>	<u>Clorofilas y derivados</u>			<u>Carotenoides</u>	
		<u>Clorofila "a"</u>	<u>Clorofila "b"</u>	<u>Feofitina "a"</u>	<u>β-caroteno</u>	<u>Luteína</u>
	0	++++	+++	+	++	+++
Superior	8	+	+	+	++	+++
"	16	-	-	++	+	++
"	24	-	-	+	+	++
"	32	-	-	+	+	+
Medio	8	+	+	+	++	+++
"	16	-	-	++	+	++
"	24	-	-	+	+	++
"	32	-	-	+	+	+
Inferior	8	+	+	+	++	+++
"	16	-	-	++	+	++
"	24	-	-	+	+	++
"	32	-	-	+	+	+

El mayor o menor número de cruces indica la intensidad relativa con que aparecen las bandas en capa fina. El signo - indica ausencia de pigmentos.

El aumento detectado en feofitinas a los 16 días de almacenamiento de los frutos se debe a la total transformación de clorofilas. Durante este tiempo, la célula vegetal pierde su resistencia vital, y con ella, el control sobre los compuestos químicos presentes, cuya distribución y reactividad había regulado anteriormente. La autólisis provoca la desintegración de las paredes celulares dando paso a que se desencadenen reacciones de todo tipo favorecidos aún más por la elevación de la temperatura interna del troje.

Como consecuencia, en el troje las aceitunas pierden su identidad y pasan a formar parte de una masa heterogénea impracticable para una toma de muestras adecuada. La dificultad que supuso la manipulación de frutos atrojados para la valoración individual de pigmentos, obligó a efectuar una cuantificación global de los mismos al objeto de minimizar pérdidas.

Para ello, a partir del extracto total de pigmentos en acetona, sin eliminación de materia grasa, se obtienen los respectivos espectros de absorción. El contenido clorofílico y carotenoide se calcula por el valor de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción, de cada fracción $\lambda = 666$ nm para clorofilas, y $\lambda = 472$ nm para carotenoides. La cuantificación se efectúa en función de los componentes mayoritarios, feofitina "a" y luteína, utilizando en cada caso los respectivos coeficientes de extinción (Tabla I). La evolución cuantitativa de estas fracciones se ofrece en la Tabla IX.

Los resultados confirman los comentarios efectuados con anterioridad sobre el progreso cuali-

TABLA IX

Evolución de la fracción clorofílica y carotenoide en aceitunas durante el tiempo de almacenamiento en trojes. Datos obtenidos a partir del extracto total de pigmentos en acetona (mg/kg).

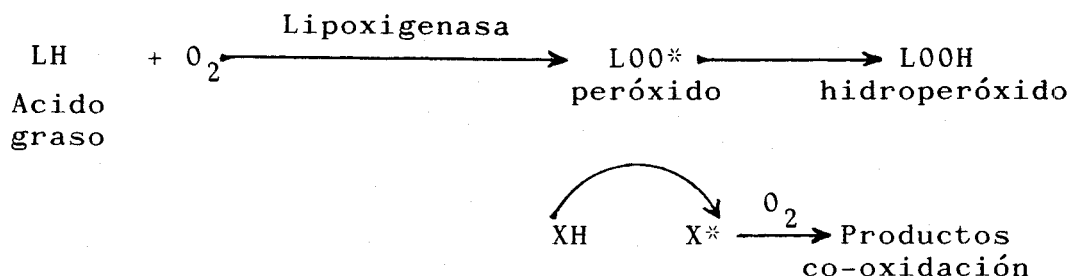
<u>Zonas</u>	<u>Tiempo de almacenamiento (días)</u>	<u>Fracciones valoradas</u>	
		<u>Clorofílica ($\lambda = 666$ nm)</u>	<u>Carotenoide ($\lambda = 472$ nm)</u>
	0	12,08	6,18
Superior	8	6,45	5,76
"	16	2,20	3,20
"	24	2,75	2,17
"	32	1,13	2,58
Medio	8	4,52	3,78
"	16	3,31	3,36
"	24	3,32	2,62
"	32	2,72	2,54
Inferior	8	3,63	3,72
"	16	3,84	2,39
"	24	2,58	2,15
"	32	3,14	2,27

tativo de estos pigmentos en el troje, no encontrándose diferencias sustanciales entre las distintas alturas estudiadas.

Esto indica que la temperatura interna del troje, no incide directamente sobre los pigmentos porque en caso afirmativo en la zona media, que es la que experimenta mayor elevación de temperatura, la termooxidación de estos compuestos provocaría un descenso destacado en la concentración de los mismos en dicha zona, efecto que no se produce.

- Actividad de lipoxigenasa.

Durante la maduración y almacenamiento de los frutos, la degradación celular va acompañada por la oxidación de los ácidos grasos insaturados que forman parte de los componentes lipídicos de las membranas. Clorofilas y carotenoides pueden experimentar oxidación bajo determinadas condiciones, en presencia de lipoxigenasa, dando lugar a productos de degradación incoloros. En esta reacción intervienen los radicales libres formados por acción de lipoxigenasa sobre los ácidos grasos insaturados con sistema cis, 1,4-pentadieno.



El radical peróxido, formado a partir del ácido graso, toma el hidrógeno del pigmento para formar el hidroperóxido. Al ceder el pigmento dicho hidrógeno, se forma un radical libre activado, que en presencia de oxígeno, dá productos de co-oxidación incoloros.

Para el control de esta enzima en los frutos, se procede de igual manera que para la evolución de pigmentos, efectuándose la medida de actividad enzimática en las tres zonas del troje. Los valores encontrados, que se dan en la Tabla X, evidencian, que no existen diferencias notables al comparar medidas paralelas entre los tres niveles, siguiendo en todos los casos, a lo largo del tiempo, la misma tónica de evolución. Este hecho permite englobar los datos correspondientes en sus respectivas medias.

Operando de esta manera, en la figura 9 se representa la evolución de la actividad de lipoxigenasa con el tiempo y se incluyen así mismo la de clorofilas totales y carotenoides. Se observa que a los ocho días de almacenamiento el máximo de actividad de la enzima que coincide con un descenso en el contenido de pigmentos, drástico, para la fracción clorofílica, y más atenuado para la de carotenoides.

Este hecho es indicativo de la probable participación de lipoxigenasa en la degradación de clorofilas y carotenoides, con tendencia a una mayor actuación sobre las primeras. Después de la primera semana, en una segunda etapa, la actividad enzimática disminuye sensiblemente, y el hecho de que los pigmentos permanecen casi constantes, corrobora la

TABLA X

Evolución de la actividad de lipoxigenasa en aceitunas almacenadas en trojes.

<u>Zona</u>	<u>Tiempo de almacenamiento (días)</u>	<u>Unidades de actividad (catales/ml extracto crudo)</u>	<u>Unidades de actividad (catales/g de fruto)</u>
	0	1,68	5,04
Superior	8	2,64	7,93
"	16	1,20	3,60
"	24	0,75	2,25
"	32	0,40	1,20
Medio	8	2,48	7,44
"	16	1,26	3,78
"	24	0,68	2,05
"	32	0,42	1,27
Inferior	8	2,91	8,73
"	16	1,38	4,14
"	24	0,83	2,49
"	32	0,43	1,29

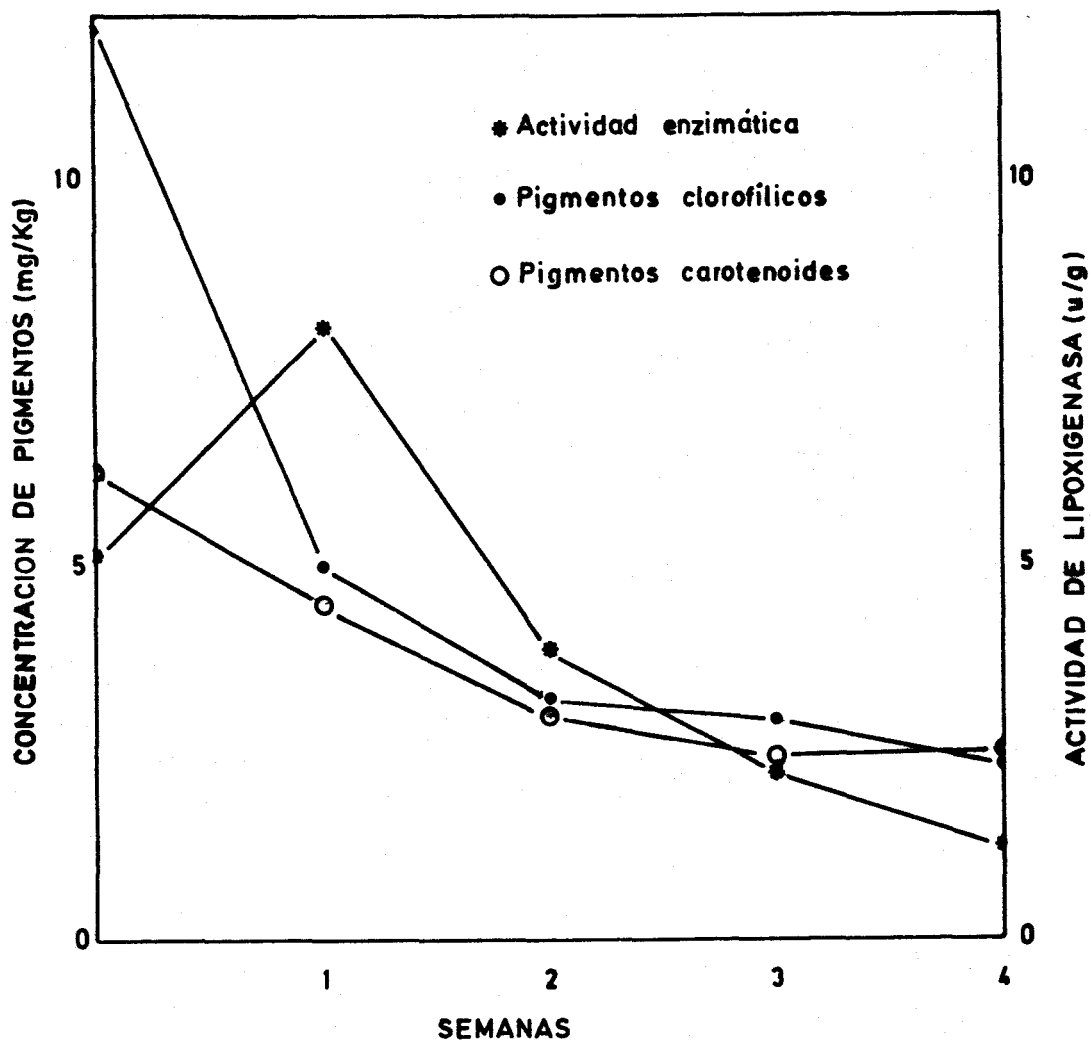


FIGURA 9.- EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD DE LIPOXIGENASA, CLOROFILAS Y CAROTENOIDES DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE LOS FRUTOS EN TROJES.

teoría anterior. En consecuencia la transformación de pigmentos a productos incoloros, puede estar mediada por la enzima lipoxigenasa.

- Aceite extraído de aceitunas atrojadas.

Los análisis efectuados previamente en el fruto, pusieron de manifiesto que la composición en pigmentos para las ya mencionadas zonas del troje, eran tan similares, que las diferencias existentes no merecían en principio un tratamiento de datos individual detallado. Por tal motivo, para abordar el estudio en el aceite extraído en cada fecha, se mezclan los correspondientes a las tres tomas, y los resultados se dan referidos al aceite resultante homogeneizado.

La cuantificación de pigmentos se efectúa en base a los espectros de absorción. A partir del extracto de pigmentos purificado de materia grasa, se obtiene el espectro correspondiente, y los cálculos se verifican operando de manera análoga que con los frutos, en base al valor de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción y utilizando los coeficientes de extinción correspondientes a los compuestos mayoritarios de cada fracción. El estudio de carotenoides, se realiza también a partir de la fracción insaponificable del extracto total de pigmentos.

Aunque de la muestra inicial de aceitunas se carece del aceite correspondiente, se prevé, por los resultados obtenidos en el fruto, que la concen-

tración en pigmentos, tendría que ser superior a las encontradas en las muestras posteriores, puesto que las aceitunas iniciales de partida contenían una mayor cantidad de pigmentos. Ahora bien, no se puede deducir en que proporción será dicho aumento, puesto que son varios los factores que intervienen en la composición pigmentaria final del aceite.

En consecuencia, la ausencia de datos correspondientes al aceite inicial de la experiencia, impide evaluar la incidencia del máximo de actividad de lipoxigenasa, detectado a los ocho días de almacenamiento de los frutos, sobre la pigmentación del mismo ya que el primer análisis efectuado en el aceite corresponde precisamente a los ocho días.

Los resultados correspondientes a los análisis realizado se muestran en la Figura 10, en la cual, mediante un diagrama de barras se compara la evolución de pigmentos en aceitunas y aceites durante el mes de almacenamiento. Los valores representados corresponden, en ambos casos, a la media de los obtenidos para los tres niveles del troje.

Los análisis efectuados en el primer control sitúan la pigmentación del aceite ligeramente por encima de la encontrada en los frutos. Sin embargo, a los 16 días del almacenamiento, tanto la concentración de la fracción clorofílica, como la de carotenoides, luteína y β -caroteno, se triplican en el aceite, manteniéndose ya este incremento hasta el final de la experiencia.

En la Figura 11 se muestran los espectros de absorción del aceite en ciclohexano observándose

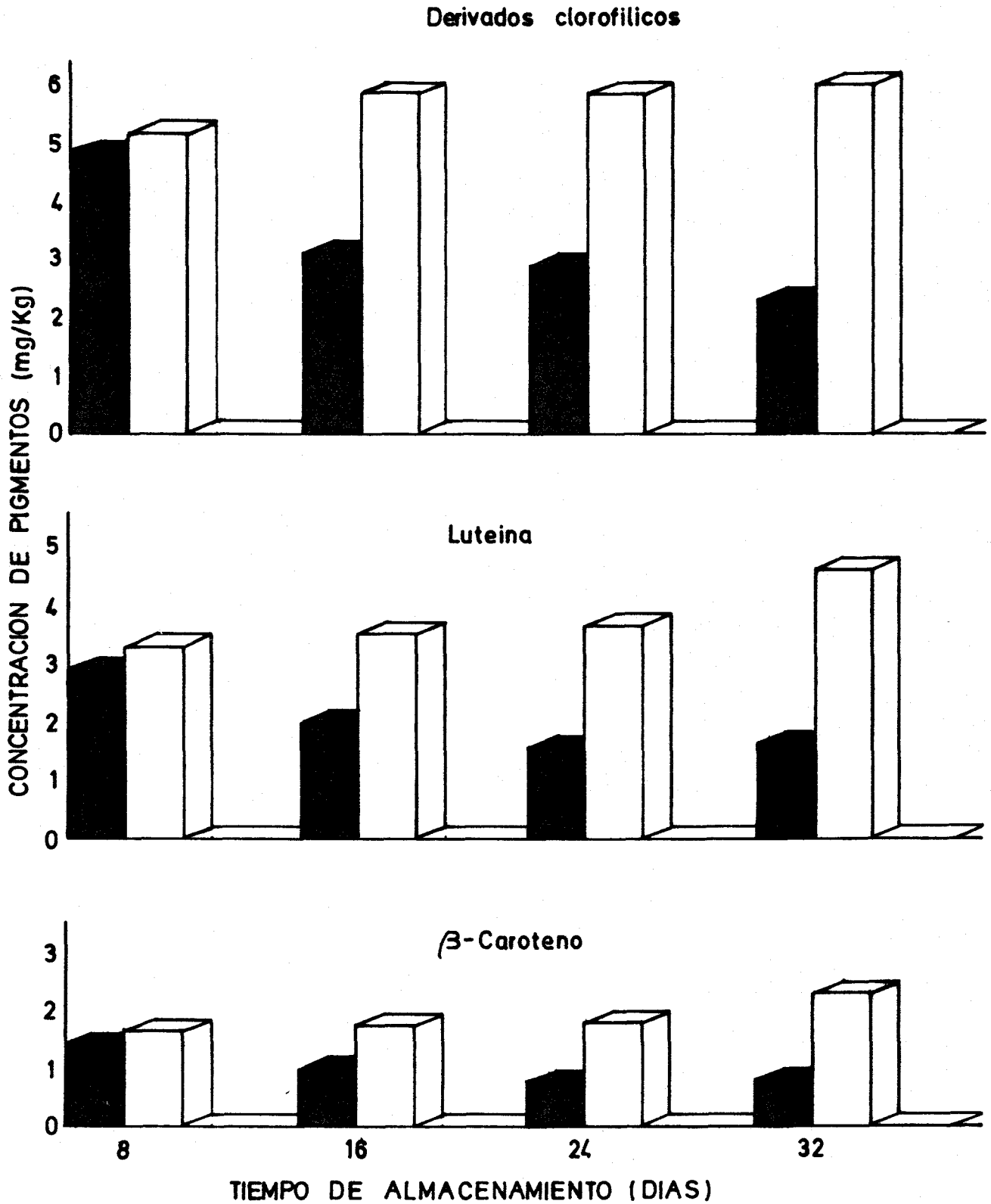
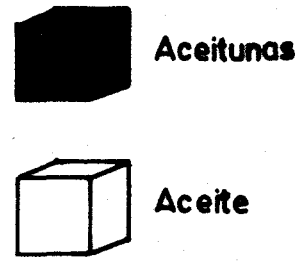


FIGURA 10.- COMPARACION ENTRE LOS PIGMENTOS PRESENTES EN ACEITUNAS Y ACEITE DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN TROJES.

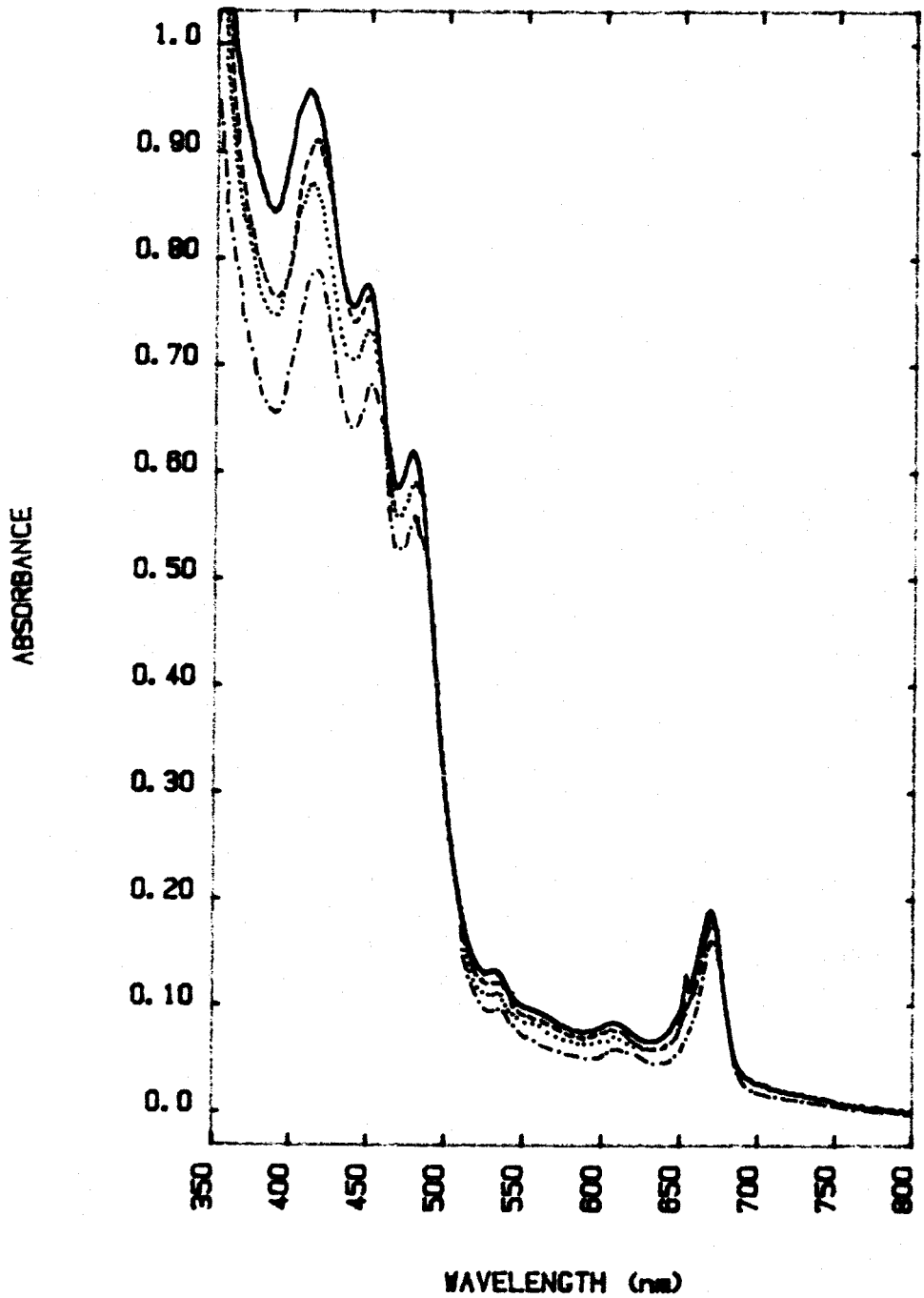


FIGURA 11.- EVOLUCION DE LOS ESPECTROS DE ABSORCION EN CICLOHEXANO CORRESPONDIENTES A LOS ACEITES EXTRAIDOS DE ACEITUNAS MADURAS. (--- a los 8 días, a los 16 días, ---- a los 24 días, — a los 32 días).

un ligero aumento en la altura de los picos, lo cual está de acuerdo con el aumento en la intensidad de color que encontraban Rodríguez de la Borbolla y col (15) al estudiar el efecto del atrojado sobre el color del aceite.

5.4.- EXPERIENCIA INDUSTRIAL.

Debido al problema anteriormente mencionado y que afecta al funcionamiento de todas las almazaras aunque los frutos se molturen en proceso continuo y en jornada de día y noche, prácticamente es imposible evitar que los mismos se amontonen a medida que van llegando a fábrica, por un periodo de tiempo indeterminado. En esta experiencia, que evidentemente es la más real, se solapan los efectos de maduración y almacenamiento.

La Tabla XI ofrece los cambios experimentados en el contenido individual de clorofilas, derivados clorofílicos y carotenoides, en aceitunas y aceite, durante el periodo de campaña. Una vez más, se vuelve a observar en los frutos una disminución paulatina en el tiempo, en la concentración de clorofilas mientras que los componentes carotenoides se pueden considerar que permanecen constantes excepto en la última muestra, en la que todos los pigmentos experimentan un brusco descenso.

En los frutos, una cantidad apreciable de clorofilas se transforman en feofitinas, mientras que otra porción se destruye durante el periodo de post-recolección, antes de que se extraiga el aceite. En el mismo intervalo de tiempo, β -caroteno y luteína comienzan a degradarse a productos incoloros úni-

TABLA XI

Concentración individual de pigmentos en aceitunas y aceite procedentes de una almazara industrial durante el periodo de recolección (mg/kg).

<u>Fecha de recolección</u>	<u>Clorofilas y derivados</u>				<u>Carotenoides</u>		
	<u>Clorofila "a"</u>	<u>Clorofila "b"</u>	<u>Feofitina "a"</u>	<u>Feofitina "b"</u>	<u>β-caroteno</u>	<u>Luteína</u>	<u>Resto de carotenoides</u>
ACEITUNAS							
26-XII-88	9,48	5,16	5,12	1,17	0,87	4,40	0,95
9- I -89	6,81	3,53	9,86	1,27	1,27	3,41	0,72
19- I -89	4,62	1,84	5,37	0,35	0,95	4,33	0,68
30- I -89	1,81	1,15	2,13	0,27	1,00	3,34	0,44
20-II -89	0,43	0,31	0,45	0,10	0,22	0,82	-
ACEITE							
26-XII-88	1,91	0,87	11,65	0,42	3,01	8,85	0,85
9- I -89	1,32	1,25	13,48	0,13	4,07	11,15	-
19- I -89	1,27	0,59	8,10	0,39	3,26	8,97	1,01
30- I -89	0,91	0,37	3,84	0,19	1,31	8,44	0,58
20-II -89	0,27	0,18	0,83	0,13	0,22	2,46	-

camente en las últimas fechas. El resto de carotenoides, violaxanteno, neoxanteno y neocromo, considerados minoritarios por su poca entidad, se evalúan juntos y se pierden gradualmente.

En el aceite, el proceso evolutivo es análogo y la concentración de pigmentos al comparar valores homólogos, o disminuyen como en el caso de las clorofilas, o experimenta un considerable aumento, como ocurre en los carotenoides.

La Tabla XII muestra la composición porcentual en las distintas fechas en que se efectúan los controles. Clorofila "a", principal componente inicial del fruto fresco, desaparece casi en su totalidad durante la post-recolección y se ausenta prácticamente en el aceite, dando lugar a su derivado libre de magnesio, feofitina "a". La luteína, pasa entonces a tener un mayor protagonismo convirtiéndose en el pigmento dominante, seguido de feofitina "a" y β -caroteno. Esto ocurre, tanto en el fruto como en el aceite, al avanzar el tiempo de cosecha.

La degradación de clorofilas ocurrida durante el tiempo que permanecen los frutos en fábrica antes de su molturación, así como la transformación debida al proceso de extracción calculado como porcentaje se muestra en la Tabla XIII.

En la Figura 12 se representa la evolución por fracciones, de los pigmentos clorofílicos y carotenoides, en frutos y aceite, durante los meses de recolección de aceitunas y funcionamiento de la almaza-

TABLA XII

Composición porcentual de pigmentos en aceitunas y aceites procedentes de una almazara industrial durante el periodo de recolección.

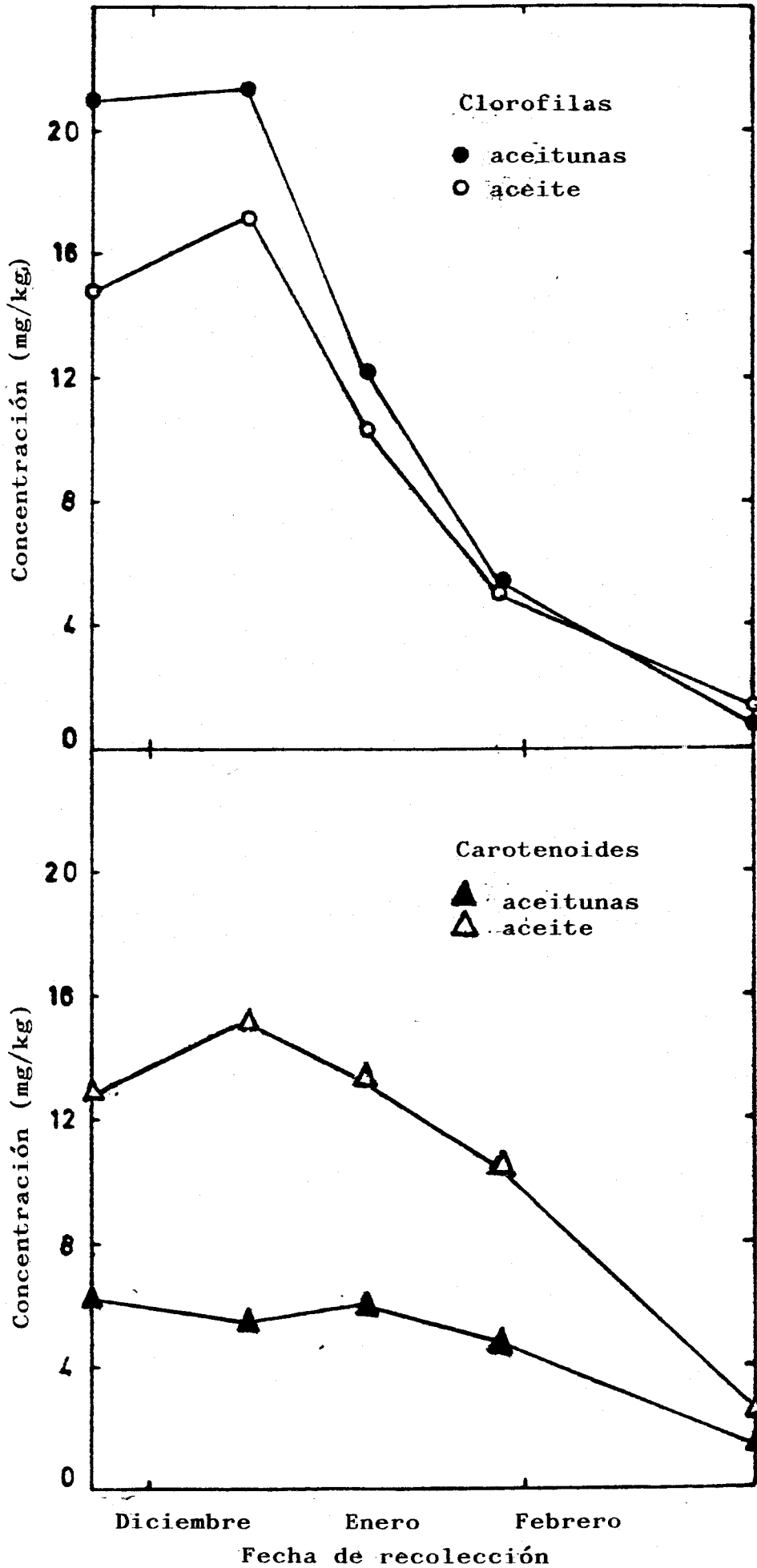
<u>Fecha de recolección</u>	<u>Clorofilas y derivados</u>				<u>Carotenoides</u>		
	<u>Clorofila "a"</u>	<u>Clorofila "b"</u>	<u>Feofitina "a"</u>	<u>Feofitina "b"</u>	<u>β-caroteno</u>	<u>Luteína</u>	<u>Resto de carotenoides</u>
ACEITUNAS							
26-XII-88	34,92	19,00	18,86	4,31	3,20	16,21	3,50
9- I -89	25,34	13,14	36,69	4,73	4,73	12,69	2,68
19- I -89	25,47	10,14	29,60	1,93	5,24	23,87	3,75
30- I -89	17,85	11,34	21,01	2,66	9,86	32,94	4,34
20-II -89	18,45	13,30	19,31	4,29	9,44	35,19	-
ACEITE							
26-XII-88	6,93	3,16	42,27	1,52	10,92	32,11	3,08
9- I -89	4,20	3,98	42,93	0,41	12,96	35,51	-
19- I -89	5,39	2,50	34,36	1,65	13,83	38,06	4,28
30- I -89	5,82	2,36	24,55	1,21	8,37	53,96	3,71
20-II -89	6,60	4,40	20,29	3,18	5,38	60,15	-

TABLA XIII

Efecto combinado del estado de maduración de los frutos y del proceso de extracción de aceite sobre la degradación de clorofilas.

<u>Fecha de recolección</u>	<u>Conversión de clorofilas a feofitinas (%)</u>	
	<u>Aceitunas</u>	<u>Aceite</u>
EXPERIENCIA INDUSTRIAL		
26-XII-88	30,05	81,28
9- I -89	51,84	84,12
19- I -89	46,96	82,03
30- I -89	44,78	75,89
20-II -89	42,64	68,09

FIGURA 12.- EVOLUCION DE LA FRACCION CLOROFILICA Y CAROTENOIDE EN ACEITUNAS Y ACEITES PROCEDENTES DE UNA ALMAZARA INDUSTRIAL DURANTE EL PERIODO DE RECOLECCION.



ra. El fulminante descenso que experimenta la fracción clorofílica en las aceitunas, es comparable a la que ocurre durante el tiempo de almacenamiento, Figura 9, siendo así mismo la disminución de carotenoides mucho más ténue. Del paralelismo existente, se puede deducir que en este caso, una parte de la destrucción de pigmentos se deba a la presencia de lipoxigenasa durante el tiempo de almacenamiento de los frutos. Así mismo en esta ocasión también hay que considerar la pérdida de pigmentación debida al progreso de la maduración.

En la figura 13 se aprecia claramente como evolucionan los espectros de absorción del aceite a medida que avanza la recolección. El pico correspondiente a la fracción clorofílica, $\lambda = 666$, prácticamente desaparece en la última muestra correspondiendo a la fracción carotenoide casi en exclusivo, el color del aceite valorado. Este atributo, que en el principio de la experiencia correspondía a una tonalidad de aceite de verde-pardo evoluciona a dorado y termina en un débil color amarillento a medida que avanza el tiempo de cosecha. Este cambio se refleja íntegramente en la forma y altura de los mencionados espectros de absorción.

Como las clorofilas y carotenoides tienen una zona del espectro común, al ir desapareciendo las primeras, el máximo a 406 nm, pico dominante en un principio, va decreciendo a favor del que presenta a 446 nm, propio de luteína. Este hecho se corresponde con la evolución de pigmentos anteriormente mencionados cuando se comentaban las Tablas XI y XII.

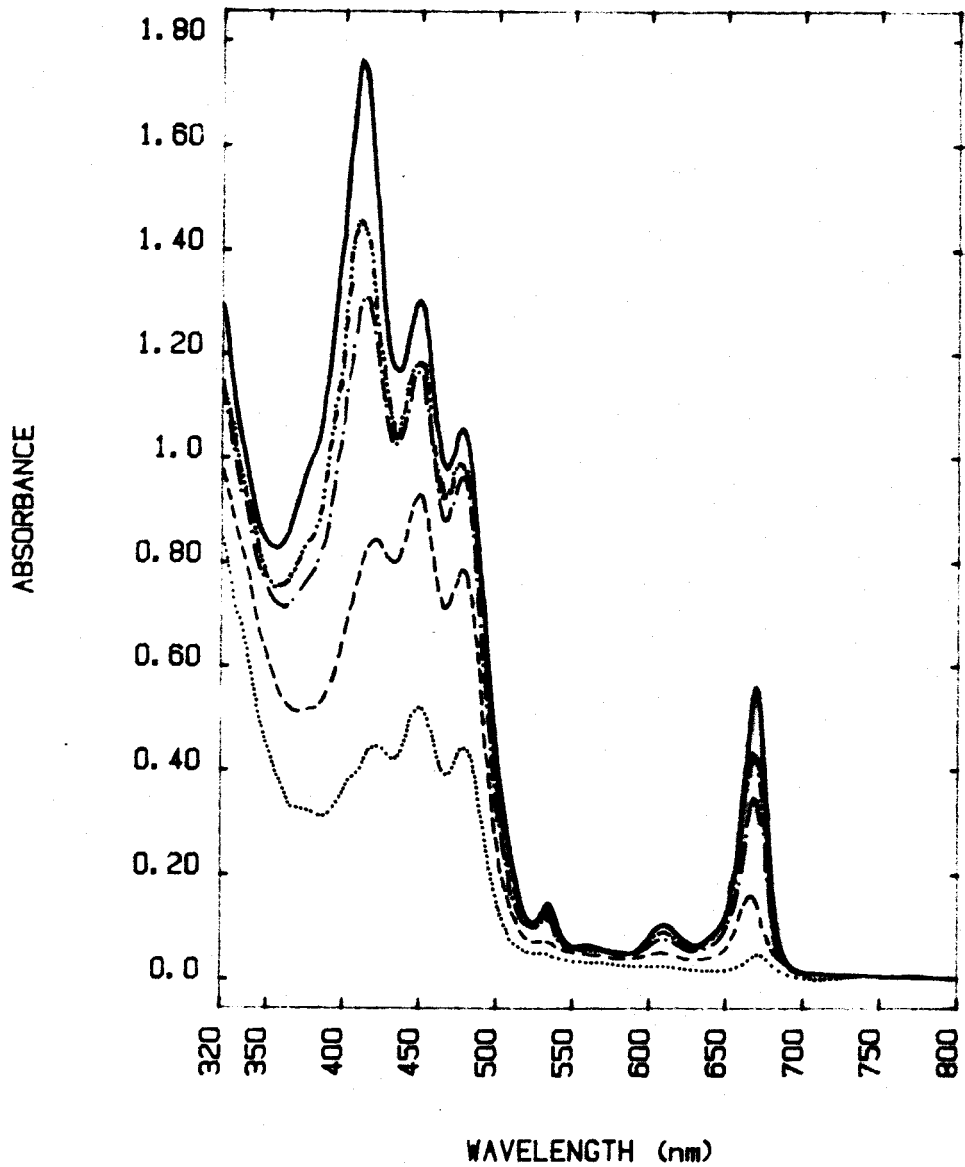


FIGURA 13.- EVOLUCION DE LOS ESPECTROS DE ABSORCION EN CICLOHEXANO DE ACEITES PROCEDENTES DE UNA ALMAZARA INDUSTRIAL DURANTE EL PERIODO DE RECOLECCION. (— 1ª muestra, 2ª muestra, -.-.- 3ª muestra, ---- 4ª muestra, 5ª muestra).

5.5.- EFECTO DE LA MADURACION DE LOS FRUTOS, TIEMPO DE ALMACENAMIENTO Y PROCESO DE EXTRACCION, SOBRE EL CONTENIDO FINAL EN PIGMENTOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.

Al objeto de poder valorar, de una forma global, el conjunto de pruebas realizadas, confrontando como inciden o difieren los distintos factores estudiados sobre la pigmentación del aceite de oliva virgen, en la Tabla XIV se ofrece la concentración por fracciones de clorofilas y carotenoides según los datos obtenidos en las distintas experiencias, así como la relación existente entre ambas.

- Pérdida de clorofilas.

Al avanzar la maduración, la concentración en pigmentos disminuye, tanto en los frutos como en el aceite, circunstancia que también se manifiesta en los controles efectuados en la industria.

En paralelo la relación entre fracciones también decrece, hecho ya denotado en el estudio de maduración del fruto en el árbol, lo cual evidencia la mayor pérdida de clorofilas al avanzar el tiempo de cosecha. Pero sin duda, lo que más destaca es el descenso en esta razón al pasar del fruto al aceite. El proceso de extracción implica una notoria pérdida de clorofilas.

Durante el almacenamiento de los frutos en trojes, los grandes cambios ocurren en la fase inicial.

TABLA XIV

Efecto del estado de madurez de los frutos, tiempo de almacenamiento y forma de extracción, sobre el contenido en clorofilas totales, carotenoides totales y relación entre ambas fracciones en los frutos y aceite correspondiente.

<u>Fecha de recogida</u>	<u>Clorofilas totales</u>		<u>Carotenoides totales</u>		<u>Clor.totales/ carot. totales</u>	
	<u>Aceitunas</u>	<u>Aceite</u>	<u>Aceitunas</u>	<u>Aceite</u>	<u>Aceitunas</u>	<u>Aceite</u>
EXPERIENCIA MADURACION						
17-I-89	5,70	4,20	4,20	11,24	1,36	0,37
30-I-89	1,93	2,07	2,41	7,61	0,80	0,27
<u>Tiempo de almacenamiento (días)</u>						
EXPERIENCIA ALMACENAMIENTO						
0	12,08	-	6,18	-	1,95	-
8	4,87	5,17	4,42	4,98	1,10	1,04
16	3,12	5,88	2,99	5,31	1,04	1,11
24	2,88	5,86	2,31	5,50	1,25	1,06
32	2,33	5,99	2,46	6,97	0,95	0,86
<u>Fecha de recolección</u>						
EXPERIENCIA INDUSTRIAL						
26-XII-88	20,93	14,85	6,22	12,71	3,36	1,17
9- I -89	21,47	16,18	5,40	15,22	3,98	1,06
19- I -89	12,18	10,35	5,96	13,24	2,04	0,78
30- I -89	5,36	5,31	4,78	10,32	1,12	0,51
20-II -89	1,29	1,41	1,04	2,68	1,24	0,53

La espectacular caída de clorofilas que se advierte en la primera semana, tiende a ser más paulatina en el tiempo posterior, al igual que ocurre con los carotenoides. A partir de esa fecha, la relación entre fracciones puede considerarse constante tanto en el fruto como en el aceite extraído. En esta experiencia, cabe destacar que el proceso de extracción afecta por igual a los pigmentos clorofílicos que a los carotenoides ya que no se altera en el aceite el equilibrio que muestran estos componentes en el fruto.

Esta peculiar característica, que sólo acontece en esta experiencia, únicamente puede explicarse por la fermentación que experimentan los frutos durante el tiempo de almacenamiento. De algún modo se facilita la separación de fases, permitiendo que la extracción de aceite se efectúe acortando tiempos de batio y centrifugación. El operar más rápido, es la única razón que hasta el momento puede fundamentar que se evite la destrucción mayoritaria de clorofilas durante el proceso de extracción de aceite.

Como se puede fácilmente apreciar, este rasgo no caracteriza precisamente las otras experiencias, en las que la pérdida de clorofilas es simplemente llamativa. El ensayo que se está comentando, es el único en el que el contenido clorofílico del aceite es superior al que poseen los frutos y que junto con la fracción carotenoide aumenta al unísono en la fase oleosa.

Este último comentario avala la mayor destrucción y no pérdida de clorofilas durante el proceso de extracción a la vez que evidencia la menor labilidad de los carotenoides.

- Aumento de carotenoides.

El incremento sistemático que se advierte en la concentración de carotenoides presentes en el aceite, con respecto al contenido homólogo de sus frutos, es un hecho que se ha venido manifestando en todas las experiencias realizadas. Ello indujo a pensar que esta homogeneidad tenía que estar relacionada con algo intrínseco a pigmentos y aceites. Al ser los pigmentos liposolubles, éstos pasan en su totalidad a la fase oleosa y su proporción aumenta en el aceite en función de la riqueza grasa del fruto del cual procedan.

Como los datos de concentración de pigmentos referidos al fruto, incluyen, en el peso de muestra, todos los componentes solubles en el agua de vegetación, "alpechín", así como la piel, hay que hacer una transformación para poder equiparar y comparar números en ambos casos.

Suponiendo que la riqueza grasa de la aceituna de partida fuera de un 20 % y teniendo en cuenta que el hueso supone otro 20 % del peso total, la concentración de pigmentos en la fase oleosa debe incrementarse en cuatro veces, con respecto a los valores que muestren los frutos. La pérdida de pigmentos se calcula según la fórmula:

$$P_D = \frac{4 \cdot P_F - P_A}{4 \cdot P_F}$$

- P_D = pigmentos destruidos (%).
 P_F = " del fruto (mg/kg).
 P_A = " del aceite (mg/kg).

Operando de esta manera con los datos correspondientes de las tres experiencias, en la Tabla XV se incluyen los porcentajes de clorofilas y carotenoides que se pierden al pasar del fruto al aceite.

Al ser las clorofilas más lábiles que los carotenoides, la destrucción es mayoritaria para esta fracción, salvo en la experiencia de almacenamiento en que ambas, para una misma fecha, van en paralelo.

Efectuados los cálculos en base a un 30 % en riqueza grasa, los resultados se dan en la Tabla XVI. En este caso se reduce bastante la pérdida de pigmentos y los datos tienden a corresponderse más con los encontrados experimentalmente.

Para un balance correcto de materia y una interpretación adecuada del incremento en pigmentos que experimenta el aceite, sería totalmente necesario conocer exactamente la riqueza grasa de los frutos de los cuales procede, así como el porcentaje de aceite que queda retenido en el orujo.

TABLA XV

Efecto del estado de madurez de los frutos, tiempo de almacenamiento y proceso de extracción sobre el contenido teórico de pigmentos en el aceite de oliva virgen.

<u>Fecha de recogida</u>	Pérdida de pigmentos en el aceite (%)*	
	<u>Clorofilas</u>	<u>Carotenoides</u>
EXPERIENCIA MADURACION		
17-I-89	81,58	33,09
30-I-89	73,19	21,06
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="width: 20%; text-align: left;"> <u>Tiempo de almacenamiento (días)</u> </div> <div style="width: 60%; text-align: center;"> EXPERIENCIA ALMACENAMIENTO </div> </div>		
8	73,46	71,83
16	52,88	55,60
24	49,13	40,48
32	35,73	29,17
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="width: 20%; text-align: left;"> <u>Fecha de recolección</u> </div> <div style="width: 60%; text-align: center;"> EXPERIENCIA INDUSTRIAL </div> </div>		
26-XII-88	82,26	48,91
9- I -89	81,16	29,54
19- I -89	78,76	44,46
30- I -89	75,23	46,02
20-II -89	72,67	35,58

* En base a un 20 % de riqueza grasa en las aceitunas.

TABLA XVI

Efecto del estado de madurez de los frutos, tiempo de almacenamiento y proceso de extracción sobre la pérdida teórica de pigmentos en el aceite de oliva virgen.

<u>Fecha de recogida</u>	Pérdida de pigmentos en el aceite (%) *	
	<u>Clorofilas</u>	<u>Carotenoides</u>
EXPERIENCIA MADURACION		
17-I-89	68,37	0
30-I-89	59,68	0
EXPERIENCIA ALMACENAMIENTO		
<u>Tiempo de almacenamiento (días)</u>		
8	60,09	57,64
16	29,15	33,24
24	23,51	10,49
32	3,35	0
EXPERIENCIA INDUSTRIAL		
<u>Fecha de recolección</u>		
26-XII-88	73,33	23,18
9- I -89	71,67	0
19- I -89	68,05	16,48
30- I -89	62,76	18,33
20-II -89	58,91	3,12

* En base a un 30 % de riqueza grasa en las aceitunas.

5.6.- VALOR DE PROVITAMINA A DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.

El valor provitamínico del β -caroteno se calcula teniendo en cuenta que 0,6 μg de β -caroteno equivalen a una unidad internacional de retinol (UI) (12). Una vez realizada esta conversión, en la Tabla XVII se muestran los resultados encontrados en el aceite así como el contenido teórico en el mismo, considerando un 20 % de riqueza grasa en los frutos y la proporción pertinente que representa el hueso.

Se observa que la destrucción menor corresponde a la aceituna madura y sana, a la vez que durante el almacenamiento, al recuperarse mejor el aceite, la pérdida en pigmentos es menor. En la experiencia industrial la pérdida de β -caroteno es paulatina y aumenta de forma patente a final de campaña.

Durante el proceso de extracción, hay una considerable pérdida de este compuesto que en adición a la destrucción ocurrida en el tiempo de almacenamiento, se traduce en unos valores que oscilan entre 30 - 80 %. Esta importante pérdida de β -caroteno en el aceite, repercute directamente en una gran disminución de la potencial capacidad de provitamina A.

En la Tabla XVIII se muestran los valores de β -caroteno en los frutos durante el periodo de recolección de aceitunas de molino así como el teórico en provitamina A que deberían tener sus aceites correspondientes.

TABLA XVII

Efecto del estado de madurez de los frutos, tiempo de almacenamiento y proceso de extracción de aceite sobre el contenido en el mismo de provitamina A.

<u>Fecha de recogida</u>	<u>β-caroteno ($\mu\text{g/g}$)</u>			<u>Contenido de vitamina A (UI/100 g)</u>	
	<u>Encontrado</u>	<u>Teórico*</u>	<u>Dstrucción (%)</u>	<u>Encontrado</u>	<u>Teórico*</u>
EXPERIENCIA DE MADURACION					
17-I-89	3,33	4,60	27,61	555	767
30-I-89	1,66	1,36	0	277	227
EXPERIENCIA ALMACENAMIENTO					
<u>Tiempo de almacenamiento (días)</u>					
8	1,66	5,88	71,77	277	980
16	1,77	4,00	55,75	295	667
24	1,83	3,08	40,58	305	513
32	2,32	3,28	29,27	387	547
EXPERIENCIA INDUSTRIAL					
<u>Fecha de recolección</u>					
26-XII-88	3,01	3,48	13,50	502	580
9- I -89	4,07	5,08	19,88	678	847
19- I -89	3,26	3,80	14,21	543	633
30- I -89	1,31	4,00	67,25	218	667
20-II -89	0,22	0,88	75,00	37	147

* En base a un 20 % de riqueza grasa en las aceitunas.

TABLA XVIII

Evolución del contenido en β -caroteno y provitamina A durante la maduración de los frutos del olivo y valor teórico en el aceite correspondiente.

Estado de madurez	Aceitunas		Aceite *	
	β -caroteno (mg/kg)	Vitamina A (UI/100 g)	β -caroteno (mg/kg)	Vitamina A (UI /100 g)
Pintona	4,16	693	16,64	2773
Envero	3,67	612	14,68	2447
Morada	2,24	373	8,96	1493
Negra	1,50	250	6,00	1000

* Cálculos efectuados en base a un 20% de riqueza grasa de los frutos.

6.- CONCLUSIONES.

- 1.- La presencia de feofitinas en el aceite de oliva virgen es consecuencia de la degradación de clorofilas durante el almacenamiento de los frutos y posterior proceso de extracción. Los frutos maduros y sanos, recién cogidos del árbol poseen cualitativamente los mismos pigmentos cloroplásticos que cuando están verdes.
- 2.- Al avanzar la maduración se rompe el equilibrio que anteriormente mantenían entre sí todos los pigmentos, desapareciendo las clorofilas más rápidamente que los carotenoides.
- 3.- Durante el almacenamiento de los frutos antes de su molturación, se produce una modificación estructural de pigmentos, así como una considerable pérdida en la concentración de los mismos. Esta degradación ocurre según dos posibles mecanismos:
 - a) Los ácidos liberados en los tejidos del fruto, durante la autólisis o destrucción de la materia orgánica, provocan en las clorofilas el intercambio del ión magnesio por protones, y en los carotenoides la isomerización de los que poseen en su molécula grupos 5,6-epoxi.
 - b) La intervención del enzima lipoxigenasa media la oxidación de ambas fracciones de pigmentos a productos incoloros.
- 4.- Durante el proceso de extracción de aceite se vuelven a repetir las reacciones de feofitinización y formación de carotenoides con grupos furanoides.

- 5.- En el mismo proceso se detecta una sensible pérdida de pigmentos que afecta mayoritariamente a componentes clorofílicos.
- 6.- La afinidad de estos pigmentos por los disolventes lipofílicos explica el incremento de la fracción carotenoide en la fase oleosa que no incluye a la clorofílica porque como se ha comentado anteriormente se pierde casi en su totalidad en el proceso de extracción. El aumento originado en la concentración de pigmentos debería ser inversamente proporcional al contenido en riqueza grasa de los frutos
- 7.- El valor potencial de provitamina A en el aceite virgen, al depender directamente de la concentración de β -caroteno, puede oscilar entre límites bastante amplios según incidan las variables anteriormente mencionadas.
- 8.- La composición clorofílica y carotenoide del aceite de oliva virgen, está mediatizada por el grado de madurez en que se recolectan los frutos, tiempo de permanencia en fábrica y condiciones más o menos drásticas del proceso de extracción.

7.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Capella, P.- "Considerazion sulla qualità dell'olio di oliva". 18 Congreso Soc. Italiane per lo studio dello sostanze grasse. Selve di Fasano. Ottobre 1986. 20-22.
- 2.- Rodríguez de la Borbolla y Alcalá, J.M. et al.- "El aderezo de aceitunas verdes". Patronato "Juan de la Cierva" (C.S.I.C.). Madrid, 1956.
- 3.- Fernández Díez, M.J. et al.- "Biotecnología de la aceituna de mesa". C.S.I.C. Madrid, 1985.
- 4.- Vázquez Roncero, A.- "Química del olivo. I. Los componentes orgánicos". Grasas y Aceites 14 (1963) 262-270.
- 5.- A.A.V.V.- "Las raíces del aceite de oliva. Aceites de oliva vírgenes". Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, 1983.
- 6.- Yoon, S. y Klein, B.P.- "Some properties of pea lipoxygenase isoenzymes". J. Agric. Food Chem. 27 (1979) 955-962.
- 7.- Axelrod, B.- "Lipoxygenases", en "Food related enzymes". Whitaker, J.R. Ed. Adv. Chem. Ser. 136, A.C.S. Washington D.C. 1974.
- 8.- Bushway, R.J.- "Determination of α and β carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography". J. Agric. Food Chem 34 (1986) 409-412.
- 9.- Bureau, J.L. y Bushway, R.J.- "HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States". J. Food Sci. 51 (1986) 128-130.

- 10.- Barranco, D. y Rallo, L.- "Las variedades de olivo cultivadas en España". *Olivae* 9 (1985) 16-20.
- 11.- González Burgalete, J.L.- "Comercialización de aceites y grasas en España". *Olivae* 21 (1988) 14-21.
- 12.- Patsis, P.G.- "Publicidad y precios del aceite de oliva y de sus sustitutos". *Olivae* 21 (1988) 22-24.
- 13.- Allaya, M.- "Idea general sobre los mercados no tradicionales de aceite de oliva". *Olivae* 25 (1989) 13-18.
- 14.- Bagordo, F.- "He aquí un excelente mercado para la producción italiana". *Olivae* 24 (1988) 18-30.
- 15.- Rodríguez de la Borbolla y Alcalá, J.M. et al.- "Conservación de aceitunas de molino". Sindicato Nacional del Olivo. 1958.
- 16.- Barrio, A.; Gutiérrez, F. y Gutiérrez, R.- "Aplicación de la cromatografía gas-líquido, técnica de espacio de cabeza al problema del atrojado de los aceites de oliva. I". *Grasas y Aceites* 32 (1981) 156.
- 17.- Gutiérrez, R.; Dobarganes, M.C.; Gutiérrez, F. y Olías, J.M.- "Componentes volátiles en el aroma del aceite de oliva virgen. V. Aceites obtenidos del fruto atrojado". *Grasas y Aceites* 32 (1981) 299-303.
- 18.- Olías, J.M.; Lozano, D.; Ríos, J.L.; Gutiérrez, F. y Gutiérrez, R.- "Determinación de ácidos grasos volátiles en aceites de oliva virgen". *Grasas y Aceites* 39 (1988) 77-81.

- 19.- Naudet, M. y Sambug, E. "Sur la couleur des huiles. I. Considerations générales et diverses techniques déstimations". Rev. Fr. des Corps Grass. 2^o Année n^o 12. December (1955) 851-858.
- 20.- Naudet, M.; Sambug, E. y Desnuelle, P.- "Sur le couleur des huiles. II. Emploi de la Trichromic". Rev. Fr. des Corps Grass. 3^o Année n^o 6. Juni (1956) 425-436.
- 21.- Sambug, E. y Naudet, M.- "Sur la couleur des huiles. III. Methode simplifiée pour la determination des coordenées trichromatiques". Rev. Fr. des Corps Grass. 3^o Année n^o 12. December (1956) 838-851.
- 22.- Sambug, E. y Naudet, M.- "Sur la couleur des huiles. IV. Etudes d'un photolorimeter simple". Rev. Fr. des Corps Grass. 7^o Année n^o 1. Janvier (1960) 21-33.
- 23.- Gutiérrez, R. y Gutiérrez, F.- "Método rápido para definir y clasificar el color de los aceites de oliva vírgenes". Grasas y Aceites 37 (1986) 282-284.
- 24.- Strasburger, E. et al.- "Tratado de Botanic". Ed. Manuel Marín y Cía. 5^a Ed. Barcelona, 1970.
- 25.- Bauernfeind, J.C.; Burbacher, G.B.; Klane, H.M. y Nurusich, V.L.- "Use of carotenoids". Un capítulo en "Carotenoids". Ed. by Otto Isler. Birkhauser Verlag Basel Unstuttugart. (1971) 743-770.

- 26.- Jackson, A.H.- "Structure, properties and distribution of chlorophylls". En "Chemistry and Biochemistry of plant pigments". Vol. 1. Goodwin Ed. T.W. Academic Press London. New York. San Francisco (1976) 1-63.
- 27.- Stanier, R. Y.; Duodoroff, M. y Alderberg, E.A. "El mundo de los microbios". Aguilar, S.A. Madrid. 1965.
- 28.- Bogorad, L.- "Chlorophyll biosynthesis". En "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". Vol. 2. T.W. Goodwin Ed. Academic Press. London, New York, San Francisco (1976) 64-148.
- 29.- Clydesdale, F.M. y Francis, F.J.- "Pigmentos". En "Introducción a la Ciencia de los Alimentos". Parte II. O.R. Fennema. Ed. Reverté, S.A. (1982) 449-494.
- 30.- Hynninen, P.H.- "Application of elution analysis to the study of chlorophyll transformation by column chromatography on sucrose". J. of Chromatogr. 175 (1979) 75-88.
- 31.- Coultate, T.P.- "Colours". En "Food the chemistry of its components". The Royal Society of Chemistry. Burlington House, London, W1V 0BN U.K (1984) 102-130.
- 32.- Cheftel, J.E. y Cheftel, H.- "Los principales sistemas bioquímicos alimentarios. Comportamiento durante los tratamientos". En "Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos". Vol. 1. Acribia, S.A. Zaragoza (1976) 135-215.

- 33.- Jones, I.D.; White, R.C. y Gibbs, E.- "Influence of blanching of brining treatment of the formation of chlorophyllides, pheophytins and pheophorbides in green plant tissues". J. Food Sci. 28 (1963) 437-439.
- 34.- Sweneg, J. y Martin, M.- "Determination of chlorophyll and pheophytin in broccoli heated by various procedures". Food Res. 23 (1958) 635-647.
- 35.- Walker, G.C.- "Color deterioration in frozen french beans (*Phaseolus vulgaris*)". J. Food Sci. 29 (1964) 383-388.
- 36.- Jones, I.D.; White, R.C. y Gibbs, E.- "Some pigment changes in cucumbers during brining and brine storage". Food Technol. March (1962) 96-102.
- 37.- Wang, S.S.; Haard, N.I. Dimarco, G.R.- "Chlorophyll degradation during controlled atmosphere storage of asparagus". J. Food Sci. 36 (1971) 657-661.
- 38.- White, R.C.; Jones, I.D. y Gibbs, E.- "Determination of chlorophylls, chlorophyllides, pheophytins and pheophorbides in plant material". J. Food Sci. 28 (1963) 431-436.
- 39.- Haad, N.F.- "Características de los tejidos de las plantas comestibles". En "Introducción a la ciencia de los alimentos". Parte II. O.R. Fennena ed. Reverté, S.A. (1982) 788-880.
- 40.- Hildebrang, D.F. y Hymowitz, T.- "Carotene and chlorophyll bleaching with and without seed lipoxygenase-1". J. Agric. Food Chem. 30 (1982) 705-708.

- 41.- Merzlyak, M.N.; Kovrizhnik, V.A. y Raurov, Y.N.-
"Improvent solvent system for plant pigment separation on silicagel thin-layers" J. of Chromatogr. 262 (1983) 331-333.
- 42.- Davies, B.H.; Matthews, S. y Kirk, J.T.O.-
"The nature and biosynthesis of the carotenoids of different colour varieties of *Capsicum annuum*" Phytochem. 9 (1970) 797-805.
- 43.- Goodwin, T.W.- "Distribution of carotenoids". En "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". Vol. 1 Ed. Goodwin, T.W. Academic Press, London, New York, San Francisco, (1976) 225-261.
- 44.- Ulrich, R.- "La vie des fruits". Masson. Paris, (1952).
- 45.- Desassis, A.- "Aperçu sur le biochimie des carotenoids". Oleagineux 9 (1954) 329-334.
- 46.- Goodwin, T.W.- "Carotenoids". En "Modern Methods of Plant Analysis". Ed. by Paech and M.V. Tracey. Vol. III Springer Verlag, Berlin (1980) 271-311.
- 47.- Bolliger, H.R.- "Thin layer chromatography". Academic Press Inc. New York. London (1965) 214-223.
- 48.- Desassis, A.- "Aperçu sur la biochimie des carotenoids". Oleagineux 9 (1954) 397-400.
- 49.- Emodi, A.- "Carotenoids, properties and applications". Food Technol. 32 (1978) 38-42.
- 50.- Jungalwala, F.B. y Cama, H.R.- "Carotenoids in *Delonix regia* (Gul Mohr) flowers". Biochem. J. 85 (1962) 1-8.

- 51.- Watade, A.E.; Noris, R.H.; Wharthington, J.T. y Massie, D.R.- "Estimation of chlorophyll and carotenoids contents of whole tomato by light absorbance technique". J. Food Sci. 41 (1976) 329-332.
- 52.- Guentherer, E.; Cartson, O.E.; Kohler, G.O. y Livingston, A.L.- "Pigmentation of egg yolks by xantophylls from corn marigold, alfalfa and syntetic sources". Poultry Sic. 52 (1973) 1787-1798.
- 53.- Ong, D.E. y Chytil, F.- "Vitamins and hormones" Aurbach G.D. (Ed.) Academic. New York (1983) 105.
- 54.- Moon, R.C. e Itri, L.M.- "Retinoids and cancer" Ch. 14. En "The retinoids". M.B. Sporn, A.B. Roberts and D.S. Goodman (Ed.). Academic Press. New York (1983) 105.
- 55.- Wattemberg, L.W.- "Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents". Cancer Res. Suppl. 43 (1983) 22485.
- 56.- Correa, P.- "Epidemiologia del cáncer gástrico". Rev. Cáncer 2 (1988) 49-52.
- 57.- Richardson, T.- "Enzimas". En "Introducción a la ciencia de los alimentos". O.R. Fennema. (Ed.) Reverté, S.A. Barcelona (1982) 331-401.
- 58.- Grosch, W.; Laskawy, G. y Weber, F.- "Formation of volatile carbonyl compounds and co-oxidation of β -carotene by lipoxigenase from wheat, potato flax and beans". J. Agric. Food Chem. 24 (1976) 456-459.

- 59.- Köckritz, A.; Schewe, T.; Hieke, B. y Hass, W.-
"The effects of soybean lipoxigenase-1 on chloroplasts from wheat". *Biochem.* 24 (1985) 381-384.
- 60.- Kamasha, S. y Metche, M.- "Characterization of seed lipoxigenase of *Phaseolus vulgaris* cv. Haricot". *J. Food Sci.* 51 (1986) 1224-1227.
- 61.- Reynolds, P.A. y Klein, B.P.- "Purification and characterization of a type-1 lipoxigenase from Pea seeds". *J. Agric. Food Chem.* 30 (1982) 1157-1163.
- 62.- Ediriweera, N.; Akiyama, Y y Saio, K.- "Inactivation of lipoxigenase in soybeans with retention of protein solubility". *J. Food Sci.* 52 (1987) 685-690.
- 63.- Aziz, A.B.; Grossman, S.; Ascarelli, I. y Budowski, P.- "Carotene-bleaching activities of lipoxigenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method". *Phytochem.* 10 (1971) 1445-1452.
- 64.- Ikediobi, Ch. O. y Snyder, H.E.- "Co-oxidation of β -carotene by an isoenzyme of soybean lipoxigenase". *J. Agric. Food Chem.* 25 (1977) 124-127.
- 65.- Grosch, W. y Laskawy, G.- "Co-oxidation of carotenes requires one soybean lipoxigenase isoenzyme". *Biochim. Biophys. Acta* 575 (1979) 439-445.
- 66.- Cohen, B.; Grossman, S., Klein, B.P. y Pinsky, A.- "Pigment bleaching by soybean lipoxigenase type-2 and the effect of specific chemical modifications". *Biochim. Biophys. Acta* 837 (1985) 279-287.

- 67.- Barimalaa, I.S. y Gordon, M.H.- "Co-oxidation of β -carotene by soybean lipoxygenase". *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 685-687.
- 68.- Holden, M.- "Chlorophyll bleaching by legume seeds". *J. Sci. Food Agric.* 16 (1965) 312-325.
- 69.- Simpson, K.L.; Lee, T.Ch.; Rodríguez, D.B. y Chichester, C.O.- "Metabolism in senescent and stored tissues". En "Chemistry and Biochemistry of plant pigments". Vol. 1. 779-842. Goodwin, T.W (Ed.) Academic Press, London, New York, San Francisco (1976).
- 70.- Grossman, S. y Waksman, E.- "New aspects of the inhibition of soybean lipoxygenase by α -tocopherol. Evidence for the existence of a specific complex". *Int. J. Biochem.* 16 (1984) 281-289.
- 71.- Bonnet, J.L. y Crouzet, J.- "Lipoxygenase from tomato fruit: partial purification and study of some properties". *J. Food Sci.* 42 (1977) 625-628.
- 72.- Olías, J.M. y Valle, M.- "Lipoxygenase from lupin seed: Purification and characterisation". *J. Sci. Food Agric.* 45 (1988) 165-174.
- 73.- Ministerio de Agricultura.- "Investigación directa por medio de encuesta de la infraestructura técnica". En "Estudio sobre el sector de extracción de aceite de oliva". Cap. II. Dirección General de Industrias Agrarias. Madrid (1979) 73-173.

- 74.- Mínguez Mosquera, M.I. y Garrido Fernández, J.-
"Eliminación de compuestos lípidos durante la
fase de extracción de pigmentos cloroplásticos
en aceitunas "Olea europaea". Grasas y Aceites
36 (1985) 376-381.
- 75.- Mínguez Mosquera, M.I. y Garrido Fernández, J.-
"Composición y evolución de clorofilas y carote-
noides durante el desarrollo y maduración de los
frutos del olivo". Grasas y Aceites 37 (1986)
272-276.
- 76.- Uceda Ojeda, M.- "Reglamento 355/77 .Programa de
aceite de oliva" Junta de Andalucía. Consejería
de Agricultura y Pesca. Dirección General de In-
vestigación y Extensión Agraria. Estación de
Oleicultura. Jaén.