

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA**

**"Clorofilas y Carotenoides en Aceitunas de la Variedad Gordal.
Factores Asociados con la Alteración *Mancha Verde*."**

por
M^a LOURDES GALLARDO GUERRERO



+
553

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

**"Clorofilas y Carotenoides en Aceitunas de la Variedad Gordal.
Factores Asociados con la Alteración Mancha Verde."**



Memoria presentada por la Lda. M^a LOURDES GALLARDO GUERRERO para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Septiembre, 1994

V^oB^o DIRECTOR

Fdo/ Dra. Dña M^a Isabel Mínguez Mosquera
Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Instituto de la Grasa.

V^oB^o TUTOR

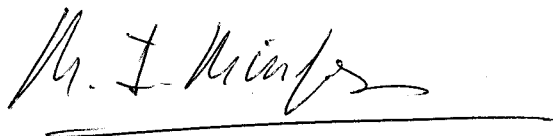
Fdo/ Dr. D. Juan Pereda Marín
Catedrático del Departamento de Ingeniería Química

Juan Pereda Marín, Catedrático del Departamento de Ingeniería de la Universidad de Sevilla, y M^a Isabel Mínguez Mosquera, Investigador Científico del Instituto de la Grasa (CSIC).

CERTIFICAN: Que esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa de Sevilla.

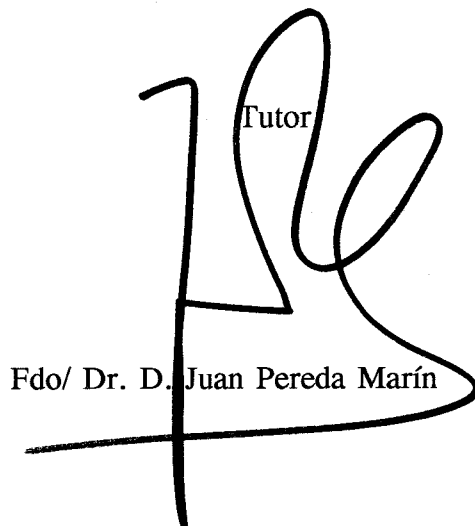
Y para que conste, firman la presente en Sevilla a 14 de Septiembre de 1994.

Director



Fdo/ Dra. Dña M^a Isabel Mínguez
Mosquera

Tutor

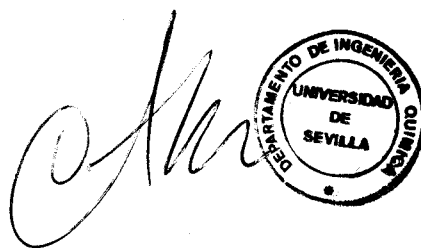


Fdo/ Dr. D. Juan Pereda Marín

Antonio Roselló Segado, Director del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA: Que la Lda. en Ciencias Químicas M^a Lourdes Gallardo Guerrero ha realizado en el Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa su Tesis Doctoral incluida en el plan de doctorado en Ingeniería Química, siendo su Tutor D. Juan Pereda Marín y su Director Dña M^a Isabel Mínguez Mosquera, habiéndose cumplido todos los requisitos legales vigentes.

Y para que conste firmo la presente en Sevilla a 14 de Septiembre de 1994.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Roselló', is written over a circular stamp. The stamp contains the text 'DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA' around the top edge, 'UNIVERSIDAD DE SEVILLA' in the center, and a small star at the bottom.

Fdo/ Dr. D. Antonio Roselló Segado

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
GRUPO DE INVESTIGACION

Sevilla, a los 98 días del mes de Setiembre de 1994

15 SET. 1994

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alvaro Raffalli

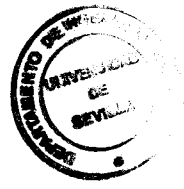
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en DPTO. INGENIERIA QUIMICA
de la FACULTAD DE QUIMICA
de esta Universidad desde el día 22-9-94
hasta el día 9-10-94

Sevilla 10 de OCTUBRE de 1994

EL DIRECTOR DE L DPTO. INGENIERIA
QUIMICA

Alu



A mi padre que, allá donde se encuentre, estará feliz y sastifecho y a mi madre, por todos los momentos de soledad que ha tenido que soportar.

AGRADECIMIENTO

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

A la Dra. Dña. M^a Isabel Mínguez Mosquera, Directora de esta Tesis, por haberme guiado en el campo de la investigación con toda su dedicación, interés y estima, habiéndome brindado su amistad y apoyo en todo momento.

Al Dr. D. Juan Garrido Fernández por su inestimable ayuda en el desarrollo de este trabajo y la disposición que ha mostrado en cualquier momento que hiciera falta, sin olvidar tantos viajes a los que me ha acompañado para recoger muestras.

De forma muy entrañable a los compañeros de mi equipo, que ya son Doctores, Beatriz Gandul Rojas por su valiosa colaboración y compañerismo y Manuel Jarén Galán por sus desinteresadas y apreciadas sugerencias.

De manera muy especial a Dña. Mercedes Bodineau Bada, Ayudante Diplomada de Investigación, sin cuya ayuda en el laboratorio no hubiera sido posible el análisis de tantas muestras.

A los Drs. D. Luis Rejano Navarro y D. Antonio Higinio Sánchez Gómez, por su colaboración en los ensayos a escala piloto.

A ASEMESA, por todas las facilidades prestadas en el suministro de la materia prima y, muy particularmente, a D. Francisco de la Serna, por la cesión de parcelas de olivo y la prestación de sus instalaciones para llevar a cabo las experiencias.

Al jefe del Departamento de Biotecnología de los Alimentos y al Director del Instituto de la Grasa, por permitirme realizar en las dependencias del Instituto el desarrollo de este trabajo.

A la Junta de Andalucía por la concesión de una beca de F.P.I.

A todos mis compañeros del Departamento de Biotecnología de los Alimentos, con especial mención a los Drs. D. Rufino Jiménez Díaz y D. Juan Fernández Bolaños, que de una u otra forma han contribuído a la realización de esta Tesis.

Quiero dejar para el final a Dámaso, quien espero que muy pronto consiga el grado de Doctor, por todo lo que esta Tesis le ha supuesto, privándole de tantísimos momentos de descanso y diversión que tenía merecido, y cuya ayuda ha sido inapreciable en los críticos momentos finales de este trabajo.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	- 1
OBJETIVOS	- 8
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	- 11
I. CLOROFILAS Y DERIVADOS.	- 11
1.- Presencia y distribución de clorofilas en plantas superiores.	- 11
2.- Localización, estructura y función.	- 11
3.- Propiedades químicas.	- 15
3.1.- Eliminación e inserción de magnesio.	- 15
3.2.- Hidrólisis o transesterificación del grupo ester fitilo.	- 17
3.3.- Isomerización.	- 17
3.4.- Degradación del núcleo macrocíclico.	- 17
3.5.- Reacciones del anillo isocíclico.	- 18
4.- Propiedades físicas.	- 19
4.1.- Espectro de absorción electrónica ultravioleta visible.	- 19
4.2.- Otras propiedades espectroscópicas.	- 20
5.- Degradación durante el procesado y almacenamiento de vegetales verdes.	- 21
5.1.- Conversión de clorofilas a feofitinas.	- 21
5.2.- Formación de clorofilidas y feoforbidas.	- 24
5.3.- Conversión de clorofilas a piroderivados.	- 26
5.4.- Decoloración de clorofilas.	- 27
6.- Estabilización de clorofilas en vegetales verdes procesados.	- 28
6.1.- Ajuste de pH.	- 29
6.2.- Método de procesado "Alta temperatura-corto tiempo de procesado", (HTST).	- 29
6.3.- Conservación en atmósfera controlada.	- 30
6.4.- Colorantes alimenticios.	- 31
7.- Clorofilasa: enzima implicada en el metabolismo de clorofilas.	- 33

7.1.- Función y localización.	- 33
7.2.- Distribución.	- 34
7.3.- Reacción enzimática.	- 36
II. CAROTENOIDES.	- 38
1.- Presencia y distribución.	- 38
2.- Localización, estructura y función.	- 39
3.- Propiedades químicas.	- 41
4.- Propiedades físicas.	- 43
4.1.- Espectro de absorción electrónica ultravioleta visible.	- 43
4.2.- Otras propiedades espectroscópicas.	- 44
5.- Propiedades nutricionales y beneficiosas de los carotenoides.	- 45
6.- Transformación de carotenoides durante el almacenamiento, cocinado y procesado de alimentos.	- 46
7.- Uso de los carotenoides como colorantes.	- 48
III. ANALISIS DE PIGMENTOS EN VEGETALES	- 49
1.- Técnicas de extracción.	- 49
2.- Separación de pigmentos.	- 51
2.1.- Cromatografía en columna.	- 51
2.2.- Cromatografía en papel.	- 52
2.3.- Cromatografía en capa fina (TLC, Thin layer chromatography).	- 52
2.4.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High performance liquid chromatography).	- 52
EXPERIMENTAL	- 56
I. MATERIA PRIMA.	- 56
1.- Control de pigmentos cloroplásticos y actividad clorofilasa durante el crecimiento, desarrollo y maduración de la aceituna de la variedad	- 56
2.- Transformación de clorofilas y carotenoides durante el proceso de elaboración de aceitunas verdes de mesa al estilo español o sevillano.	- 57
3.- Estudio de la pigmentación responsable de la alteración "Mancha verde".	- 61

II. METODOLOGIA	- 62
A. CONTROL DE PIGMENTOS.	- 62
1. Extracción de pigmentos.	- 62
1.1.- Extracto libre de materia grasa.	- 62
1.2.- Saponificación del extracto de pigmentos.	- 63
2. Separación y purificación de pigmentos por TLC.	- 64
3. Identificación.	- 65
3.1.- Clorofilas y derivados.	- 65
3.1.1.- Obtención de patrones.	- 65
3.1.2.- Pruebas de identificación.	- 67
3.2.- Carotenoides.	- 68
3.2.1.- Patrones.	- 68
3.2.2.- Pruebas específicas para la caracterización de grupos funcionales.	- 69
4. Cuantificación.	- 71
4.1.- Separación e identificación por HPLC.	- 71
4.2.- Cuantificación por HPLC.	- 72
B. ACTIVIDAD CLOROFILASA	- 75
1.- Preparación del precipitado proteínico.	- 75
2.- Extracción de la enzima del precipitado proteínico.	- 76
3.- Preparación de los sustratos.	- 76
4.- Reacción enzimática.	- 76
C. DETERMINACION DE COBRE Y ZINC EN CENIZAS.	- 76
III. APARATOS UTILIZADOS.	- 77
RESULTADOS Y DISCUSION	- 78
I. IDENTIFICACION DE PIGMENTOS.	- 78

II. EVOLUCION DE CLOROFILAS Y CAROTENOIDES DURANTE EL PROCESO DE CRECIMIENTO, DESARROLLO Y MADURACION DE LOS FRUTOS. . .	- 90
1.- Cambios en la composición de pigmentos.	- 90
2.- Patrón de evolución en la concentración de cada pigmento.	- 93
III. IMPLICACION DE CLOROFILASA EN EL METABOLISMO DE CLOROFILAS.	- 100
1.- Desarrollo del fruto y contenido en humedad durante los cambios estacionales.	- 100
2.- Evolución de clorofilas durante los cambios estacionales.	- 100
3.- Evolución de clorofilasa durante los cambios estacionales.	- 110
4.- Implicación de clorofilasa en la evolución de clorofilas.	- 113
IV. TRANSFORMACION DE CLOROFILAS Y CAROTENOIDES DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACION LACTICA.	- 115
1.- Evolución cualitativa.	- 115
2.- Evolución cuantitativa.	- 118
3.- Mecanismo de la degradación.	- 131
V. ALTERACION MANCHA VERDE	- 138
1. Identificación de pigmentos.	- 138
2.- Intervención del cobre y zinc externo aportado por fungicidas.	- 149
3.-Evolución de la composición de pigmentos en frutos durante el progreso de la "Mancha verde".	- 150
CONCLUSIONES	- 163
BIBLIOGRAFIA	- 165

INTRODUCCION

El color de un alimento es en general un factor determinante para su calidad, ya que produce en el consumidor potencial la primera impresión de aceptación o rechazo. Aún siendo este atributo de calidad uno de los criterios mas empleados en la normalización comercial de alimentos, hasta hace relativamente poco tiempo, el fundamento químico de sus cambios no se había estudiado a fondo.

Teniendo en cuenta que en frutos y vegetales el color es consecuencia directa de los pigmentos naturales que poseen, se hace necesario en cada caso particular la caracterización de los mismos, al objeto de poder controlar y solventar cualquier problema de alteración o adulteración, sobre todo en aquellos productos que deben ser manufacturados.

Los pigmentos responsables del color en los tejidos verdes de las plantas superiores son los llamados fotosintéticos o cloroplásticos. 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 clorofilas y carotenoides, en cuyo caso se denominan cromatóforos (Strasburger et al., 1970).

El pigmento más importante que interviene en la fotosíntesis, la clorofila, se encuentra en todos los cromatóforos fotosintéticamente activos, incluida 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.

No es fácil definir cómo influye el proceso de maduración sobre la evolución de los pigmentos en las plantas y frutos. Se pueden describir una serie de transformaciones que ocurren en los mismos durante su crecimiento y desarrollo, como son 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 de explicar (Simpson et al., 1976; Strasburger, 1970).

Cuando los frutos se aproximan a la etapa de maduración, hay un estado en el cual los cambios bioquímicos se inician por la producción autocatalítica de etileno y el incremento de respiración marca el cambio entre desarrollo y maduración, produciéndose entonces la variación de coloración en los mismos (Bauerfeind et al., 1971). El tipo y cantidad de pigmentos en los tejidos de las plantas depende de las especies, variedades, estado de maduración, desarrollo, y condiciones de cultivo, etc., y, en general, experimentan considerables variaciones durante el almacenamiento y procesado de los productos que los contienen (Haard, 1982). Es importante destacar que los cambios que experimentan los pigmentos cloroplásticos presentes en los vegetales, durante las etapas de maduración y almacenamiento, o como consecuencia de los distintos sistemas de procesado, tienen una considerable repercusión en el color del producto final.

Según MacKinney (1961), la presencia de carotenoides está asociada a la de clorofilas en todos los tejidos fotosintéticos. La mayoría de los frutos cuando están inmaduros son verdes. Al avanzar la maduración, la actividad fotosintética decrece y las clorofilas desaparecen. Los carotenoides asociados a estos compuestos o bien desaparecen a la par, se mantienen, o incrementan su concentración al sintetizar a su vez nuevos carotenoides. En paralelo, se produce el cambio de color en la piel.

En los frutos carotenogénicos, al llegar la madurez su color se torna gradualmente hacia tonalidades amarillas, naranjas o rojas, conforme se descomponen las clorofilas y entra en función la síntesis de carotenoides. Este cambio está relacionado con la degeneración de los cloroplastos en cromoplastos inducido por la interacción de diferentes hormonas de plantas, siendo etileno la "hormona de la maduración". Los carotenoides presentes suelen ser, además de los existentes en los tejidos verdes, algunos de nueva formación y que, por lo

general, aparecen esterificados con ácidos grasos acumulándose mayoritariamente en el interior de los plastoglobulos que se encuentran en el cromoplasto.

No obstante, el proceso de maduración no conlleva necesariamente una carotenogénesis. Hay que distinguir entre aquellos frutos cuya coloración final se debe a una clara dominancia carotenoide de los que, llegada esa etapa, sintetizan componentes de otra naturaleza. En este grupo se encuadran aquellos frutos cuya coloración final es debida a las sustancias polifenólicas, que pueden incluso enmascarar la presencia de clorofilas y carotenoides. En estos casos, el patrón carotenoide del cloroplasto no cambia durante la maduración (Gross, 1987).

La desaparición de clorofilas durante la maduración de los frutos es un tema que ha preocupado a los investigadores desde tiempos atrás, sin que hasta el momento actual se tenga clarificado este enigma. Aunque la pérdida de clorofilas se relaciona causalmente con la ruptura del cloroplasto y/o la actividad de clorofilasa ésto no es fácilmente demostrable (Purvis, 1980). Existen distintas teorías en las que se postula que clorofilasa puede intervenir tanto en la síntesis como en el catabolismo de la clorofila, aunque parece adjudicarse más una función de síntesis a la enzima *in vivo* y catabólica *in vitro*. Por otro lado, se argumenta que la desaparición de clorofila está asociada a sistemas enzimáticos oxidativos y que clorofilasa sólo interviene en un primer estadio.

La importancia de la clorofila en la tecnología de alimentos radica, no en su papel fotosintético, sino principalmente en su participación en la coloración verde, de frutos y vegetales. En el caso concreto de productos vegetales verdes, todos los sistemas de procesado van a propiciar, en mayor o menor grado, la formación de muy diferentes derivados clorofílicos. Dependiendo del tipo de proceso se pueden activar sistemas enzimáticos endógenos tipo clorofilasa o lipoxigenasa que van a ser responsables de la modificación del color aparente, bien por la transformación de pigmentos o por la destrucción de los mismos, según el caso. Así mismo, y de forma paralela se pueden promover reacciones químicas específicas que además de modificar el aspecto externo del producto, alteran completamente la naturaleza y propiedades de los pigmentos responsables del color. Por tanto, es patente la importancia y el interés científico que el estudio de las condiciones y variables que intervienen en la modificación de pigmentos clorofílicos y carotenoides tiene en la industria alimentaria.

En general, en la elaboración y manipulación de productos naturales como son los frutos y vegetales, que tras su recolección permanecen todavía vivos en múltiples aspectos, se pueden presentar, y de hecho se presentan, problemas cuyas causas, a veces son difíciles de determinar, ya que sus tejidos, metabólicamente activos, se encuentran sometidos a constantes cambios en su composición.

Procesos físico-químicos, enzimáticos y microbiológicos pueden alterar notablemente las características de los mismos en el período que transcurre hasta su consumo, dependiendo de las transformaciones tecnológicas a las que se sometan y de las necesidades económicas, de transporte, almacenamiento, etc., que imponga el mercado.

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. El árbol florece en Mayo con flores blancas y pequeñas y, casi inmediatamente después, en Mayo o Junio, empieza a formarse el fruto que culmina su maduración hacia el final del otoño. Esta oliva o aceituna es una drupa verde, carnosa, comestible y con forma 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 la de ciertas variedades, es aderezada en el estado de verde según diversos tratamientos, utilizándose directamente como aceitunas de mesa (Rodríguez de la Borbolla et al., 1956; Fernández Díez et al., 1985), pero la mayor parte de los frutos ya maduros se destinan a la obtención 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 (Vázquez Roncero, 1963). El ámbito de influencia mercantil del fruto del olivo se restringe casi exclusivamente a los países del área mediterránea.

La utilización de los frutos del olivo como aceitunas de mesa se pierde en la antigüedad, correspondiendo la primera cita histórica a Columela que data del siglo primero de nuestra era, en el año 54 (Fernández Díez et al., 1985). En nuestro país, la investigación sobre el aderezo de aceitunas verdes estilo español o sevillano, se inició en el año 1947 por

Rodríguez de la Borbolla et al. (1956). Gracias a la ardua labor de estos científicos se consiguió convertir en un proceso tecnológico regido por unas normas de control físico-químico y microbiológico, lo que hasta entonces en España, y más concretamente en Andalucía, había sido una práctica artesanal industrializada. Desde entonces mucho se ha investigado sobre el fruto del olivo. No obstante, si bien la tecnología moderna amplía cada vez más las posibilidades en el tratamiento de los alimentos, bien cierto es que se plantean a su vez nuevos problemas.

Recientes innovaciones en el proceso tradicional de elaboración de aceitunas verdes de mesa, como son las tecnologías asociadas al uso de cultivos iniciadores, o a la reducción del volumen de aguas de vertido, han afectado las características físico-químicas y organolépticas del producto final, siendo el color uno de los parámetros que más seriamente ha acusado este impacto.

La aceituna es posiblemente uno de los frutos en los que se hace más complejo el estudio de la modificación estructural en la molécula de clorofila. Junto a un bajo contenido pigmentario y restringido prácticamente a la zona superficial del fruto, existe una elevada proporción de lípidos (15-30%) que por su propia naturaleza interfieren inevitablemente cualquier tipo de análisis de clorofilas o derivados. Como consecuencia, el establecimiento de la composición clorofílica y carotenoide en los productos comestibles derivados del olivar, aceite de oliva y aceituna de mesa, es relativamente reciente. El análisis de clorofilas en una matriz lipídica ha necesitado la adaptación específica de metodologías para su estudio (Mínguez y Garrido, 1989). Solventado el problema inicial se han conseguido avances significativos en el conocimiento y transformación de estos compuestos en los frutos del olivo durante los distintos sistemas de procesado industrial según finalidad, aceite de oliva o aceituna de mesa (Mínguez et al., 1989; 1990; 1994). No obstante, aún quedan importantes incógnitas por dilucidar.

En el caso concreto del proceso tradicional de elaboración de aceitunas verdes de mesa se ha llegado a conocer que son deseables y necesarias ciertas transformaciones en estos pigmentos, ya que son precisamente las que propician su cotizado color dorado. Durante el proceso de fermentación, las clorofilas *a* y *b*, inicialmente presentes en el fruto fresco se degradan en su totalidad a feofitinas y feoforbidas según dos mecanismos diferentes y coexistentes: uno de origen enzimático, provocado por la acción de clorofilasa y otro

motivado por el pH ácido del medio de fermentación, habiéndose establecido los parámetros cinéticos que gobiernan esta reacción de degradación incluida la implicación de la enzima clorofilasa. La fracción carotenoide sólo se afecta en aquellos componentes que por su estructura molecular son sensibles al medio ácido. La degradación ocurrida de pigmentos que conlleva el proceso de fermentación láctica permite que los frutos así tratados adquieran su coloración característica (Mínguez et al., 1989; Mínguez et al., 1994).

Así mismo se conoce cómo el procesado industrial de los frutos del olivo provoca, en determinadas circunstancias, la formación de pigmentos altamente transformados los cuales pueden actuar como auténticos testigos del proceso y son indicadores a posteriori del historial del tratamiento tecnológico efectuado (Mínguez et al., 1993a).

Las variedades de aceitunas más empleadas y mejor cotizadas en el mercado para su consumo como aceitunas de mesa, son Manzanilla y Gordal. Sin embargo el empleo de esta última variedad está presentando en la actualidad ciertos problemas. La aparición ocasional de manchas verdes en la superficie de los frutos, ya procesados, durante el posterior período de conservación en salmuera, es un tema que preocupa al sector industrial implicado, por la repercusión negativa que dicha alteración puede tener en la comercialización del producto. En principio esta alteración aparece de forma puntual y bien localizada y progresivamente puede llegar a cubrir toda la piel del fruto (Figura 1).

Hay que puntualizar que aunque la definición o localización de zona con mancha verde es bastante simple, la forma, la distribución y la profundidad que tiene en el fruto es muy diversa. Se pueden encontrar tanto aceitunas que muestran la alteración como puntos verdes del tamaño de la cabeza de un alfiler como aquellas cuya piel está totalmente cubierta. Así mismo la profundidad de la mancha es muy variable, desde frutos en los que ésta solo se sitúa escasamente debajo de la piel, a otros en los que ocupa varios milímetros hacia el interior.

En el presente trabajo se trata de dilucidar si existen características inherentes al propio fruto que propicien dicha alteración o si, por el contrario, el problema radica en factores externos.

La importante repercusión económico y social del fruto del olivo en la región andaluza, exige un conocimiento estricto al menos de sus principales variedades y de todos los factores y variables introducidas en el procesado de los frutos que van a ser determinantes en su posterior calidad.



FIGURA 1: Fotografía de aceitunas de la variedad Gordal que presentan la alteración "Mancha verde".

OBJETIVOS

El olivo es la especie frutal más destacada en España en cuanto a superficie cultivada y es fundamental en numerosas comarcas agrícolas, tanto por su considerable aportación a la economía, como por su valor social como generador de mano de obra.

La alta adaptación de esta especie en nuestro país, ha propiciado su asilvestramiento y diversificación. En la actualidad están descritas en la zona de Andalucía más de 158 variedades, aunque se admite que este número puede ser mayor, por la dificultad que entraña la diferenciación morfológica y bioquímica.

A nivel nacional y según datos del Ministerio de Agricultura, en la actualidad sólo se consideran 22 variedades como las más representativas de nuestro país. El criterio utilizado para esta selección exige que una variedad se cultive en más del 50% de una determinada comarca de plantación olivarera.

Entre las variedades de mesa, Manzanilla y Gordal son las de cultivo más extendido en España y su mejor calidad la adquieren en la ribera del Guadalquivir y zonas de Sevilla. Sus frutos han sido siempre los más apreciados en el mercado internacional. La producción anual de la variedad Gordal oscila entre 20000 y 25000 Tm de los que 18000 se destinan a exportación.

La alteración "Mancha verde" en la aceituna Gordal, hace peligrar la comercialización de esta variedad aunque la pericia del comerciante ha conseguido solventar, hasta el momento, el riesgo que implica dicho problema en su transacción comercial

Aunque la aparición de manchas verdes de forma puntual y su posterior desarrollo no se encuentra reflejado en la bibliografía, sí se tiene constancia del reverdecimiento total de vegetales enlatados, durante el tiempo de almacenamiento. Este fenómeno está asociado a la formación de complejos metaloclorofílicos (Jones et al., 1977; von Elbe et al., 1986; Laborde y von Elbe, 1990). Los productos de degradación de clorofilas, feofitinas y feoforbidas principalmente, en presencia de cobre y cinc, pueden dar lugar, según distintas causas, a la formación de estos compuestos con el consiguiente reverdecimiento del vegetal.

La presencia de cobre en el revestimiento interno de las latas empleadas para la conservación de alimentos propicia la migración del mismo a las moléculas de feofitinas del vegetal ocasionando su reverdecimiento. La formación de metalocomplejos incluye siempre derivados clorofílicos, nunca a clorofilas, y ocurre a partir de 1-2 ppm de cobre o 25 ppm de cinc (Laborde y von Elbe, 1990).

Durante la elaboración de aceitunas verdes de mesa se excluye la posibilidad de contaminación de estos metales ya que en ningún momento del proceso existe contacto de los frutos con materiales que los contengan, puesto que se utilizan fermentadores de poliéster con fibra de vidrio y las conducciones son de acero inoxidable. En este sentido, si en la alteración "Mancha verde" están implicados el cobre o cinc externo, la única posibilidad para su acceso a la molécula de clorofila en la aceituna radica en los tratamientos fungicidas de los olivos, en los que se utilizan mezclas complejas en las que siempre intervienen sales de cobre y, con mucha frecuencia, sales de cinc.

Ante el desconocimiento existente sobre las causas que originan dicha alteración, en la presente Tesis Doctoral se inicia su estudio, planificando el desarrollo del trabajo según los siguientes objetivos.

1.- Factores intrínsecos al fruto.

Al recolectar los frutos para su elaboración como aceitunas de mesa, en el estado de verde amarillento, antes de alcanzar la plena madurez, podría interrumpirse drásticamente el metabolismo de clorofilas y, como consecuencia, permanecer en el fruto intermediarios biosintéticos que tuvieran afinidad por el Cu. Para cubrir este punto, los objetivos se centran en dilucidar si existen condicionantes varietales, tales como:

- Desviaciones metabólicas en la síntesis de pigmentos durante el desarrollo del fruto.
- Esclarecimiento de la actuación de la enzima clorofilasa en la síntesis y/o degradación de clorofilas.

2.- Factores de procesado.

Ante la posibilidad de que en la variedad Gordal el proceso de fermentación propicie un tipo de degradación en los pigmentos distinto al encontrado en otras variedades de aceitunas, se controla la incidencia del mismo mediante el estudio de:

- Identificación y evolución de clorofilas y carotenoides en los frutos durante el proceso de fermentación láctica.
- Establecimiento del mecanismo de degradación.

3.- Estudio de la pigmentación implicada en la alteración "Mancha verde".

Este objetivo comprende el desarrollo de los siguientes puntos:

- Identificación de pigmentos que confieren la coloración anómala.
- Procedencia del Cu y Zn implicado en el posible acomplejamiento de derivados clorofílicos.
- Progreso de la alteración: pigmentos implicados.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

I. CLOROFILAS Y DERIVADOS.

1.- Presencia y distribución de clorofilas en plantas superiores.

Los pigmentos clorofílicos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo clorofilas *a* y *b* las más abundantes y por tanto mejor conocidas. Clorofila *a* se encuentra en todos los organismos fotoautótrofos, excepto en Rhodobacterias. Clorofila *b* está presente en todas las plantas superiores, así como en algas clorofíceas y euglenofíceas, y siempre acompañando a clorofila *a*. El color de clorofila *a* es verde azulado, mientras que clorofila *b* presenta una tonalidad verde amarillenta. Otros tipos de clorofilas (*c*, *d* y *e*) se hallan únicamente en algas y siempre en combinación con clorofila *a*. Las bacterioclorofilas *a* y *b* y la bacterioviridina (clorofila de *Chlorobium*) son los pigmentos característicos de las bacterias fotosintéticas.

En las plantas superiores el contenido en clorofilas referido a peso seco de vegetal suele oscilar del 0.6 al 1.2% (Willstatter, 1928). La razón entre clorofilas *a* y *b* suele variar entre 3 y 1, dependiendo el valor de multitud de factores, tanto genéticos (especie, variedad, etc.) como ambientales (luminosidad, estrés hídrico, nutrición mineral, etc.). Así por ejemplo, las plantas expuestas al sol tienden a tener relaciones *a/b* mayores que las plantas de sombra. La razón molar de clorofila *a* a *b* ha sido determinada en 24 especies, variando su valor de 2.56 a 3.45 (Lichtenthaler, 1968).

2.- Localización, estructura y función.

Los pigmentos clorofílicos se encuentran localizados, junto con los carotenoides, en las membranas tilacoidales de los cloroplastos, que son los orgánulos en los cuales se lleva a cabo la fotosíntesis en las células vegetales.

Las moléculas de clorofilas están íntimamente asociadas tanto a lípidos de membrana, debido a la lipofilia que le confiere la cadena lateral de fitol, como a proteínas que interaccionan con el anillo porfirínico, que es la parte hidrófila de la molécula de clorofila (Figura 2). Así, dentro del cloroplasto, las clorofilas se hallan asociadas a proteínas y lípidos

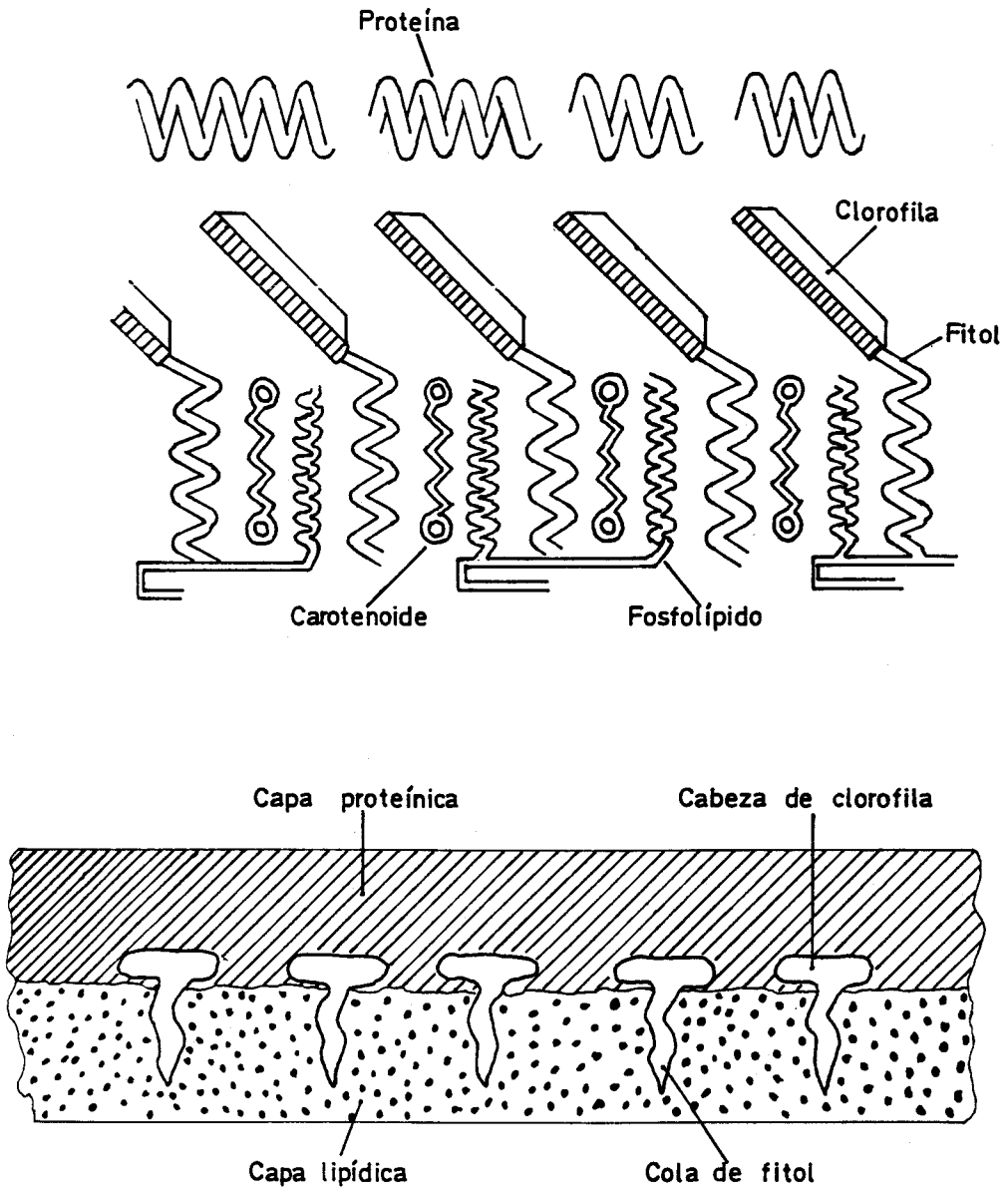


FIGURA 2: Modelo simplificado de la localización de clorofilas y carotenoides en el cloroplasto.

en estructuras supramoleculares llamados *fotosistemas*. En plantas superiores siempre hay dos fotosistemas, PSI y PSII, siendo el PSII responsable de la fotólisis del agua y el PSI de la reducción del NADP⁺.

Parece ser que la interacción clorofila-proteína en los cloroplastos no es de tipo covalente, lo cual se apoya en el hecho de ser compuestos fácilmente extraíbles con disolventes orgánicos. En este sentido, varios autores han conseguido información adicional a partir del aislamiento y estudio de complejos de bacterioclorofilas con proteínas (Fenna y Matthews, 1975; Jackson, 1976; Lichtenthaler, 1987). El resultado de esta interacción clorofila-proteína posibilita la captura de energía radiante dentro de todo el rango del visible puesto que como consecuencia de la unión a proteínas, se modifica el máximo de absorción de la clorofila o, lo que es igual, su energía de excitación.

Desde que en 1906 Willstatter aisló por primera vez clorofila *a* en estado puro, han sido muchos los investigadores interesados en su estudio, dando como resultado la elucidación de su estructura por estudios de degradación parcial y comprobada por síntesis total (Vernon y Seely, 1966). Contiene cuatro anillos pirrólicos sustituidos, uno de los cuales está reducido por lo que posee una estructura de di-hidroporfirina que coordina a un ión Mg²⁺ para formar un complejo esencialmente planar y muy estable. Adicionalmente las clorofilas contienen un anillo isocíclico. La diferencia entre clorofila *a* y clorofila *b*, estriba en que la *a* tiene un grupo metilo en el C-7 mientras que la *b* posee un grupo formilo (Figura 3). El carácter hidrofóbico de estos compuestos se debe a la presencia del fitol, un alcohol isoprenoide monoinsaturado C₂₀ que esterifica a un resto de ácido propiónico del anillo tetrapirrólico en el C-17. El doble enlace del fitol se ha descrito con configuración *trans* (Jackson, 1976).

Es difícil concebir el origen o la existencia de la vida sin la presencia de los pigmentos fotosintéticos, capaces de absorber energía radiante y transformarla en energía química. Estos compuestos químicos, responsables de dicha conversión, se encuentran en los cloroplastos de las plantas y por mediación de ellos la luz inicia el proceso de la fotosíntesis (Deulin, 1975). Son por tanto los responsables de la captura de energía luminosa y su transformación en energía química en el proceso global de la fotosíntesis en todas las plantas verdes.

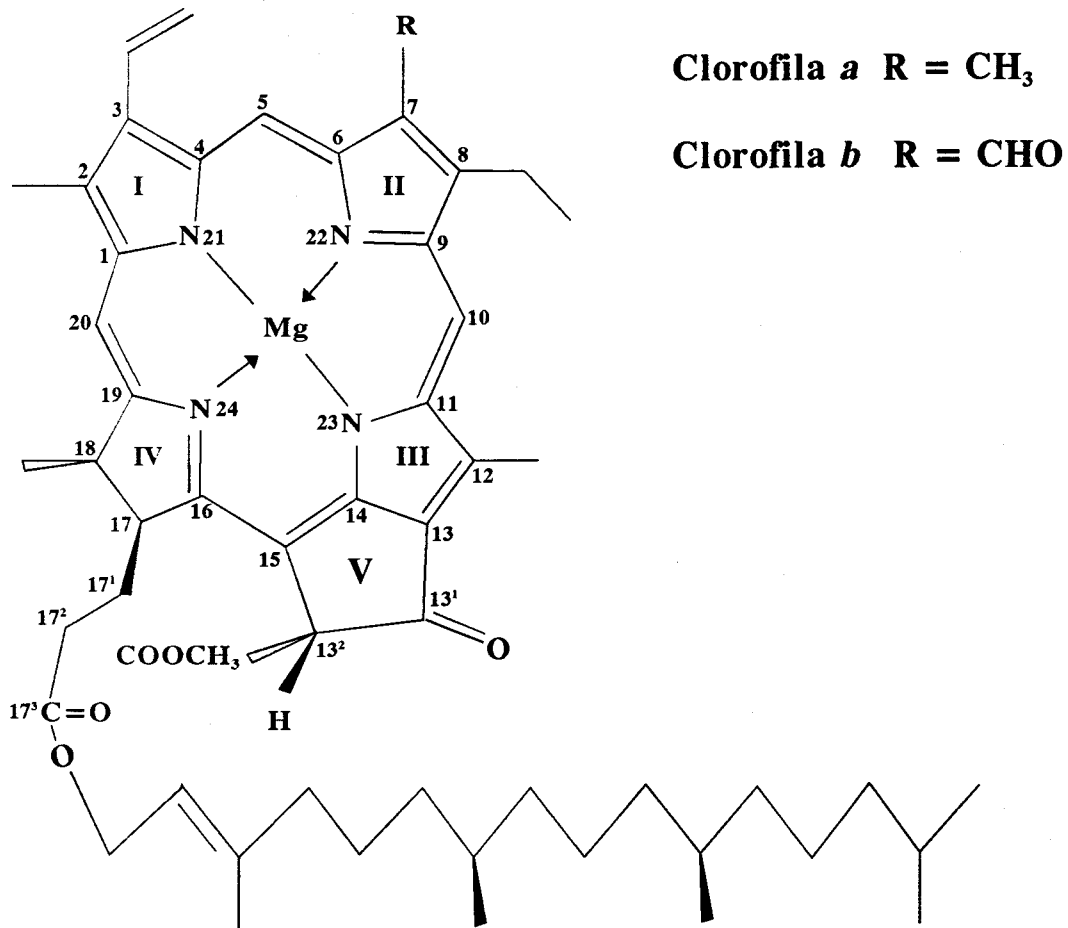


FIGURA 3: Estructura de clorofilas *a* y *b*.

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 clorofila, muchas células fotosintéticas contienen otras clases de pigmentos cuya función es capturar la luz: los carotenoides, amarillos, y las ficobilinas, azules o rojas, denominados frecuentemente pigmentos accesorios, los cuales actúan como receptores suplementarios de la luz 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, el cual es producido durante el proceso fotosintético.

Por ser 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 clorofila *a* (Stainer, 1965; Jackson, 1976).

3.- Propiedades químicas.

La molécula de clorofila es muy susceptible a experimentar transformaciones en su estructura y consecuentemente en sus propiedades por multitud de causas. La Figura 4 muestra la relación entre la molécula de clorofila y la de sus derivados más importantes, resumiéndose a continuación las modificaciones más características que tienen lugar.

3.1.- Eliminación e inserción de magnesio.

El magnesio se elimina rápidamente de las clorofilas por acción de ácidos diluïdos transformándose en feofitinas, lo que se refleja en un cambio inmediato de color y consecuentemente en el espectro de absorción visible. La reinserción del magnesio en el anillo tetrapirrólico se consigue por tratamiento con reactivo de Grignard, o su derivado alcoxi, teniendo que llevarse a cabo la reacción en una atmósfera inerte para evitar la oxidación por el aire (alomerización) o la posible transesterificación de los ésteres de las cadenas laterales.

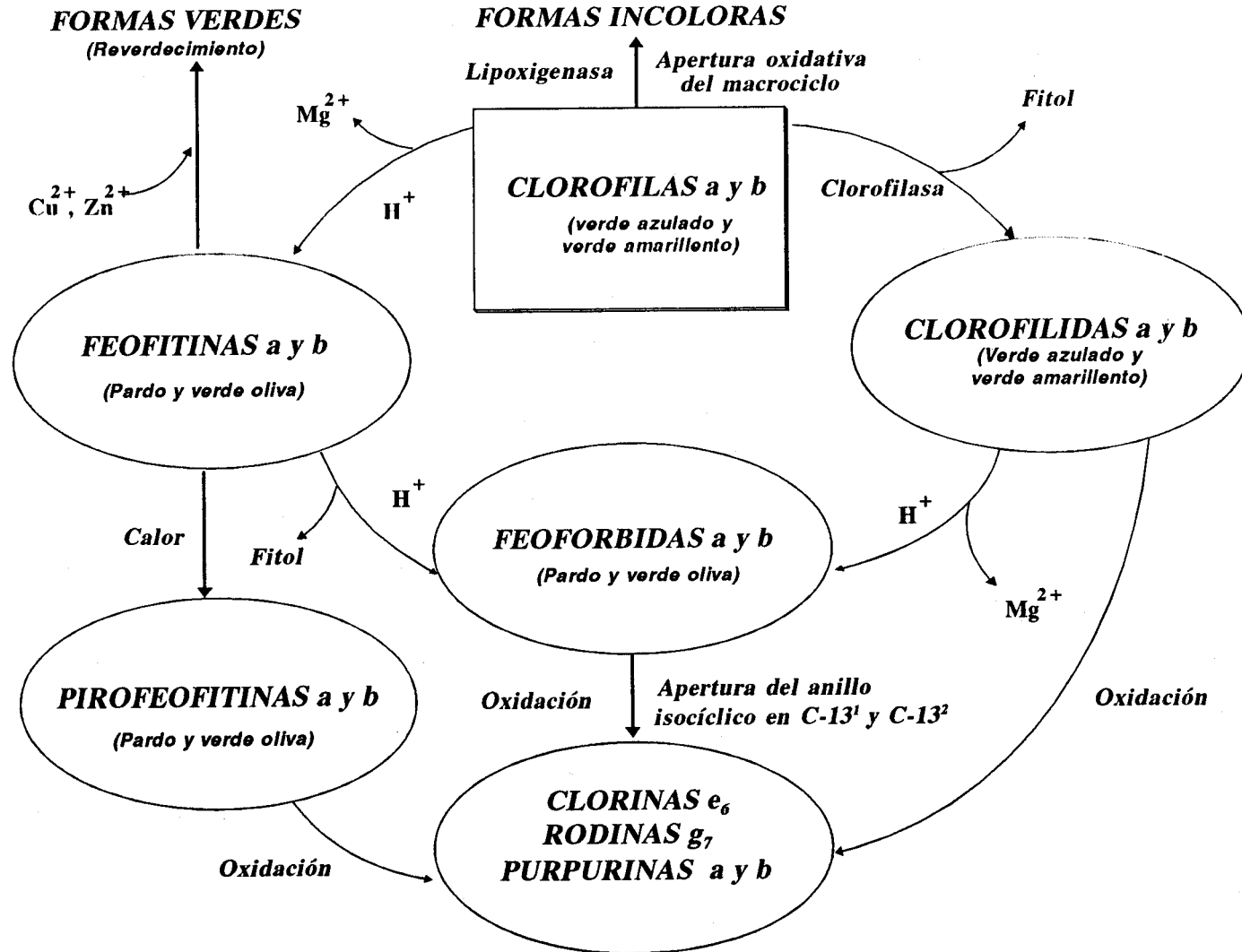


FIGURA 4: Esquema de la relación que existe entre la molécula de clorofila y sus productos de degradación.

Otros metales como Zn, Cu, Fe y Co se pueden introducir con mayor facilidad que el Mg en el núcleo macrocíclico, usando acetatos o cloruros metálicos (Falk, 1964; Yoshimune et al., 1994).

3.2.- *Hidrólisis o transesterificación del grupo ester fitilo.*

El ester fitilo en el C-17³ del grupo propionato se hidroliza enzimáticamente por acción de clorofilasa dando lugar a clorofilidas y liberando el alcohol fitol (Holden, 1961). También puede ser hidrolizado por ácido o álcali bajo condiciones suaves sin que afecte el grupo metoxicarbonilo del C-13², aunque la hidrólisis alcalina debe llevarse a cabo bajo una atmósfera inerte para evitar la oxidación en el C-13². La hidrólisis ácida también produce la eliminación del magnesio originando feoforbida, mientras que el tratamiento con ácido en un medio alcohólico da lugar además, a la transesterificación con la formación del ester correspondiente (Jackson, 1976).

3.3.- *Isomerización.*

La epimerización del C-13², localizado en el anillo isocíclico, inducida por un suave calentamiento, provoca la formación de isómeros denominados *a'* y *b'* (Katz et al., 1968).

3.4.- *Degradación del núcleo macrocíclico.*

La estrecha relación química entre el grupo hemo y la clorofila fue demostrado no sólo por la facilidad de conversión de clorofilas en porfirinas, sino también por el hecho de que ambos pigmentos dieron mezclas de imidas maléicas al oxidar con ácido crómico, y mezclas de pirroles simples al reducir con ácido yodhídrico (Falk, 1964).

La oxidación de porfirinas con ácido crómico da lugar a las imidas maléicas correspondientes a las cuatro unidades pirrónicas del macrociclo original, aunque los anillos con cadenas laterales inestables (vinilo, hidroxietilo, formilo o acetilo) se descomponen generalmente, por lo que se requiere de un tratamiento preliminar. El anillo IV parcialmente

reducido de la pirofeoforbida *a* proporciona, bajo condiciones cuidadosamente controladas, tanto el ácido dihidrohematínico como su imida.

La reducción de porfirinas por ácido yodhídrico en ácido acético proporciona una mezcla de pirroles correspondientes a cada uno de las cuatro unidades originales del macrociclo. Sin embargo, cada unidad de pirrol puede dar lugar hasta cuatro productos dependiendo de si cualquiera de los dos, o ambos átomos de carbono, permanecen unidos al anillo de pirrol o no.

En las alquilaciones reductoras se retienen los sustituyentes meso, y los derivados de clorofila (tras la pre-reducción de la función carbonilo del isociclo) dan lugar a pirroles ciclopenteno del anillo III. Los sustituyentes vinilos e hidroxietilos se reducen a etilo en el curso de estas degradaciones reductoras.

3.5.- Reacciones del anillo isocíclico.

Las soluciones de derivados clorofílicos que contienen el anillo de pentenona y tienen un grupo metoxicarbonilo en el C-13², sufren el llamado "test de fase de Molisch"; el tratamiento con álcali produce un cambio de color a pardo-rojizo, pero al agitar con ácido u oxígeno revierte rápidamente el color verde original. Los compuestos "piro" (aquellos que pierden el grupo carbometoxi en el C-13²) no dan el "test de fase" ni tampoco lo dan las forbidas (compuestos que han perdido el magnesio).

Otra reacción propia del anillo isocíclico es la alomerización, que tiene lugar lentamente en disolventes como metanol o etanol, cuando se dejan al aire. Los derivados 13²-metoxi y 13²-hidroxiclорofila, se pueden aislar en condiciones apropiadas, así como los 13²-metoxi y 13²-hidroxilactonas. La 13²-hidroxiclорofila *a* también se forma por oxidación enzimática (Pennington et al., 1967). Aunque el principal producto de alomerización de clorofila *b* es el derivado 13²-metoxilactona, también se forman otros productos minoritarios, y la hidroxilactona puede sufrir posteriores transformaciones a purpurinas.

Los intermediarios iniciales en estos complejos procesos, no se han aislado pero parece probable que un peróxido puede ser el precursor de las lactonas, mientras que los 13²-

hidroxi y 13²-metoxi derivados pueden producirse a través de la formación de un radical en el C-13² que reacciona con el solvente.

La oxidación en medio ácido o ligeramente alcalino provoca la solvolisis del anillo isocíclico y los componentes resultantes son los denominados clorina *e*₆ y rodina *g*₇, según provengan de la serie *a* o *b*, respectivamente, y que pueden ser metilados a trimetil ester con diazometano. La clorina *e*₆ trimetil ester también se puede obtener directamente hirviendo con álcali metanólico diluído. La ruptura del anillo isocíclico de esta forma, no tiene lugar en pigmentos previamente alomerizados. Las aminas también provocan la rotura del anillo isocíclico de feoforbidas para formar amidas en C-13 derivadas de clorina *e*₆. Cuando se produce la apertura del anillo isocíclico, en medio fuertemente alcalino se obtienen las purpurinas (Hynninen, 1973).

Un prolongado calentamiento origina la descarbometoxilación del C-13², formando los piroderivados (Pennington et al., 1964; Schwartz et al., 1981). La misma transformación tiene lugar calentando feofitinas y feoforbidas en piridina a reflujo, o a altas temperaturas en ausencia de disolvente. Se ha descrito el uso de colidina hirviendo para producir conversiones casi cuantitativas de metil feoforbidas *a* y *b* a los correspondientes piroderivados. Mientras que el último no da positivo el test de "fase", la metil meso feoforbida *a* se puede oxidar a dicetona usando ciertas quinonas.

4.- Propiedades físicas.

4.1.- Espectro de absorción electrónica ultravioleta visible.

El espectro de absorción electrónica característico de las clorofilas y sus derivados se debe a la estructura tetrapirrólica del anillo porfirínico presentando, en todos los casos, cuatro importantes bandas de absorción entre 500 y 700 nm en la región visible del espectro y una gran banda, alrededor de los 400 nm (banda Soret), en la región cercana al UV. La ausencia de la banda Soret en el espectro indica que la estructura de porfirina se ha roto (Clydesdale y Francis, 1976; Holden, 1976; Jackson, 1976).

Las modificaciones estructurales en la molécula básica de clorofila provocan cambios en la forma y posición de las bandas en el espectro de absorción. Así mismo, las propiedades dieléctricas del disolvente también afectan al espectro. Las soluciones etéreas de clorofilas tienen bandas espectrales muy nítidas debido a la débil interacción entre este solvente y las moléculas del pigmento. En el caso de disolventes más polares como acetona, metanol, etanol o agua, su interacción con el pigmento ocasiona un desplazamiento de los máximos de absorción hacia longitudes de onda mayores, decreciendo la intensidad de la absorción (altura de pico) y reduciéndose la especificidad de la absorción (ensanchamiento de los picos). El efecto de los solventes en las características del espectro de absorción electrónica de clorofilas y feofitinas fue estudiado en profundidad por Strain y Svec (1966).

La relación que existe entre la concentración de una solución de clorofila y la intensidad de absorción de luz de una determinada longitud de onda se ajusta a una respuesta lineal, por lo que para su determinación espectrofotométrica se aplica la ley de Lambert-Beer:

$$E = E^{1\%} * C * l$$

De su aplicación se han deducido ecuaciones que permiten obtener la concentración de clorofilas *a* y *b* en mezclas. A tal fin, se mide la absorbancia a determinadas longitudes de onda obteniéndose los coeficientes de absorción específicos de los pigmentos puros a estas longitudes de onda. Comar y Zscheile (1942), Smith y Benítez (1955) y Lichtenthaler y Wellburn (1983) desarrollan ecuaciones para determinar las concentraciones de clorofilas *a* y *b* en éter etílico. En 1963, White et al., para la estimación en éter etílico de clorofilas *a* y *b*, clorofilidas *a* y *b*, feofitinas *a* y *b* y feoforbidas *a* y *b* ampliaron el sistema a 16 ecuaciones. Wintermans y de Mots (1965) determinaron los coeficientes de absorción para clorofilas *a* y *b* en etanol/agua (96%).

4.2.- Otras propiedades espectroscópicas.

Los métodos fluorimétricos no se han usado tan ampliamente como los espectrofotométricos, aunque son mucho más sensibles. El espectro de fluorescencia de las clorofilas es similar al de absorción visible. Actualmente la espectroscopía de fluorescencia se emplea como técnica muy sensible y selectiva para la detección y cuantificación de compuestos

clorofílicos acoplándola a técnicas cromatográficas como la TLC (Zonneveld et al., 1984) y la HPLC (Shioi et al., 1983).

La resonancia magnético nuclear (RMN), espectrometría de masas (SM) e infrarroja (IR) han sido herramientas muy valiosas e insustituibles para la elucidación estructural de las clorofilas y sus derivados (Katz et al., 1966; Scheer y Katz, 1975; Jackson, 1976; Janson y Katz, 1978). Recientemente, Schick y Bocian (1987) han elaborado una revisión de todos los estudios realizados con espectroscopía de resonancia Raman de hidroporfirinas y clorofilas.

La espectrometría de reflectancia es una técnica muy utilizada para la evaluación del color en alimentos, pudiendo ser correlacionado con su contenido en clorofilas (Gold y Weckel, 1959; Mínguez-Mosquera et al., 1991a).

5.- Degradación durante el procesado y almacenamiento de vegetales verdes.

En los productos vegetales el color es uno de los atributos de calidad más importantes contemplado en la mayoría de las normas internacionales de alimentos. Durante el procesado y almacenamiento de los vegetales, las clorofilas presentes experimentan cambios o pérdidas de color semejante al que ocurre durante la senescencia de las plantas. El propósito de la conservación es mantener el material, en todo lo posible, en condiciones inalteradas. El consumidor prefiere en los vegetales cocinados un color verde brillante con una apariencia apetecible de frescor. Las transformaciones son una consecuencia de las propiedades químicas de los pigmentos, enzimas presentes y condiciones físicas como son la temperatura y porcentaje de humedad (Gross, 1991).

5.1.- Conversión de clorofilas a feofitinas.

- Conservación por congelación y escaldado.

La alteración más generalizada que tiene lugar durante el cocinado, procesado térmico, conservación por congelado o almacenamiento de los vegetales es la conversión de

clorofilas *a* y *b* en sus respectivas feofitinas, lo que produce un drástico cambio de color del verde brillante al verde oliva.

Campbell en 1937 reconoció ya que la pérdida del color verde en guisantes congelados almacenados a temperaturas insuficientemente bajas, era producido por la lenta conversión de clorofilas en feofitinas, debido a la acción de los ácidos del jugo celular. MacKinney y Weast, (1940) observaron que en envases de guisantes congelados y de judías, la mayoría de la clorofila cambiaba a feofitina, y así mismo, judías enlatadas contenían solamente feofitinas.

Dietrich et al. (1957), sugieren que la causa de las diferentes velocidades de conversión de clorofilas en guisantes y judías se debe a la distinta acidez que poseen. En judías congeladas, Walker (1964a) encuentra una relación lineal entre el cambio de color que se observa en las judías verdes, y el porcentaje de conversión de clorofila a feofitina. Forni et al. (1988), también detectan feofitinas *a* y *b* en guisantes frescos inmediatamente después de haberlos congelados, y advierten que los niveles encontrados aumentan ligeramente al cabo de los 6 meses de conservación a -10°C .

El escaldado es uno de los procesos más importantes que se realiza en la preparación de los vegetales de forma congelada, enlatada o deshidratada, como medio de preservar el color verde natural y mantener su buena calidad. Implica un tratamiento de calor, con vapor de agua o agua hirviendo y más recientemente microondas u hornos de convección. El proceso de escaldado inactiva las enzimas presentes, encoge el material, expulsa los gases de los tejidos, reduce cualquier infección inicial y elimina sabores indeseables. Se han realizado muchas investigaciones para comprender la degradación de clorofila producida por el escaldado y encontrar las condiciones óptimas que induzcan mínimos cambios en los vegetales.

En este sentido, ya en 1933, Diehl y Berry observaron que guisantes debidamente escaldados por inmersión en agua hirviendo y después congelados a temperaturas entre -10° y -21°C retenían durante más tiempo su característico color verde brillante. En los ensayos realizados por MacKinney y Weast (1940) sobre judías frescas y congeladas, llegan a la conclusión de que el escaldado reducía el grado del cambio de color por la eliminación del aire y compuestos volátiles y solubles en agua, que podrían reaccionar con las clorofilas.

Wagenknechy et al. (1952) comprobaron que en guisantes congelados sin escaldar previamente, las clorofilas se transformaban en feofitinas mientras que en otro lote del mismo producto que sí había sido escaldado, no se producía tal cambio. Walker (1964b), al estudiar el efecto del escaldado sobre la conversión de clorofilas en feofitinas en judías congeladas y observar que aumentaba con el tiempo de escaldado, concluyó que un proceso de 45 segundos a 1 minuto es el que da lugar al producto más estable. En coles de Bruselas, Dietrich y Neumann (1965), comprueban que el escaldado con agua inactivaba las enzimas más rápidamente y degradaba menos cantidad de clorofila que cuando se hacía con vapor. En cambio, Sistrunk et al. (1977), percibieron en espinacas un efecto contrario.

También se ha investigado el efecto de los métodos de escaldado modernos, tales como el realizado por microondas y hornos de convección. Drake et al. (1981), advirtieron que espárragos escaldados con microondas tenían menos color que aquellos que habían sido procesados con agua o vapor, en cambio en judías verdes no encontraron diferencias significativas. Posteriormente, Muftugil (1986), estudió en este mismo vegetal, el efecto de los diferentes tipos de escaldado sobre su color y contenido de clorofilas. Se retenía un 88% del pigmento inicial en judías escaldadas en agua, un 83% en las que se había hecho con vapor, un 97% cuando se emplearon microondas y un 61% en judías escaldadas mediante hornos de convección. Por otro lado, la medida de color con un colorímetro Hunterlab indicaba que el escaldado con agua y vapor daba lugar a una muestra con un verde más intenso. Stone et al. (1986), apuntan que el escaldado es también un pretratamiento efectivo para retener el color en okra deshidratada.

- Deshidratación.

En el año 1943, Dutton et al., demostraron que el escaldado y la deshidratación de espinacas, afectaban su contenido clorofílico. En espinacas escaldadas durante 2 min y posteriormente deshidratadas, el 26% de las clorofilas se transformaban en feofitinas, aumentando el porcentaje de conversión con el tiempo de escaldado. Lajollo et al. (1971) al estudiar la degradación de clorofilas como una función de la actividad de agua, en espinacas escaldadas, secas y congeladas, encontraron que la conversión de clorofila *a* a feofitina *a* tenía lugar incluso a concentraciones de agua muy limitadas (Lajollo y Lanfer Marquez, 1982).

Berset y Caniaux (1983), miden la cantidad de clorofilas que se transforman en feofitinas durante la deshidratación de hojas de perejil a temperaturas entre 80 y 140°C. El porcentaje más bajo de feofitinas (3-7%), se encontraba en muestras secadas entre 80 y 90°C, y el más alto (12-15%), en las calentadas a más altas temperaturas. Por otro lado, muestras deshidratadas a temperaturas más bajas (60-110°C) y almacenadas durante 2 años, contenían un porcentaje elevado de feofitinas *a* y *b* (entre el 50 y 70%). El contenido de clorofila *a* variaba entre el 13 y 60%, demostrando su mayor inestabilidad comparado con clorofila *b*. De acuerdo con esto, la relación clorofila *a/b* disminuía, alcanzando valores entre 1 y 2.

- Esterilización de vegetales enlatados.

Durante el proceso de esterilización con calor, los vegetales enlatados experimentan un marcado cambio de color del verde azulado al verde oliva. En este sentido, Westcott et al. (1955), atribuyeron correctamente este cambio de color en judías verdes, a la conversión de clorofilas en feofitinas e igualmente concluyeron Gold y Weckel (1959) en guisantes. En guisantes verdes había una relación lineal entre la conversión de clorofilas y la acidez, aumentando la última con el calor y temperatura de almacenamiento.

Tan y Francis (1962), llegaron a resultados similares al estudiar en espinacas el efecto de la temperatura de procesado sobre los pigmentos y consecuentemente sobre el color. Observaron que se producía un cambio progresivamente más pequeño de clorofilas *a* y *b* a feofitinas *a* y *b*, conforme se elevaba la temperatura de procesado. Esto fue posteriormente confirmado por Gupte et al. (1964), con estudios cinéticos sobre la degradación térmica de clorofilas en puré de espinacas. En 1971 Aczél reportó datos sobre los cambios de clorofila *a* durante el procesado de tres variedades de guisantes. En el escaldado se transformaba entre un 10 y 18% de clorofilas en feofitinas y, tras la esterilización (25 min a 120°C), la conversión era total.

5.2.- *Formación de clorofilidas y feoforbidas.*

Jones et al. (1961, 1962), detectaron feoforbidas por primera vez durante la preparación de pepinillos en salmuera, sugiriendo que el proceso favorecía la actividad de

clorofilasa, a lo que seguía la desnaturalización por la sal del complejo clorofila-lipoproteína. En este mismo sentido, White et al. (1963), siguieron y estudiaron las variaciones que experimentaban clorofilas y algunos de sus derivados formados en pepinillos, durante un período en salmuera de 42 días. La conversión de clorofilas en clorofilidas y feofitinas, y posterior transformación de clorofilidas a feoforbidas, comenzó inmediatamente después de la puesta de los frutos en la sal. Hasta los siete primeros días se encontraban clorofilidas *a* y *b* en cantidades medibles, siendo superior la concentración de clorofilida *b*, lo que indicaba una mayor estabilidad para este compuesto que para clorofilida *a*. Conforme progresaba la acidez del medio aumentaba la velocidad de formación de feoforbidas, llegando a ser los pigmentos principales en los pepinillos fermentados en salmuera y desapareciendo totalmente clorofilas y clorofilidas. La rápida velocidad de formación de feoforbidas es una muestra evidente de la alta actividad clorofilasa y también de la facilidad con que el ión Mg^{2+} se sustituye por protones en clorofilas y clorofilidas en un medio salino a un valor de pH próximo a 6.

Jones et al. (1963), también estudiaron los efectos inducidos por el escaldado y tratamiento en salmuera, sobre los pigmentos cloroplásticos en pepinillos enteros y troceados. Cuando los pepinillos se preparaban en sal y no se sometían a escaldado, contenían principalmente feoforbidas y algo de feofitinas. En pepinillos sin tratamiento salino, el escaldado a 82°C inducía la formación de cantidades relativamente grandes de clorofilidas y apreciables de feoforbidas. En cambio, cuando se realizaba el mismo proceso pero a 100°C, se inactivaba parcialmente la enzima clorofilasa y se producía principalmente feofitina, y cantidades relativamente pequeñas de clorofilidas y feoforbidas.

En el mismo año, los anteriores autores también estudiaron el efecto del escaldado sobre otros vegetales verdes, tales como okra, nabo y judía. En los dos primeros, el escaldado a 82°C promovía la formación de clorofilidas y feoforbidas además de feofitinas, siendo mayor la conversión de clorofilas en clorofilidas en okra, debido posiblemente a una mayor concentración en ésta de clorofilasa que en nabo. Contrariamente, en judías sólo se formaban feofitinas, lo que delataba la ausencia de clorofilasa. Esta investigación estaba de acuerdo con las llevadas a cabo por MacKinney y Weast (1940), y Walker (1964a, 1964b).

Buckle y Edwards (1970a) también identificaron clorofilidas y feoforbidas en guisantes congelados sin escaldar, durante el tiempo de almacenamiento. En otros vegetales

japoneses salados, Shoko y Susumi (1983), encontraron feoforbidas entre los productos de degradación de clorofilas. En posteriores investigaciones, Ogura et al. (1987) confirmaron los primeros resultados sobre actividad clorofilasa y cambios de color en hojas verdes frescas sometidas a escaldado. En hojas frescas de espinacas calentadas durante 1 minuto en agua hirviendo o en solución de NaCl y NaHCO₃, no detectaron la formación de clorofilidas, en cambio, cuando se sumergían en agua caliente a 60-70°C durante 5 o 6 minutos, sí se formaban grandes cantidades de clorofilidas pero no se observaba cambio alguno de color.

5.3.- Conversión de clorofilas a piroderivados.

El progreso de la cromatografía líquida de alta resolución ha permitido una mejor comprensión de los cambios experimentados por clorofilas durante el procesado y almacenamiento de vegetales. Con dicha técnica, Schwartz et al. (1981), detectaron en espinacas procesadas, diez componentes clorofílicos. Sin embargo, en espinacas frescas, sólo estaban presentes clorofilas *a* y *b*. El escaldado durante 2.5 minutos a 100°C inducía la formación de epímeros de clorofilas, clorofila *a'* y clorofila *b'*. Al prolongar el tiempo de calentamiento hasta 10 minutos aumentaba el contenido de epímeros en el C-13 pero como poseen el mismo grupo cromóforo que las clorofilas originales, no se observaba ningún cambio de color en las espinacas. Por otro lado, espinacas congeladas contenían clorofilas *a*, *a'* y *b*, *b'*, feofitina *a* y trazas de feofitina *b*.

En espinacas enlatadas casi todas las clorofilas se transformaban en feofitinas *a* y *b*, acompañadas de sus respectivos epímeros, feofitinas *a'* y *b'*, y pirofeofitinas *a* y *b*. Estos últimos son los principales pigmentos formados por pérdida del grupo carbometoxi (-CO₂CH₃) de las correspondientes feofitinas. Anteriormente no se había detectado la presencia de pirofeofitinas en espinacas enlatadas debido, posiblemente, a la menor resolución de los antiguos métodos de análisis, y al hecho de que feofitinas y pirofeofitinas presentan idénticos espectros de absorción. Posteriormente Schwartz y von Elbe (1983), investigaron la cinética de degradación de clorofilas a pirofeofitinas en vegetales procesados con calentamiento. El mecanismo que sugieren en la alteración de pigmentos durante el tratamiento de calor es el siguiente:



Ambas reacciones siguen una cinética de primer orden. Encontraron que feofitina *b* se degradaba aproximadamente, a una velocidad del 25 al 40% más rápida que feofitina *a*, dependiendo de la temperatura. Este hecho contrastaba con las diferencias generalmente observadas en la velocidad de degradación de clorofilas *a* y *b*. Durante la fermentación de arroz salvaje, las clorofilas dan lugar a feofitinas y pirofeofitinas (Schwartz et al., 1983). La presencia de pirofeofitinas se atribuye al calor generado durante la fermentación.

5.4.- Decoloración de clorofilas.

La oxidación de clorofilas hacia productos incoloros tiene un importante papel en los cambios de color de alimentos procesados y almacenados. Uno de los principales catalizadores oxidativos en vegetales es la enzima lipoxidasa, también conocida como lipoxigenasa, quien cataliza la oxidación acoplada de lípidos insaturados y clorofila.

Wagenknecht et al. (1952), observaron la pérdida de clorofila cuando guisantes congelados sin escaldar o sometidos a escaldado, se mantenían durante 1 a 5 años a -18°C y la atribuyeron a la acumulación de ácidos grasos libres como consecuencia de la progresiva deteriorización del material lipídico. Se ha postulado que la enzima lipoxigenasa es la causa de la destrucción de clorofila. Más tarde Wagenknecht y Lee (1956, 1958) y Buckle y Edwards (1970a) demostraron la actividad de lipoxigenasa en guisantes frescos y congelados. De la misma manera, se producía la decoloración de clorofila por lipoxigenasa en judías verdes congeladas sin escaldar, a los 12 meses de su almacenamiento a -18°C .

El calor también tiene un efecto destructivo sobre la clorofila. En este sentido, Walker (1964a, 1964b), observó durante la conservación de judías verdes congeladas, una oxidación no enzimática iniciada por el calentamiento.

Algunos autores han advertido, especialmente durante la conservación de vegetales frescos, una degradación de clorofilas, que tiene lugar por desaparición gradual del pigmento, dependiente de la temperatura. En este sentido, en 1949, Kramer et al., detectaron que el contenido clorofílico de espárragos conservados disminuía gradualmente con el tiempo de almacenamiento y aumento de temperatura. Posteriormente, Lyons y Rappaport (1959), estudiaron el efecto de la temperatura sobre la calidad de coles de Bruselas frescas, y

encontraron un deterioro progresivo de las mismas conforme se mantenían a temperaturas de conservación superiores a 10°C. La pérdida de calidad a temperaturas altas se caracterizaba por un rápido amarilleamiento de las hojas exteriores, mientras que a temperaturas bajas, el color verde se preservaba durante períodos de hasta 72 días.

Shewfelt et al. (1983), investigaron la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre la pigmentación de brócoles frescos. A los 2 o 3 días de la recolección y bajo condiciones ambientales a temperaturas de 20°C o superiores, la coloración de los anteriores vegetales se tornaba a amarilla. En cambio, muestras de brócoles empaquetadas, mantenidas a 0 o 1°C cubiertas de hielo, retenían el color verde de 4 a 10 semanas.

Se han realizado distintos ensayos para explicar el rápido amarilleamiento de los vegetales recién recogidos. Yamauchi y Minamide (1985), sugieren que el mecanismo de degradación de clorofilas en perejil es primero una oxidación del flavonoide apigenina catalizado por peroxidasa, y después la degradación de clorofilas por la apigenina oxidada. Los mismos autores (Yamauchi et al., 1985), estudian los cambios experimentados por clorofilas en hojas de espinacas mantenidas a 1°C y a 25°C. Hojas almacenadas a 25°C se preservaban casi completamente frescas los dos primeros días, pero al tercero se deterioraban rápidamente comenzando a visualizarse un color amarillo. Cuando la temperatura de conservación era 1°C, las hojas se preservaban hasta 6 días. Investigaciones subsiguientes de actividad y localización de enzimas implicadas sugirieron la decoloración de clorofilas en hojas, como el resultado de la acción combinada de ácido lipolítico hidrolasa, que degrada los lípidos del cloroplasto, y de lipoxigenasa, que cataliza la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos libres (Yamauchi et al., 1986; 1987).

6.- Estabilización de clorofilas en vegetales verdes procesados.

Una vez conocidas las causas que provocan el deterioro de la coloración durante el procesado de los alimentos, han sido numerosos los ensayos llevados a cabo para conseguir estabilizar los pigmentos en vegetales sometidos a distintos tratamientos.

6.1.- Ajuste de pH.

El valor de pH inicial de un material y los cambios de pH durante su procesado y posterior conservación, son factores determinantes en la degradación de clorofilas. En consecuencia, el control de pH durante la preparación de vegetales es el mejor medio para retener el color y pigmentos en alimentos que contienen clorofilas y son tratados con calor. Se han desarrollado varios métodos que elevan el pH con agentes alcalinizantes permitidos y se han obtenido numerosas patentes que utilizan sales orgánicas o inorgánicas de metales alcalinos y alcalinotérreos (Blair, 1942; Gieseke, 1949; Bendix et al., 1952). Gupte y Francis (1964) ajustaron con carbonato de magnesio el pH en purés de espinaca, lo que favorecía la retención de clorofilas, pero el efecto no perduraba durante el período de conservación.

Otros investigadores además de ajustar el pH, provocaban la conversión a clorofilidas por considerar a éstas más estables que a clorofilas. Las muestras con un valor elevado de pH mostraban un color más aceptable, en cambio, la presencia de clorofilidas sólo aportaba pequeñas diferencias (Clydesdale y Francis, 1968; Clydesdale et al., 1970).

6.2.- Método de procesado "Alta temperatura-corto tiempo de procesado", (HTST).

El método HTST - *High Temperature-Short Time*-, que minimiza la exposición al calor, produce alimentos de alta calidad con una mayor retención de clorofilas y consecuentemente, un mejor color verde que el obtenido mediante un procesado con calor convencional (Tan y Francis, 1962). Gupte y Francis (1964) y Clydesdale et al. (1970), combinan el método con el ajuste de pH. En este mismo sentido, Buckle y Edwards (1970b), demuestran que el control del pH, tanto en el procesado de puré de guisantes verdes con el método HTST, como durante su posterior conservación, es un factor determinante para la estabilización de pigmentos en alimentos que contienen clorofilas.

En 1973 Aczél compara, en guisantes verdes procesados, el efecto de diferentes métodos utilizados para mejorar el color. Los métodos fueron: a) HTST; b) el método Blair que incluye ajuste de pH; c) coloración mediante la adición de un derivado clorofílico conocido como clorofilina de cobre y sodio; d) dosificación de glutamato sódico; y e)

métodos combinados. En el escaldado (4-6 minutos a 90-95°C) el contenido total de clorofila disminuía de 10 a 16%. Durante la esterilización la clorofila se convertía totalmente en feofitina. El método Blair provocaba un sabor inaceptable, aunque el producto era más verde. El mejor efecto se obtuvo con una combinación de HTST y el uso de glutamato sódico, proporcionando un buen color y excelente sabor.

Se ha recomendado el método de escaldado con vapor HTST para producir vegetales congelados de alta calidad. Según Drake y Carmichael (1986), esta aptitud depende de los vegetales y de la presión y duración del método HTST.

6.3.- Conservación en atmósfera controlada.

La conservación de vegetales tras su recolección provoca en general una disminución en la calidad, producida por pérdida de agua, oxidación biológica, otros cambios químicos y roturas fisiológicas. Además se promueven deterioros causados por microorganismos. Platenius (1943) estudia el efecto de la concentración de oxígeno sobre la respiración de algunos vegetales. Concentraciones reducidas de oxígeno o atmósferas modificadas de dióxido de carbono y oxígeno, pueden demorar la maduración de los frutos y vegetales, preservando su color normal y disminuyendo generalmente, la velocidad de envejecimiento.

Para retardar los efectos indeseables que se producen en los frutos y vegetales tras su recolección se utiliza la conservación en "atmósfera controlada", que consiste en la adaptación de los gases en el ambiente atmosférico, usando generalmente niveles altos de dióxido de carbono y bajos de oxígeno, combinado con algún grado de refrigeración. Uno de los efectos más beneficiosos de este tipo de conservación de vegetales verdes es la disminución de la pérdida del color.

Wang et al. (1971), estudian la degradación de clorofilas en brotes de espárragos mantenidos bajo atmósfera controlada y observan que cuando se mantenían al 5% de CO₂ a 1.7°C y un 95% de humedad relativa, resultaba un aumento del pH y menor transformación de clorofilas detectando únicamente feofitinas como productos de degradación. Contrariamente, Stewart y Uota (1971), no encuentran el mismo efecto positivo en lechugas conservadas

en una atmósfera que contenía desde el 2.5 al 10% de CO₂. Bajo estas condiciones, se causaban daños físicos y lesiones con manchas marrones.

Otra técnica para aumentar el tiempo de conservación de vegetales y retener su calidad, consiste en aplicar concentraciones altas de CO₂ en períodos cortos de tiempo, aunque el uso de este procedimiento depende del fruto o vegetal. En este sentido se engloban los trabajos de Wang (1977; 1979; 1983) en pimiento, brócol y col china.

6.4.- *Colorantes alimenticios.*

Un modo de obtener vegetales verdes enlatados con buen color es la adición de un colorante alimenticio. La clorofila como tal, es relativamente inapropiada para tal fin, ya que no sólo es inestable, sino que su insolubilidad en agua dificulta considerablemente su aplicación. Sin embargo, un derivado conocido como clorofilina sódico-cúprica, está siendo ampliamente utilizado en la actualidad. Se trata de la sal sódica de clorofilina en la que el Mg ha sido reemplazado por Cu. Tiene color verde-azulado, es moderadamente soluble en agua y resiste las condiciones de calentamiento utilizadas durante la elaboración de conservas enlatadas. La cantidad de cobre que contiene es muy inferior a la que representa un riesgo de intoxicación, no obstante, su empleo a escala industrial tiene problemas por razones toxicológicas (Coulter, 1984).

Son también muy utilizados como aditivos colorantes, los quelatos de cobre y zinc de los derivados clorofílicos, feofitinas y feoforbidas, que poseen un color verde brillante. Los quelatos de feofitina son liposolubles, mientras que los de feoforbida son solubles en agua. Son compuestos muy estables con el metal fuertemente enlazado, resistentes incluso a ácido clorhídrico concentrado, lo que les convierten en buenos colorantes de alimentos.

Las primeras citas bibliográficas sobre los complejos metaloclorofílicos se refieren a su formación circunstancial en vegetales enlatados. En okra así procesada a la que se le había adicionado una solución débil de cloruro de zinc para prevenir la pérdida del color verde, apareció un color verde brillante debido a la formación de un quelato de zinc (Fischbach, 1943; Fischbach y Newburger, 1943). Schanderl et al. (1965), también observaron el mismo fenómeno en purés de guisantes verdes enlatados y mantenidos a

temperaturas entre 0 y 37°C. Los productos almacenados a 37°C reverdecían con un color más estable, debido al acomplejamiento de feofitinas con cobre y zinc propios de la planta. En coles de Bruselas recolectadas al comienzo del otoño y procesadas, Swirski et al. (1969), encontraron un pigmento verde estable y soluble en agua, que parecía ser un complejo entre pigmentos clorofílicos y una proteína que contenía pequeñas cantidades de cobre y zinc.

Posteriormente, Segner et al. (1984), han mostrado en una patente las ventajas de la fuerte afinidad de unión que poseen los iones metálicos zinc y cobre, con clorofilas en comparación con el complejo nativo con magnesio. Estos autores desarrollan un proceso, "Veri-Green", que incorpora iones metálicos en el interior de las cubiertas de las latas. Acoplado la presencia del ión metálico con el escaldado se obtiene una mejora del color de los vegetales verdes enlatados. Von Elbe et al., (1986), atribuyen el color verde de los productos "Veri-Green" a la formación de complejos de feofitina y pirofeofitina de zinc predominando los derivados de la serie *a*, y atribuyen la falta de implicación de los derivados de la serie *b*, a su baja concentración en los tejidos vegetales así como a la dificultad de formar complejos metálicos con clorofila *b*. El grupo formilo presente en la clorofila *b* proporciona un electrón saliente al sustituyente, resultando un descenso en la densidad electrónica localizada en los nitrógenos pirrólicos y por tanto una reactividad menor con los cationes metálicos. También se piensa que la cadena de fitol interfiere estéricamente con la reacción de complejación, resultando una velocidad de inserción del ión metálico más rápida para los derivados libres de fitol.

Laborde et al. (1990) estudian la influencia de la cantidad de Zn^{2+} adicionado, la concentración inicial de pigmentos y el pH en la formación de complejos Zn-pirofeofitina *a* en puré de vegetales, con el objeto de dilucidar la formación de estos complejos durante el procesado térmico. Se espera que estudios posteriores y mejoras de esta tecnología intensifiquen el color y la aceptación por el consumidor de los vegetales enlatados.

7.- Clorofilasa: enzima implicada en el metabolismo de clorofilas.

7.1.- Función y localización.

La enzima clorofilasa (clorofil-clorofilido-hidrolasa EC 3.1.1.14) fue descubierta por Willstatter y Stoll (1928). Hay que hacer constar que la actuación de la enzima no está bien definida, pues en las células intactas no se observa actividad hidrolítica, mientras que tras la desintegración celular la clorofila es convertida en clorofilida.

In vitro esta enzima cataliza la separación del fitol de clorofilas (*a,b*) y feofitinas (*a,b*); bacterioclorofila también se considera como sustrato de clorofilasa. Purpurina-7-trimetil ester y mesopurpurina-18-monometil ester son hidrolizados por una preparación cruda. Klein y Vishiac (1961) encuentran que la clorofila 650 del clorobium se hidroliza por clorofilasa obtenida de plantas de centeno blanqueadas. Si esta observación se confirma sería de considerable interés ya que las clorofilas del clorobium no contienen fitol pero sí un alcohol C-15, el farnesol. Según la revisión de Holden (1976), Terpstra y Weijman, en 1972, sugieren que un factor proteínico, el cual incrementa la sensibilidad a la luz de la bacterioclorofila coloidal, es una forma especial de clorofilasa. Por último, aunque protoclorofila carece de los dos átomos de hidrógeno "extra" en el anillo IV y no es considerada como un sustrato de clorofilasa, Jones y Ellsworth en 1969 muestran evidencias de la presencia de una protoclorofilasa en plantas de trigo blanqueadas.

In vivo la enzima puede ser responsable del paso final en la síntesis de clorofila que es la adhesión de la cadena lateral de fitol a clorofilida. Algunos investigadores han estudiado la capacidad de síntesis de la enzima *in vitro*. Shimizu y Tamaki en 1963 fueron capaces de fitilar clorofilidas y feoforbidas usando una preparación purificada de clorofilasa obtenida de hojas de tabaco. Chiba et al., utilizando un extracto enzimático de *Chlorella protothecoides*, demostraron la fitilación de metil clorofilida *a* pero no de clorofilida *a*. Wellburn en 1970 confirmó este resultado. Así mismo, Ellsworth (1972), empleando preparados enzimáticos obtenidos de plantas de trigo, consiguió fitilar feoforbida *a* y convertir metil feoforbida *a* en feofitina *a* por transesterificación. Sin embargo, mediante estudios de filtración en gel, encontró evidencias de que estaban presentes más de una enzima en los extractos crudos (Holden, 1976).

Clorofilasa es una proteína intrínseca localizada en las membranas fotosintéticas del cloroplasto. La enzima se encuentra principalmente asociada con el estroma laminal, donde la actividad del fotosistema I es predominante (Lambers et al., 1984; Lambers et al., 1985). La identificación de clorofilasa como enzima intrínseca a la membrana está ilustrada por el hecho de que en casi todos los procesos de separación de clorofilasa existe un paso de tratamiento con disolvente orgánico y/o detergente. Aunque la enzima clorofilasa fue descubierta a principios de siglo, las primeras preparaciones solubles fueron obtenidas relativamente hace poco tiempo (Holden, 1961; Klein y Vishiac, 1961). Desde entonces numerosos investigadores han realizado preparaciones solubles a partir de hojas, cultivos vegetales y algas.

Cuando la acción de clorofilasa tiene lugar en acetona acuosa o en éter etílico saturado con agua, el grupo fitol es reemplazado por hidrógeno dando lugar a clorofilidas y feoforbidas. En metanol acuoso o etanol tiene lugar una transesterificación, reemplazándose el fitol por metilo o etilo dando ésteres de clorofilidas o feoforbidas.

7.2.- Distribución.

La enzima clorofilasa está presente en los frutos durante las etapas de crecimiento y estado de senescencia. Abdul-Baki (1971) estudia los cambios en el contenido en clorofilas y carotenos, así como la actividad de clorofilasa durante el desarrollo y maduración de frijoles. El máximo de actividad coincide en los frutos con el máximo contenido en clorofilas, y es superior al encontrado cuando se inicia el catabolismo o pérdida de clorofilas. En este mismo sentido, Minamide y Ogata (1972) estudian la evolución del contenido clorofílico y la actividad clorofilasa durante la maduración del tomate. La concentración de clorofilas decrece durante la maduración hasta niveles de trazas en el estado de rosa oscuro. La actividad clorofilasa muestra un máximo en el estado de rompiente (48 días después de la floración) a partir del cual decrece rápidamente.

Sin embargo, otros autores han demostrado que la actividad clorofilasa y la degradación de clorofilas se incrementa durante la senescencia de las hojas (Yamanchi et al., 1980; Rodríguez et al., 1987) así como en frutos tratados con etileno cuando son expuestos al aire (Wang, 1970; Shimada y Shimokawa, 1978; Simokawa et al., 1978; Purvis, 1980; Purvis y

Barmore, 1981). Shimokawa et al. (1978) estudian la degradación de clorofilas *a* y *b* en mandarina, tanto durante la maduración en el árbol, como cuando es inducida por etileno. En los frutos tratados se observa un importante descenso en clorofilas después de 12 h de exposición al aire mientras que en los frutos madurados en el árbol las clorofilas desaparecen a una velocidad constante en 20 días. Los autores indican una degradación preferente para clorofila *b*.

El incremento de actividad se relaciona con problemas de deficiencias nutricionales o estados fenológicos de la planta como son la maduración o senescencia. La desorganización del cloroplasto en estos estados favorece la puesta en contacto de la enzima y los sustratos y justifican el incremento de actividad (Terpstra y Lambers, 1983).

Aunque la pérdida de clorofilas se relaciona causalmente con la ruptura del cloroplasto y/o la actividad de clorofilasa ésto no es fácilmente demostrable (Purvis, 1980). Amir-Shapira et al. (1987) detectan clorofilidas en la piel de cítricos senescentes lo cual se asocia a un incremento en la actividad de clorofilasa. El tratamiento con etileno intensifica la actividad de la enzima. Sin embargo los mismos autores revelan un modelo catabólico diferente para hojas de perejil al producirse feofitinas y sólo aparecer transitoriamente derivados defitilados. Purvis y Barmore (1981) encuentran que el nivel de actividad clorofilasa no cambia cuando cesa el tratamiento con etileno en frutos cítricos, aún cuando se para la degradación de clorofilas. Concluyen por tanto que aunque el etileno es necesario en la degradación de clorofilas su papel principal no es solamente la inducción de la actividad clorofilasa.

Baardstth y VonElbe (1989) estudian la degradación de clorofilas en espinacas tratadas con etileno, pero no pueden demostrar que la aceleración de la degradación sea debida a la presencia del etileno. La desaparición gradual de clorofilas no coincide con la activación de clorofilasa ya que no se produce ningún producto coloreado. La actividad catalasa decrece durante el almacenamiento mientras que la peroxidasa aumenta. La adición de ácido linoleico y varias enzimas a sistemas modelo conteniendo clorofila *a* acelera la degradación de clorofilas. La velocidad de degradación se reduce por la adición de antioxidantes, catalasa o superóxido dismutasa, sugiriendo la implicación tanto del oxígeno singlete como molecular en el proceso de decoloración.

7.3.- *Reacción enzimática.*

En muy pocos casos se pueden obtener extractos acuosos que contengan clorofilasa a partir de homogeneizados de plantas sin el uso de solventes orgánicos o detergentes. En la actualidad, la mayoría de los ensayos encaminados a la preparación de clorofilasa consisten básicamente en una extracción de los homogeneizados de células o cloroplastos con acetona (McFeeters et al., 1971; Holden 1976), acetona en combinación con alcohol y éter (Holden, 1961), o isobutanol (Klein y Vishiac, 1961). El residuo o precipitado proteínico así obtenido se utiliza para la extracción de la enzima clorofilasa empleando para tal fin buffers alcalinos que contienen deoxicolato sódico (Klein y Vishiac, 1961), Tritón X-100 (McFeeters et al., 1971), o sin detergentes (Holden, 1961; Kuroki et al., 1981).

Para la medida de actividad enzimática, aunque el sustrato básico de clorofilasa es clorofila, recientemente algunos investigadores utilizan feofitinas ya que, tanto ellas como las feoforbidas formadas como productos de la reacción, son más estables a la luz que clorofilas y clorofilidas, y por tanto pueden ser mejor contabilizadas.

La reacción se lleva a cabo en presencia de acetona acuosa (40% v/v) (Holden, 1961; Kuroki et al., 1981; Jeffrey y Hallegraeff, 1987; Levadoux et al., 1987) o de detergentes como Tritón X-100 (Klein y Vishiac, 1961; McFeeters et al., 1971), deoxicolato u óxido de laurildiamina (Schoch y Brown, 1987). Para conseguir el pH óptimo de actividad comprendido entre 7.0 y 8.0 unidades, se emplean distintos sistemas buffers: citrato 0.02 M (Holden, 1961), fosfato 0.067 o 0.08 M (Klein y Vishiac, 1961), una mezcla conteniendo acetato 0.01 M, fosfato 0.05 M y borato 0.01 M más KCl para dar una fuerza iónica de 0.3 (McFeeters et al, 1971), Tris-HCl 0.1 M más MgCl₂ 50 mM (Levadoux et al., 1987) y Tris-HCl 20 mM con MgCl₂ 10 mM y NaCl 0.5 M (Terpstra y Lambers, 1983; Schoch y Brown, 1987).

Aunque la temperatura óptima de actividad es alta, alrededor de 75°C (Levadoux et al., 1987), la empleada normalmente para la incubación oscila entre 20 y 30°C (Holden, 1976). El tiempo de incubación varía, según la actividad del material biológico, desde 30 - 60 min, para los de mayor actividad, hasta horas en el caso de materiales con baja actividad enzimática (Holden, 1961). La reacción se detiene añadiendo acetona en cantidad suficiente

para que su concentración final sea superior al 70% (Jeffrey y Hallegraef, 1987; Levadoux et al., 1987; Schoch y Brown, 1987).

Finalmente, para medir la actividad enzimática al término de la incubación, el producto formado, clorofilida, debe ser primero separado del sustrato, clorofila, ya que al no existir diferencias cualitativas entre los espectros de absorción de ambos compuestos, no es posible determinar la cantidad de producto formado, a partir del espectro de absorción resultante de la mezcla de reacción. No obstante su distinta polaridad permite conseguir la separación. Basándose en esta propiedad Klein y Vishic (1961) y Levadoux et al. (1987), usaron para la separación el reparto de fases entre acetona acuosa y éter de petróleo ligero. El sustrato pasa a la capa de éter mientras que las clorofilidas o feoforbidas formadas permanecen en la acetona, y se mide la absorbancia en una de las dos fracciones o en ambas.

II. CAROTENOIDES.

1.- Presencia y distribución.

Se encuentran carotenoides en las plantas superiores, algas, hongos y bacterias, en las estructuras fotosintéticas, junto a las clorofilas, y en otras no fotosintéticas. Contrariamente a las clorofilas, los carotenoides también están presentes en animales, siendo responsables del color de peces, plumas de numerosos pájaros, insectos y algunos invertebrados. En el caparazón de color púrpura oscuro de muchos crustáceos es frecuente encontrar carotenoides, generalmente astaxanteno, asociados a proteínas y cuando el crustáceo se hierve, se desnaturaliza el complejo proteínico liberándose el carotenoide y tornándose el caparazón a un color rojizo.

Productos derivados de animales, tales como leche, mantequilla y yema de huevo, también contienen carotenoides. El color amarillo de esta última se debe a dos xantofilas; luteína y zeaxanteno y a trazas de β -caroteno. Las plantas son la fuente de los carotenoides de los animales y sus productos, ya que son las únicas capaces de sintetizarlos.

La distribución de carotenoides entre los distintos grupos de plantas no presenta un modelo único. En los vegetales foliares el patrón de carotenoides es generalmente uniforme, conteniendo cuatro "carotenoides cloroplásticos" básicos, un caroteno, β -caroteno, y tres xantofilas, luteína, violaxanteno y neoxanteno, lo que, según Strain (1966), es un posible indicio de la intervención de un antecesor común en todas las plantas superiores. Adicionalmente se encuentran otros carotenoides como pigmentos minoritarios: α -caroteno, α y β -criptoxanteno, isoluteína, zeaxanteno y anteraxanteno. En hojas de lechuga se ha encontrado un carotenoide inusual, el lactucaxanteno ó ϵ, ϵ -caroteno (Siefertmann-Harms et al., 1981).

En los frutos pueden darse modelos de carotenoides característicos de cada especie y variedad e incluso de cada estado de madurez. La distribución de los carotenoides es extremadamente compleja encontrándose generalmente las xantofilas en mayor proporción. Excepcionalmente en el mango y el caqui, β -caroteno y sus intermediarios xantofílicos, criptoxanteno y zeaxanteno, son los dominantes. En cambio, en el tomate, el carotenoide mayoritario es el licopeno. A veces, en ciertos frutos, ocurre que algún carotenoide además

de ser mayoritario se limita a una sola especie de plantas. El capsanteno y capsorrubeno se encuentran casi exclusivamente en los frutos del género *Capsicum* y son los principales pigmentos que le dan color al pimiento rojo (Goodwin y Goad, 1970; Goodwin, 1976). El zumo de naranja contiene proporciones variables de criptoxanteno, luteína, anteraxanteno y violaxanteno, junto con trazas de sus carotenos precursores. Durante la elaboración del zumo, las condiciones ácidas promueven algunas conversiones espontáneas de los grupos 5,6 y 5',6'-epóxidos a 5,8,5',8' epóxidos.

2.- Localización, estructura y función.

En las plantas superiores los carotenoides están localizados en cloroplastos y cromoplastos, que son orgánulos que pueden ser considerados como cloroplastos degenerados. Los primeros se encuentran en todos los tejidos fotosintéticos, especialmente en hojas, y también en frutos inmaduros y algunos frutos maduros.

En los organismos fotosintéticos, prácticamente todos los carotenoides se hayan presentes en forma de complejos clorofila-carotenoide-proteína. Los cromoplastos se encuentran en flores y frutos maduros, proporcionando los colores que varían desde el amarillo, al naranja y al rojo.

Los carotenoides se clasifican químicamente como terpenoides, sustancias derivadas en la naturaleza del intermediario metabólico ácido mevalónico, que aporta la unidad básica estructural. Los carotenoides son los únicos tetraterpenoides conocidos (Moss y Weedon, 1976).

Pueden dividirse en dos grandes grupos: los carotenos, que son estrictamente hidrocarburos, y las xantofilas, que contienen oxígeno. En la estructura del licopeno, que es el caroteno más sencillo, Figura 5, se ilustra claramente cómo se sintetiza la molécula a partir de dos unidades de diterpenoides unidas "cabeza contra cabeza". Otros carotenos se forman por ciclación de los extremos de la cadena. El resultado son dos posibles estructuras cíclicas, la β -ionona y la α -ionona, como β -caroteno y α -caroteno (Figura 5).

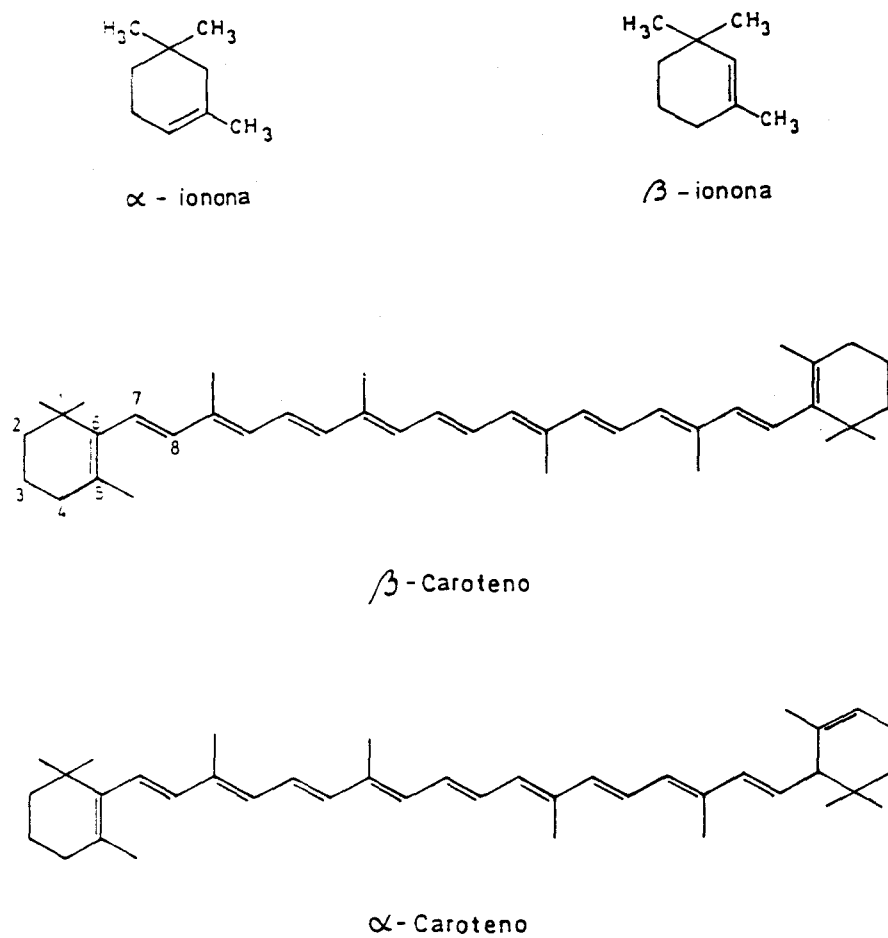


FIGURA 5: Estructura de carotenos y anillos de ionona.

Las xantofilas, Figura 6, 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 capsanteno. 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 crocetina.

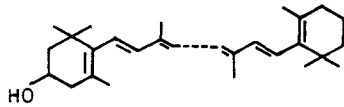
Exceptuando los apocarotenoides ácidos, los cuales forman sales solubles en agua en condiciones alcalinas, los carotenoides sólo son solubles en disolventes orgánicos apolares (Clydesdale y Francis, 1982; Coultate, 1984).

3.- Propiedades químicas.

Los carotenoides son bastante estables en su ambiente natural, pero cuando los alimentos se calientan o cuando los carotenoides son extraídos con aceite o con disolventes orgánicos, se vuelven mucho más lábiles. Aunque los carotenoides son relativamente resistentes al calor y a valores de pH extremos, estos agentes pueden provocar una transformación *cis-trans* de ciertos dobles enlaces, lo que puede modificar el color y el valor nutritivo. Al tratarlos con calor en ausencia de aire, existe una tendencia de algunos dobles enlaces *trans* de los carotenos a isomerizarse a *cis*, y conforme aumenta el número de dobles enlaces *cis*, disminuye la intensidad del color. La diferencia de color de la piña fresca y la enlatada es un claro ejemplo de este efecto.

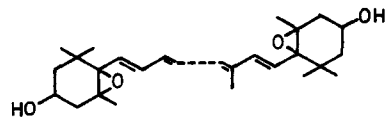
En presencia de oxígeno, especialmente en alimentos deshidratados, la oxidación y decoloración tienen lugar con mucha rapidez. Los hidroperóxidos resultantes de la degradación de lípidos favorecen considerablemente la decoloración de los carotenoides. La degradación total de β -caroteno da lugar a un resto de β -ionona, compuesto volátil que proporciona al heno secado al sol, su olor característico. Son por tanto, muy sensibles a la oxidación por el oxígeno del aire, reacción catalizada por la luz, lipoxidasas y peróxidos lipídicos. Esta reacción es la responsable de la decoloración de algunos vegetales en conserva colocados en recipientes permeables a la luz, como zanahoria, melocotón, etc., (Goodwin, 1980).

MONOHIDROXIDERIVADOS



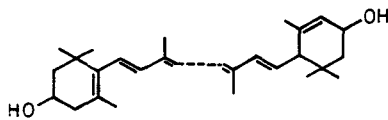
Criptoxanteno

EPOXIDERIVADOS

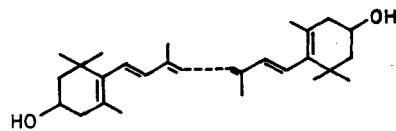


Violaxanteno

DIHIDROXIDERIVADOS

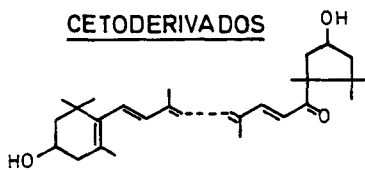


Luteina



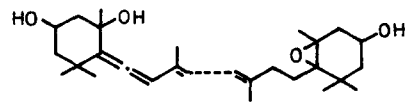
Zeaxanteno

CETODERIVADOS



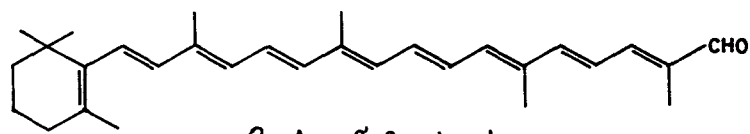
Capsanteno

ALENO

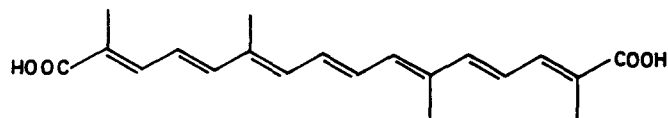


Neoxanteno

APOCAROTENOIDES



β - Apo - 8' - Carotenal



Crosetina

FIGURA 6: Estructuras de xantofilas.

En general los carotenoides presentan las propiedades químicas propias de los grupos que poseen. Los grupos 5,6-epóxidos se isomerizan rápidamente a 5,8-epóxidos en presencia de ácidos diluídos. Los grupos carbonilos se pueden reducir con hidruros metálicos, tales como AlLiH_4 en éter etílico o NaBH_4 en etanol. Los hidroxilos primarios y secundarios se acetilan a temperatura ambiente con anhídrido acético en piridina, mientras que los terciarios no reaccionan bajo estas condiciones. Por otro lado, los grupos hidroxilos alílicos se pueden deshidratar al tratarlos con cloroformo acidificado

4.- Propiedades físicas.

4.1.- *Espectro de absorción electrónica ultravioleta visible.*

El espectro de absorción de los carotenoides se debe al sistema de dobles enlaces de su cadena hidrocarbonada. La posición de las bandas de absorción máxima, que normalmente son tres, es función del número de dobles enlaces de su molécula. Un incremento en este número provoca un desplazamiento a longitudes de onda mayores (20-22 nm por cada nuevo doble enlace conjugado), pero este efecto puede estar modificado por la ciclación. Si el anillo de β -ionona se convierte en α -ionona los máximos se desplazan a λ menores entre 9-11 nm. Contrariamente, si el anillo se abre, entonces el desplazamiento es hacia λ mayores. Cuando el doble enlace del grupo terminal se reemplaza por un grupo 5,6 epóxido ocurre una variación de 6-9 nm a λ inferiores. La conversión del grupo epóxido en 5,8 epóxido ocasiona un desplazamiento hipsocrómico de 19-22 nm. La introducción de un grupo hidroxilo no afecta mucho la posición de los máximos de absorción, y lo mismo ocurre con los grupos cetónicos no conjugados con la cadena de polienos, mientras que los conjugados desplazan los máximos 3-5 nm a la derecha. La isomería *cis-trans* sí tiene un profundo efecto en el espectro de absorción, apareciendo un nuevo máximo en torno a 325 nm. Las posiciones de los máximos de absorción pueden variar en función del disolvente empleado para obtener el espectro de absorción electrónica de un carotenoide, correspondiendo los valores más bajos en éter de petróleo ligero y los más altos en disulfuro de carbono.

Por otro lado, las variaciones estructurales también afectan la forma del espectro de absorción. Los carotenoides con estructuras acíclicas presentan espectros con mucha mayor persistencia, esto es con alto grado de estructura fina, que aquellos carotenoides con anillos

en su estructura. Por ejemplo, las bandas de onda corta de los carotenoides con dos grupos de β -ionona, se reducen a meras inflexiones. En algunos cetocarotenoides, donde el doble enlace C=O se conjuga con la cadena de polienos, se pierden las tres bandas y se reemplazan por una banda ancha y casi completamente simétrica o por una única banda principal con inflexiones muy débiles a uno y otro lado. En los carotenoides con grupos 5,8 epóxidos, generalmente las dos bandas de absorción a mayor longitud de onda, son de igual intensidad y están muy bien definidas, mientras que la banda a menor longitud de onda, aunque está presente, está mucho peor definida y es menos intensa. El mutatocromo es una excepción de carotenoide con grupo 5,8 epóxido con espectro de absorción de débil persistencia (Goodwin, 1980).

Es por tanto útil comparar el espectro de absorción electrónica de un carotenoide no sólo con respecto a las posiciones de los máximos de absorción sino también en términos de su forma. Salvo que el espectro se presente como figura, el mejor método para describir las características espectrales es citar los valores de los coeficientes de extinción molares (ϵ) o específicos ($E^{1\%}$) para cada máximo y mínimo. Si esto no es posible se puede usar el parámetro % III/II. En este convenio se expresa la altura de la banda de absorción a la longitud de onda mayor (III) como porcentaje de la altura de la banda intermedia (II) que normalmente es λ_{\max} , considerando como base el mínimo entre estos dos máximos. En muy pocos casos el % III/II es ligeramente superior a 100. Davies (1976) discute en detalle el efecto de las variaciones estructurales en el espectro de absorción de los carotenoides.

4.2.- Otras propiedades espectroscópicas.

Los únicos carotenoides que pueden ser detectados por su fluorescencia a temperatura ambiente son el fitoflueno y sus derivados, que en placa fina bajo luz UV_{360nm} muestran una intensa fluorescencia verdosa. En solución etanólica fitoflueno presenta tres máximos de excitación a 333, 350 y 368 nm que aumentan linealmente con el logaritmo de la concentración. El máximo de emisión ocurre a 490 nm. La determinación del fitoflueno por fluorescencia es tres veces más sensible que por espectrofotometría (Davies, 1976).

La espectroscopía infrarroja ha sido útil para detectar en los carotenoides grupos funcionales específicos tales como acetilénicos, alénicos, hidroxilos o cetónicos, especialmente

aquellos que son inaccesibles a los reactivos químicos como ocurre en el capsanteno o fucoxanteno (Davies, 1976; Davies y Köst, 1988).

5.- Propiedades nutricionales y beneficiosas de los carotenoides.

La principal función fisiológica de los carotenoides es su capacidad como precursores de la vitamina A en los organismos animales. En general, los animales pueden convertir enzimáticamente los carotenoides con dicha actividad, en vitamina A. El nombre químico de la vitamina A es retinol y se encuentra sólo en alimentos de origen animal.

Todos los carotenoides hidrocarburos tienen actividad de provitamina A. La condición para que un carotenoide tenga tal actividad es que posea al menos un anillo de β -ionona no sustituido. 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 o β -criptoxanteno sólo dan lugar a una molécula de vitamina A porque sólo presentan una estructura de anillo de β -ionona (Pitt, 1971).

La vitamina A es esencial para la visión con poca luz y necesaria para mantener sanos la piel y tejidos superficiales. No se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos, siendo las fuentes naturales 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 (Bauernfeind, 1971; Coultate, 1984).

Por otro lado, los carotenoides están considerados como agentes potenciales que previenen contra el cáncer (Mathews-Roth, 1985). Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una relación inversa entre el riesgo de contraer cáncer y el consumo de alimentos que contienen β -caroteno. Bushway (1986) evidencia, mediante experiencias de laboratorio, la inhibición de células cancerígenas y regresión del tumor, en animales en cuya dieta se había suministrado β -caroteno y, posteriormente, Shklar y Schwartz (1988), encuentran análogos resultados.

En una reciente publicación, Bureau y Bushway (1986), recogen la opinión de otros autores que también han detectado en los carotenoides propiedades "antiúlceras", encontrando que el retinol y algunos carotenoides (β -caroteno, β -criptoxanteno, zeaxanteno, luteína, capsorrubeno, capsanteno, licopeno, y capsantol) están relacionados con la protección de la mucosa gástrica. En este sentido, Bushway (1986) comenta que se ha demostrado que estos compuestos poseen además, efectos de "antienvjecimiento", y que existe una relación positiva entre la concentración de carotenoides en suero y tejido cerebral, y la duración de vida de los mamíferos.

6.- Transformación de carotenoides durante el almacenamiento, cocinado y procesado de alimentos.

Tras la recolección, los vegetales y frutos continúan vivos durante un determinado período de tiempo, teniendo lugar una serie de transformaciones en los mismos, que incluye pérdida de agua, conversión de almidón en azúcares, cambios en el flavor y color, germinación, ablandamiento y, en último extremo, putrefacción. Para mantener los vegetales frescos mientras están vivos, es necesario minimizar los anteriores procesos controlando las condiciones de almacenamiento: humedad, oxígeno, luz y temperatura, tal como se describió para clorofilas. Yang y Henze (1988a) investigan los efectos de varias formas de atmósfera controlada sobre el contenido carotenoide de brócoles, encontrando que permanecía casi constante durante 8 semanas de almacenamiento. Los cambios que pueden experimentar los carotenoides durante el tiempo de almacenamiento de la planta depende del momento fisiológico en que se recolecte el vegetal; esto es, aumentan con la maduración, o disminuyen con la senescencia.

Los distintos procesados, como son el cocinado, enlatado, la congelación, deshidratación, etc., a que se someten la mayoría de los vegetales, implican tratamientos térmicos y exposición a la oxidación, favorecida por la luz y presencia de enzimas. En tales condiciones, los carotenoides presentes en los mismos son susceptibles a experimentar transformaciones. En general, en los vegetales sometidos a tratamientos con calor, congelación o durante el tiempo de envasado, no se encuentran pérdidas significativas en el contenido total de carotenos pero, durante el procesado de alimentos, suelen producirse reacciones de isomerización que reducen la capacidad de los carotenos como precursores de vitamina A. Sweeney y Marsh

(1987), muestran una pérdida entre 15-30% de vitamina A debida a la conversión de *trans*- β -caroteno en su isómero *cis*, en vegetales procesados.

Durante el calentamiento se desorganiza la compartimentación celular de los vegetales y los complejos carotenoproteínicos, los cuales son más estables que los carotenoides libres, se destruyen quedando los carotenoides expuestos a la degradación. En ausencia de oxígeno, el único efecto del calentamiento es inducir la conversión de los isómeros naturales *trans* a isómeros *cis*, los cuales son menos estables y poseen menor actividad de provitamina A. Si durante el procesado se acorta el tiempo del tratamiento térmico, se reduce al mínimo la presencia de oxígeno, y se añaden antioxidantes, se consigue minimizar la oxidación de los carotenoides. Mediante el escaldado se inactivan las enzimas oxigenasas y lipoxigenasa. La congelación del vegetal previamente escaldado, no causa degradación de carotenoides.

Los vegetales deshidratados experimentan la mayor degradación. Livingston et al. (1968), encuentran que existe una pérdida del 50% de xantofilas durante el proceso de deshidratación de harina de alfalfa, que podía estar relacionada con la temperatura empleada y la humedad de la harina. Por el contrario, el contenido total de β -caroteno se mantiene relativamente inalterado aunque la proporción de isómeros aumenta con las elevadas temperaturas de deshidratación y los bajos niveles de humedad. La luteína resultó ser más estable que el neoxanteno o violaxanteno bajo las condiciones normales de deshidratación. Sian y Soleha (1991) investigan el efecto del escaldado y presecado en la estabilidad de los carotenoides en papaya y piña. Los carotenoides estaban más protegidos en un sistema en el que glicerol y azúcar retuvieron un alto nivel de humedad.

El secado por congelación se prefiere al secado por aire, el cual implica una mayor exposición al oxígeno y al calor. Los productos deshidratados, en polvo, o liofilizados, con un gran área superficial susceptible a la destrucción, son menos estables, por lo que tienen que ser almacenados en condiciones óptimas de actividad de agua, atmósfera inerte y en presencia de antioxidantes.

Las investigaciones sobre el efecto del almacenamiento y procesado sobre los carotenoides, se centran principalmente en el valor nutritivo de los alimentos y, por lo tanto, dirigidas al estudio de la retención de β -caroteno, el principal carotenoide con actividad de provitamina A.

7.- Uso de los carotenoides como colorantes.

Hasta hace poco tiempo, los carotenoides han sido escasamente utilizados como aditivos alimentarios, debido a su inestabilidad y a su insolubilidad en agua. Sin embargo, existen dos excepciones: la crocetina y la bixina. La crocetina, es el pigmento mayoritario del azafrán en el que se encuentra en forma de glicósido, presentando todos sus grupos carboxilos esterificados con moléculas del disacárido gentiobiosa.

La bixina es el constituyente principal de la sustancia colorante conocida como annato, que es un extracto del fruto de la planta *Bixa orellana*, arbusto de gran tamaño que crece en algunos países tropicales. El annato es el colorante tradicional de los quesos rojos como el Leicester, siendo también utilizado como colorante para la margarina.

También se usan como colorantes alimenticios, extractos de pimiento, cuya pigmentación se debe principalmente a capsanteno y capsorrubeno, extractos de alfalfa, tomate y zanahoria. Pero estos extractos naturales están siendo reemplazados gradualmente por carotenoides sintéticos. A escala comercial se han sintetizado β -caroteno, β -apo-8'-carotenal y cantaxantina. β -caroteno es el más utilizado por su valor de provitamina A, y proporciona colores amarillentos y anaranjados, mientras que los otros dos compuestos suministran un matiz rojizo. Estos carotenoides se añaden directamente a los alimentos para consumo humano. Se utilizan en margarinas, quesos, helados y algunos productos horneados como pasteles y galletas (Coultrate, 1984).

III. ANALISIS DE PIGMENTOS EN VEGETALES.

1.- Técnicas de extracción.

Para la extracción de clorofilas y carotenoides a partir de los tejidos de las plantas la AOAC (1984) recomienda un paso inicial de molienda o mezclado (homogeneización) del tejido. La eficiencia de la molienda puede ser mejorada por la adición de arena de cuarzo al mortero. A continuación se añade el disolvente y se mantiene el tejido en maceración pero con ciertas precauciones, ya que las clorofilas pueden degradarse fácilmente a otros productos, a menos que la maceración tenga lugar en presencia de un exceso de disolvente.

Después de la molienda del tejido en exceso de disolvente, la mezcla se filtra (papel de filtro, vidrio sintético, tierras de diatomeas) o se centrifuga para recuperar los sólidos, aunque se prefiere la filtración ya que garantiza mejor la eliminación de sólidos. En los casos en que no se extraen todos los pigmentos se recomienda un segundo tratamiento con disolvente. La molienda y filtración se llevan a cabo rápidamente bajo luz tenue para prevenir la fotodecoloración y/o alomerización.

Algunas plantas deben ser calentadas rápidamente en agua hirviendo y enfriadas inmediatamente en agua helada antes de la molienda para mejorar la extractabilidad y reducir la oxidación enzimática y la hidrólisis (Strain y Svec, 1966; Holden, 1976). Algunos estudios han mostrado que el calentamiento causa la isomerización de clorofilas *a* y *b* en *a'* y *b'*, así como la formación de feofitinas (Strain, 1954; Bacon y Hoden, 1967; Clydesdale et al., 1970; Schwartz et al., 1981). Se ha recomendado la adición de CaCO_3 , MgCO_3 , NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NH_4OH o dimetilnilina durante el triturado para prevenir la formación de feofitinas, sobre todo en plantas con citoplasma ácido (Arkcoll y Holden, 1973; Bureau y Bushway, 1986; Kan et al., 1985). Strain et al. (1971) determinaron que ni CaCO_3 , ni MgCO_3 podían prevenir totalmente la formación de feofitinas en la extracción de clorofilas a partir de tejidos ácidos ya que ninguna sal puede neutralizar totalmente los ácidos. Más información acerca del tratamiento anterior a la extracción se puede encontrar en las revisiones de Strain y Svec (1966), Holden (1976) y Svec (1978).

Distintos investigadores han usado una gran variedad de solventes (metanol, etanol, acetona, N,N-dimetilformamida, piridina, tetrahidrofurano acetato de etilo/hexano, etanol/éter de petróleo, metanol/éter de petróleo, acetona/metanol y acetona/acetato de etilo) para la extracción de pigmentos de plantas y fitoplacton. Los hidrocarburos alifáticos y aromáticos normalmente no se utilizan ya que no extraen clorofilas.

Humphrey (1980) comenta que el alcohol etílico anhidro es pobre como disolvente pero la adición de sales disueltas (CaCl_2) o agua mejora la solubilidad. Strain y Svec (1966) usan una mezcla de metanol y éter de petróleo aprovechando la capacidad de éste para prevenir reacciones de hidrólisis, alomerización, y/o oxidación de pigmentos. Oquist y Samuelsson (1980) utilizan éter de petróleo y etanol (0 al 1%) como solvente para la extracción de clorofilas, encontrando que la mejor solubilización de éstas se consigue al aumentar la polaridad de la mezcla por la adición de etanol. Van Buren (1985) muestra resultados similares al emplear acetato de etilo y hexano, y concluye que a medida que se aumenta la proporción de acetato de etilo se extrae un mayor porcentaje de clorofila *a* a partir del liofilizado de membranas tilacoides de hojas de espinacas.

Algunos autores recomiendan el uso de soluciones acuosas de acetona, oscilando la proporción del agua hasta el 20% (v/v), pero ocurre que por encima del 10%, clorofila *a*, al ser la menos polar, no se extrae totalmente. Por otro lado concentraciones de agua superiores pueden prevenir la conversión de clorofilas en clorofilidas por acción de clorofilasa lo cual puede ser a veces beneficioso (Lichtenthaler, 1987). En otros casos se sugiere un paso inicial con acetona 100% para obtener la extracción completa de clorofilas (Sweeney y Martin, 1958; Buckle y Edwards, 1970a; Schwartz et al., 1981). Humphrey (1980) corrobora que la adición de agua a los solventes (acetona y metanol) mejora la extractabilidad del solvente ya que el agua perturba el balance electrolítico de la clorofila en el cloroplasto causando la dispersión de la clorofila. Brunisma (1963) también anota que la adición de agua reduce la solubilidad de otros compuestos lipídicos tales como carotenos, produciendo por tanto un extracto de clorofilas más puro.

Moran y Porath (1980) usan dimetilformamida para la extracción de clorofilas en tejidos intactos de plantas de bajo contenido en clorofilas, tales como pepinillos, disminuyendo la potencial pérdida de estos pigmentos durante la trituración o centrifugación. Esta técnica es de gran importancia en el desarrollo de metodologías para plantas que contengan pequeñas

cantidades de clorofilas. La N,N-dimetilformamida se ha usado recientemente por Mínguez y Garrido (1989) para la extracción de clorofilas y carotenoides en presencia de grandes cantidades de lípidos. Mediante fraccionamiento de componentes por reparto entre las fases N,N-dimetilformamida y hexano se consigue una solución de pigmentos sin interferencia de lípidos. Mínguez et al. (1991b) emplean este sistema para la decoloración de aceites vegetales y oleorresinas, con una recuperación total de pigmentos inalterados.

Múltiples investigadores han propuesto la saponificación como método eficaz de purificación de carotenoides, eliminando con dicha operación lípidos y clorofilas (Davies, 1976; Heinonen et al., 1989). Aunque la purificación de xantofilas y carotenos por saponificación es una técnica usual, se han descrito algunos carotenoides sensibles al medio alcalino (Liaaen-Jensen, 1971). Khachik et al. (1986) investigaron el efecto de la saponificación en la distribución cualitativa y cuantitativa de extractos de carotenoides procedentes de algunos vegetales. Encontraron que durante la saponificación tenían lugar pérdidas significativas de xantofilas, particularmente los epoxicarotenoides, mientras que los carotenos no se afectaban significativamente.

2.- Separación de pigmentos.

2.1.- *Cromatografía en columna.*

Los experimentos de cromatografía clásica llevados a cabo por Tswett (1906) en columna de azúcar, permitieron separar clorofilas *a* y *b* del resto de carotenoides y sigue siendo en la actualidad ampliamente empleada para separar grandes cantidades de clorofilas *a* y *b* (1 a 10 mg). Posteriormente la elección de los adsorbentes se efectuó en base a su selectividad y a la no reactividad con los pigmentos y/o los solventes (Strain y Svec, 1969; Strain y Sherma, 1972). Algunos adsorbentes inorgánicos alteran las moléculas de clorofilas provocando isomerización y los que poseen carácter ligeramente ácido inducen su degradación a feofitinas (Bacon y Holden, 1967; Strain y Svec, 1969; Holden 1976). Como ejemplos de adsorbentes usados se pueden citar almidón, celulosa, algunos tipos de azúcares, polietileno, sílice, tiza precipitada, fosfato cálcico, y alúmina (Smith y Benítez, 1955; Sweeney y Martin, 1961; Tan y Francis, 1962; Anderson y Calvin, 1962; Perkins y Roberts, 1962; Jones, 1963; Bacon, 1965; Stobart et al., 1967; Jeffrey, 1968; De la Mar y Francis, 1969).

2.2.- Cromatografía en papel.

La cromatografía en papel de pigmentos cloroplásticos ha sido revisada por Sêsták (1980). Para estudiar los cambios de color que experimentan las hojas entre la primavera y el otoño, Sanger (1971) separó los pigmentos de las hojas utilizando la cromatografía en papel bi-dimensional. Posteriormente, Burke y Aronoff (1980), usaron la cromatografía circular sobre papel Whatman No.3, para la preparación de clorofilas. No obstante, la técnica de cromatografía en papel ha sido casi completamente sustituida por la cromatografía en capa fina, que es más sensible.

2.3.- Cromatografía en capa fina (TLC, Thin layer chromatography).

El bajo precio de la TLC y la simplicidad de esta técnica ha permitido que se emplee ampliamente para separar y monitorizar pigmentos. Los adsorbentes usados incluyen silicagel u otros silicatos, celulosa, azúcar, y octadecil (C_{18}) enlazado con silicagel. Aunque algunos autores han señalado que la TLC puede producir artefactos y/o productos de descomposición causados por la luz, la acidez de la sílice, métodos de secado, oxidación y/o solventes, con fines cualitativos de identificación y guardando las debidas precauciones es una técnica insustituible (Bacon, 1966; Strain et al., 1967; Strain y Svec, 1969; Holden, 1976; Lord y Tirimanna, 1976; Buckle y Rahman, 1979; Mínguez-Mosquera et al., 1989). Se ha señalado que las placas de sacarosa producen menos productos de degradación (Jeffrey, 1968; Chan et al., 1970; Sahlberg y Hynninen, 1984). El avance más reciente ha sido el uso de la TLC de alta resolución por Suzuki et al. (1987) con solventes de un único componente para determinar la movilidad y retención de las clorofilas.

2.4.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High performance liquid chromatography).

Gradualmente, los métodos cromatográficos tradicionales están siendo sustituidos por la HPLC, la cual es más rápida, sensible y altamente reproducible. La alta resolución de las columnas de HPLC permite la separación individual de clorofilas y carotenoides a partir de

mezclas complejas. El tiempo de análisis, incluyendo la preparación de la muestra, es generalmente menor que con otros métodos cromatográficos. En algunos casos la separación se completa en 30 min. La interacción de estos pigmentos con la luz los hace particularmente apropiados para el uso de HPLC ya que la espectrofotometría se usa como medio de detección. La alta sensibilidad de los detectores UV-VIS y de fluorescencia permiten el análisis de muestras de pequeño tamaño a la vez que se pueden cromatografiar grandes cantidades usando HPLC preparativa, la cual es particularmente cómoda para recoger los componentes individuales puros.

La primera aplicación de la HPLC al análisis de pigmentos cloroplásticos apareció en 1975 (Evans et al.). Desde entonces se han realizado numerosas investigaciones acerca de su aplicación a la separación de carotenoides, clorofilas y derivados clorofílicos en tejidos vegetales y fitoplacton marino. Puede hacerse una distinción entre aquellos autores que emplean cromatografía en fase normal, principalmente sobre columnas de gel de sílice, y aquellos que lo hacen en fase reversa, en general sobre columnas de funcionalidad C_{18} . Este último tipo de columnas parece tener ciertas ventajas en relación con las primeras ya que se evitan problemas de degradación de pigmentos, así como largos tiempos de acondicionamiento (Mantoura y Llewellyn, 1983; Wright y Shearer, 1984). Jacobsen (1978) describe un método fluorimétrico cuantitativo para la separación de clorofilas y feofitinas *a* y *b* en fitoplacton usando HPLC en fase normal de silicagel. El método implica un sistema isocrático empleando la mezcla acetona/ligroína (20:80). Iriyama et al. (1978) desarrollan un micro-método para el análisis cualitativo y cuantitativo de pigmentos fotosintéticos en espinacas, empleando una columna de silicagel y como eluyente la mezcla de alcohol isopropílico en hexano del 1 al 10%. Yoshiura et al. (1978) resolvieron una mezcla de clorofilas y feofitinas empleando una columna de silicagel y un sistema de gradiente consistente en 8, 10, y 12% de acetona en hexano. Con este mismo sistema Iriyama et al. (1979) determinan la pureza de los pigmentos separados.

También se han desarrollado métodos de HPLC en fase normal para resolver mezclas complejas de clorofilas y carotenoides. De Jong y Woodlief (1978) cuantificaron los pigmentos en hojas de tabaco, como función del genotipo de tabaco y de la posición de la hoja en el tallo, usando una columna de silicagel y un sistema de gradiente con la mezcla de solventes heptano, éter etílico y acetona.

Evans et al. (1975) aplicaron por primera vez la técnica de HPLC en fase reversa para la separación de los pigmentos clorofílicos y carotenoides. Estos autores emplean una mezcla de acetato de etilo en éter de petróleo como fase móvil. Consiguen una buena resolución de porfirinas obtenidas de diferentes fuentes naturales así como feofitinas *a* y *b*. Una vez recogidas las fracciones de pigmentos, obtienen el espectro de desorción de masas. Los datos de retención cromatográfica y del espectro de masas proporcionan una caracterización completa de los pigmentos. Eskins et al. (1977) desarrollan un método preparativo para la separación de pigmentos en la diatomea *Nitzschia closterium* usando una columna de fase reversa y un sistema de gradiente desde metanol del 80% hasta una mezcla de metanol/éter. La separación se completa en aproximadamente 270 min. Se obtiene una buena resolución para clorofilas *a* y *c*, feofitinas, carotenoides, neofucoxanteno, diadinoxanteno, diatoxanteno, y caroteno. El método es también aplicable para separar clorofilas y carotenoides en espinacas.

En general para las metodías en fase reversa se han empleado distintas mezclas formadas por metanol/acetona (Schoch et al., 1978), metanol/agua (Shoaf, 1978; Braumann y Grimme, 1979) o metanol/acetona/agua (Rebeiz et al., 1978) de forma isocrática o en gradiente. Otros investigadores añaden a la mezcla metanol/agua un modificador de la fase en forma de gradiente que puede ser acetona (Mantoura y Llewellyn, 1983) o acetato de etilo (Eskins y Dutton, 1979; Eskins y Harris, 1981; Schwartz et al., 1981; Schwartz et al., 1983) o THF (Craft et al., 1992). También se ha descrito la adición de ciertos reactivos a la fase móvil para mejorar la resolución de los derivados clorofílicos defitilados (Davies y Holdsworth, 1970; Mantoura y Llewellyn, 1983). La adición de un reactivo de pares iónicos (fosfato de tetrabutilamonio) a la mezcla metanol/agua mejora la resolución de las mezclas complejas. En este sentido, Mínguez et al. (1991c) estudian los cambios que experimentan clorofilas y carotenoides durante el proceso de fermentación láctica de aceitunas verdes de mesa, utilizando la HPLC en fase reversa con un sistema de elución en gradiente que también incluye un reactivo de pares iónicos en la mezcla de elución. Posteriormente, los mismos autores (1993a) adaptan el sistema para la separación de feoforbidas y derivados clorofílicos en alto grado de oxidación.

Schwartz et al. (1981) analizan mediante HPLC los pigmentos presentes en espinacas frescas, escaldadas, congeladas y enlatadas. La separación de los pigmentos se lleva a cabo con una columna de fase reversa usando un gradiente de elución con la mezcla metanol/agua-

/acetato de etilo. Aplicando esta metodología se identifican, por primera vez, pirofeofitinas en extractos de espinacas enlatadas. La no detección de pirofeofitinas anteriormente, se atribuye a la falta de resolución de otros métodos y a que las características de absorción de feofitinas y pirofeofitinas son idénticas. Similares condiciones fueron usadas por Schwartz (1984) para separar complejos de feofitinas de zinc y cobre.

Ultimamente se están desarrollando métodos en fase reversa no acuosa. Wright y Shearer (1984) muestran la eficiencia de la extracción mediante sonicación en metanol así como la separación por HPLC en fase reversa de 44 pigmentos que incluyen carotenos, xantofilas, clorofilas y derivados, en fitoplacton marino. Emplean un gradiente lineal desde 90% de acetonitrilo hasta 100% de acetato de etilo.

En general, la detección de los pigmentos mediante el uso de la espectroscopía UV-Vis, se realiza entre 380-445 nm que es la zona de máxima absorción tanto para clorofilas como para carotenoides. Algunos autores proponen la detección selectiva de clorofilas y derivados a 654 nm (Schwartz et al., 1981) ó 667 nm (Schoch et al., 1978) para eliminar interferencias de los componentes amarillos que no presentan absorción en esas zonas del espectro. Así mismo se ha propuesto la detección de clorofilas y derivados por emisión de fluorescencia que es mucho más sensible que la absorción y que además también elimina la interferencia de los carotenoides (Brown et al., 1981; Shioi et al., 1984).

También se han desarrollado métodos específicos de HPLC para la separación de carotenos con actividad provitamínica A. Estos sistemas tienen por objeto separar no sólo los distintos isómeros posicionales de carotenos sino también sus estereoisómeros ya que no todos ellos tienen la misma actividad provitamínica (Stancher et al., 1982). Inicialmente se emplearon fases estacionarias muy polares como alúmina (Vecchi et al., 1981) o hidróxido de calcio (Tsukida et al., 1982; Chandler y Schwartz, 1987; Pettersson, 1989). Estos tipos de relleno tienen el inconveniente de ser inestables frente a pequeñas cantidades de agua (necesitando largos tiempos de acondicionamiento) y de no ser asequibles comercialmente.

Aunque se han hecho muchos esfuerzos de investigación en el desarrollo de las técnicas modernas de HPLC, se necesitan esfuerzos adicionales para refinar los métodos de análisis de muestras complejas de pigmentos. Se esperan bastantes avances con el desarrollo de los sistemas acoplados HPLC-espectrometría de masas.

EXPERIMENTAL

I. MATERIA PRIMA.

El estudio se lleva a efecto sobre aceitunas de la variedad Gordal, *Olea europaea regalis* L.. El fruto fresco procede de cuatro olivos seleccionados en la finca propiedad de la firma Agroliva S.A., ubicada en Utrera (Sevilla). El proceso de elaboración de aceitunas de mesa se realiza en las instalaciones de la misma firma comercial. Los frutos con mancha verde fueron suministrados por distintas Industrias del sector pertenecientes a la Asociación de Exportadores de Aceitunas de Mesa, (ASEMESA).

La heterogeneidad de las muestras empleadas en el presente estudio, fruto fresco, fruto sometido a fermentación y fruto con alteración de mancha verde, obliga a un tratamiento individualizado del material de partida tanto por la descripción y especificación en cada caso de sus características, como por la forma de realizar la toma de muestra.

1.- Control de pigmentos cloroplásticos y actividad clorofilasa durante el crecimiento, desarrollo y maduración de la aceituna de la variedad Gordal.

Materia prima. La modificación del color superficial de los frutos del olivo con los cambios estacionales, supone un signo evidente del grado de maduración de los mismos y que, como ocurre en la mayoría de los frutos, orienta el momento de su recolección. No obstante, la posición del fruto en el árbol tiene especial importancia ya que los que ocupan la parte central se desarrollan con más retraso que los de las regiones exteriores y las ramas situadas al Sur suelen madurar antes. Esto propicia que llegado el momento de la recolección, en un mismo árbol se puedan encontrar frutos que correspondan a toda la gama de colores que definen la maduración.

Para obviar este problema, la forma de podar y talar los olivos en la provincia de Sevilla elimina casi por completo la región central de los mismos, por lo que la mayoría de las aceitunas pueden considerarse afectadas de modo homogéneo por los agentes externos, aire, luz, lluvia, etc., al margen del conocido efecto que ejercen el suelo, clima, abonado, método de cultivo, etc., ejercen sobre la composición de las plantas.

Como en el presente estudio el interés de la investigación está orientado a determinar los cambios en el contenido y clase de pigmentos durante la maduración, se podría limitar la toma de muestra a una posición cualquiera del árbol, aunque de preferencia exterior. No obstante, al objeto de eliminar la posible influencia de la orientación, y sobre todo el agotamiento de los frutos en una determinada zona del árbol, se recogen aceitunas de todo el perímetro de cada uno de los cuatro olivos seleccionados para este estudio. Esta operación se intentó realizar siempre a la misma hora, entre las 9 y 10 de la mañana y recoger los frutos de las ramas a la altura de la mano. Con estas precauciones se pretende eliminar errores inherentes al diferente desarrollo de las ramas, orientación, etc.

En la Figura 7 se muestra cómo evoluciona el color del fruto desde el inicio de su formación en el árbol hasta su total desarrollo. Los cambios de color se suceden según la siguiente gradación en función de la dominancia del color: verde intenso, verde claro, verde amarillento, aparición de manchitas rojizas (pintona), rompiente (envero), morado y negro. Se hace notar que en los últimos estadios de la maduración los cambios ocurren de forma más rápida en el tiempo.

Toma de muestra. La experiencia se inicia a mediados del mes de Junio, momento en que el fruto es tan pequeño que prácticamente no se distingue el hueso. La toma de muestra se efectúa semanalmente cuando el fruto está verde, y diariamente o en días alternos, a partir del estado verde-amarillento. Se controla también en cada momento el peso y la humedad que presentan los frutos.

2.- Transformación de clorofilas y carotenoides durante el proceso de elaboración de aceitunas verdes de mesa al estilo español o sevillano.

Materia prima. Se emplean frutos recogidos del árbol en el estado de maduración antes del envero, oscilando su coloración entre el verde claro y el verde amarillento. Los fermentadores utilizados son de 10000 Kg de capacidad. Este sistema de elaboración en líneas generales consiste en un tratamiento inicial de los frutos con hidróxido sódico al 2% (w/v) durante unas 8-10 horas, un lavado con agua de otras 10-12 horas de duración y posterior acondicionamiento de los frutos en salmuera del 10% en NaCl. Mediante un proceso osmótico, los azúcares, vitaminas y aminoácidos del fruto pasan a la salmuera convirtiéndose

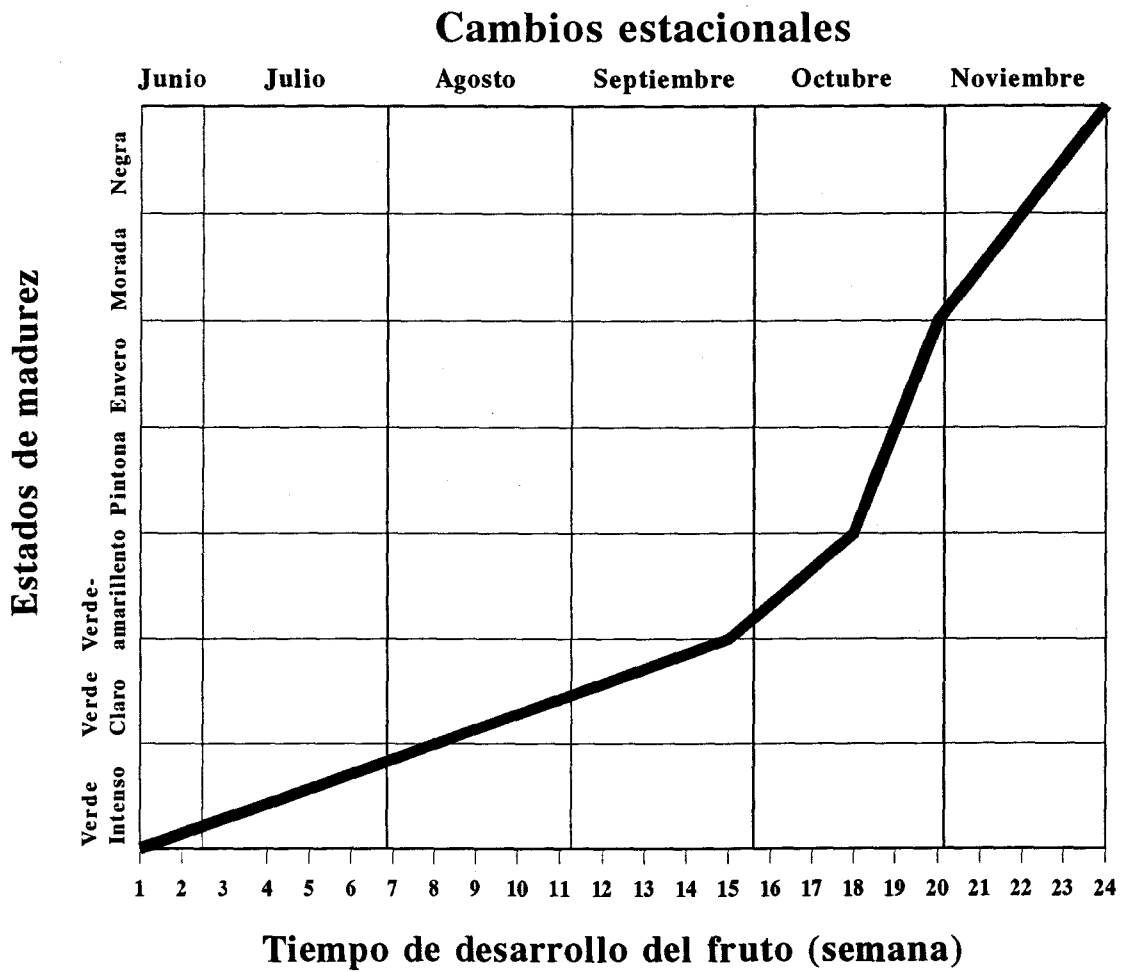


FIGURA 7: Evolución del color de las aceitunas en función de los cambios estacionales.

ésta, poco a poco, en un medio de cultivo apto para microorganismos, donde los frutos sufren una fermentación láctica (Fernández Díez et al., 1985).

La operación fundamental en el aderezo de aceitunas verdes al estilo español o sevillano, es indudablemente el tratamiento de los frutos con solución diluida de sosa cáustica. El principal objetivo de esta operación es la eliminación del glucósido amargo oleuropeína, descubierto por Bourquelot y Vintilesco en 1908. Este tratamiento ejerce sobre los frutos una acción muy compleja, siendo su consecuencia más inmediata, la permeabilidad de la piel que favorece el posterior desarrollo de una fermentación eminentemente láctica.

La operación posterior de lavado con agua es complementaria a la anterior ya que su principal objetivo es eliminar tanto el resto de hidróxido sódico que permanece adherido a la superficie de los frutos, como parte del que penetró en su interior. Así mismo, durante esta operación se eliminan los compuestos originariamente solubles en los frutos y los solubilizados en la operación anterior, como oleuropeína (Rodríguez de la Borbolla y Rejano Navarro, 1978). Existen dos formas extremas de verificar este tratamiento:

- Si el lavado es largo y enérgico elimina, como se acaba de comentar, las últimas trazas de amargor y el resto de NaOH, lo cual facilita la consecución de bajos valores de pH durante la fermentación. Sin embargo, también se eliminan en exceso componentes solubles de la aceituna, algunos de los cuales como los azúcares, son de gran importancia para la fermentación posterior.

- Cuando la aceituna se lava menos de lo conveniente, permanecen amargas durante mucho tiempo, quedando residuos excesivos de NaOH en los frutos, lo que dificulta la consecución de valores de pH aptos para una buena conservación. En contrapartida, se elimina menos cantidad de materia fermentable, lo que facilita el desarrollo de los microorganismos responsables de la fermentación.

Normalmente, se utiliza un sistema intermedio.

A continuación, los frutos se colocan en salmuera que inicialmente está constituida por NaCl y las impurezas propias del agua. Con mayor o menor rapidez, se transforma por causa de los fenómenos osmóticos, en un medio de cultivo rico y apto para el desarrollo de

microorganismos, a costa de los componentes que contiene el fruto. El orden de aparición de los microorganismos en la salmuera dependerá de sus exigencias nutritivas y así, mientras que los bacilos Gram negativos pueden crecer a las 24 horas de la colocación de las aceitunas en salmuera, los lactobacilos se desarrollan más tarde.

El NaCl produce un incremento notable en la fuerza iónica total de la solución, lo que trae consigo, a igualdad de otras circunstancias, un descenso en el valor de pH (Borbolla y Alcalá et al., 1956). La variedad Gordal, por la menor presión osmótica de su jugo celular frente a la exterior del NaCl, tiende a arrugarse en su superficie, por lo que la concentración de la sal inicial debe ser algo más baja e ir incrementándola poco a poco (Fernández Díez et al., 1985).

Toma de muestra. El estudio se efectúa durante dos años consecutivos, controlándose dos fermentadores en la primera campaña y uno en la segunda. El control de pigmentos se inicia a los tres días de la colocación de los frutos en salmuera y dura hasta el momento antes de la clasificación de los mismos para su posterior envasado, que tiene lugar al cabo de los tres meses de iniciado el proceso de fermentación. En la primera campaña, los análisis se realizan semanalmente durante el primer mes de elaboración. A partir de ese momento la toma de muestra es más distanciada en el tiempo siendo primero cada 15 días para efectuar la última pasado un mes de la anterior.

A la vista de los imprevistos resultados encontrados durante el primer año de control, sobre los cambios que se producen en la composición de pigmentos cloroplásticos durante la elaboración de los frutos, en el segundo año el análisis de clorofilas y carotenoides se realiza diariamente desde la colocación de los frutos en salmuera hasta pasados 9 días. A partir de este momento los controles se efectúan cada dos o tres días hasta que los resultados indican la casi total transformación de las clorofilas, período que tiene una duración de un mes desde la colocación de las aceitunas en salmuera. Posteriormente se toma una muestra a los 20 días y la última, al cabo de un mes de la anterior, antes de que se realice la clasificación de los frutos para su posterior envasado.

3.- Estudio de la pigmentación responsable de la alteración "Mancha verde".

Tratamiento fungicida. Experiencia de campo: Se acotan tres parcelas de olivos de la variedad Gordal en la zona de Utrera (Sevilla). A los olivos de una de las parcelas se les mantiene como testigos, sin tratamiento y a los de las restantes se los somete, de forma diferenciada a dos tratamientos fungicidas de los que se suelen emplear como prevención de plagas y cuyos componentes básicos son los siguientes:

Fungicida A: Compuesto de cobre, 37.5% + compuesto de cinc, 15%.

Fungicida B: Compuesto de cobre, 20%.

Estos productos, se utilizan en concentraciones acuosas diluidas (en torno al 0.5%), en mezcla con otras sustancias, tensioactivos, coadyuvantes, sinergistas, etc. para mejorar la solubilidad y fijación al árbol. En los tres casos, y de forma independiente, los frutos se elaboran como aceitunas verdes de mesa según procedimiento tradicional, al estilo español o sevillano descrito anteriormente.

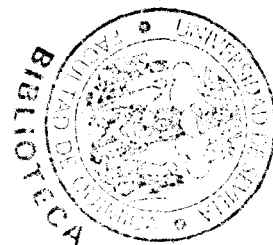
Muestras alteradas: En los frutos que presentan la alteración "Mancha verde", los análisis se realizan considerando tanto el fruto entero, como diferenciando, en una misma aceituna, la zona que presenta alteración y la que no ha sido afectada. En paralelo y como testigos, se analizan frutos elaborados que no muestran manchas verdes, pero que proceden de un fermentador con alteración, así como los correspondientes a una elaboración normal sin problemas.

II. METODOLOGIA

A. CONTROL DE PIGMENTOS.

1. Extracción de pigmentos.

1.1.- Extracto libre de materia grasa.



El análisis de clorofilas en los frutos del olivo requiere una técnica de extracción que posibilite una solución de pigmentos exenta de materia grasa. La presencia de lípidos en el extracto total de pigmentos, hecho que ocurre al emplear las técnicas usuales de extracción en el campo de clorofilas y carotenoides, interfiere el posterior estudio de identificación y cuantificación de los mismos.

Se sigue el método puesto a punto para esta finalidad por Mínguez y Garrido (1985) que se describe a continuación. Se pesan de 5 a 10 g de aceitunas deshuesadas y troceadas y se pasan rápidamente a un vaso de precipitado, que contiene unos 50 mL 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 la mezcla durante un minuto con Ultraturrax y se filtra a vacío a través de papel jarabe. El residuo sólido 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 capa superior, con ligera tonalidad amarilla, retiene lípidos y carotenos. La hipofase, correspondiente a la N,N-dimetilformamida, con el resto de pigmentos en solución, se vuelve a tratar dos veces más con hexano, para eliminar totalmente los restos de lípidos. Las tres fases de hexano reunidas se lavan con 50 mL de N,N-dimetilformamida.

A continuación la solución verde de N,N-dimetilformamida se pasa a un embudo de decantación de 1000 mL que contiene 400 mL de solución de NaCl al 10%, a una

temperatura próxima a los 0°C. Se añaden 70 mL de hexano y 70 mL de éter etílico, 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 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 los 30°C. El residuo se recoge con 5 mL de acetona.

Las fases de hexano con los lípidos y carotenos en solución se mezclan y se transfieren a 100 mL de éter etílico. Se someten a saponificación con 100 mL de hidróxido potásico al 20% en metanol a temperatura ambiente, con el objeto de hidrolizar los lípidos y purificar los carotenos. Después de dos horas se añade agua destilada para separar los jabones. La fase 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, que contienen los carotenoides hidrocarburos 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 acetona y se guarda en cámara frigorífica a -30°C hasta su utilización.

1.2.- Saponificación del extracto de pigmentos.

La identificación de carotenoides se realiza en la fracción insaponificable del extracto bruto de pigmentos totales. Ello permite partir de mayor cantidad de muestra y obtener con relativa facilidad un extracto concentrado de pigmentos, libre de clorofilas y materia grasa.

El procedimiento utilizado con estos fines consiste, en líneas generales, en un tratamiento del extracto de pigmentos con potasa alcohólica. Existen pequeñas variaciones entre los distintos métodos que da la bibliografía (Jungalwala y Cama, 1962; De la Mar y Francis, 1969; Rodríguez et al., 1973), adoptando en nuestro caso la forma operativa siguiente:

La extracción de pigmentos se realiza con acetona según el método de Smith y Benítez (1955). Se pesan 30 g de aceitunas deshuesadas, frescas o aderezadas, se trituran durante 1 min con 50 mL de acetona, se filtra, y se recoge el residuo sólido para tratarlo repetidas veces con acetona hasta agotamiento del color.

Los filtrados se recogen en un embudo de decantación de 1000 mL y se añaden 150 mL de éter etílico. Se agita y seguidamente se adiciona agua destilada hasta una separación clara de fases. La acuosa se desprecia, y la etérea con los pigmentos en solución, se lava algunas veces más con agua destilada, hasta eliminar los restos de acetona. Esta solución que contiene todos los pigmentos cloroplásticos se pasa a través de lecho de Na_2SO_4 anhidro y se concentra en rotavapor hasta sequedad.

Al extracto seco de pigmentos se le añaden 300 mL de éter etílico y se traspasan a un embudo de decantación. Se agregan entonces 300 mL de KOH en metanol al 20% y se agita fuertemente. Se repite la agitación a intervalos de unos 10 minutos, durante una hora.

Después de que la saponificación ha tenido lugar, se añade agua destilada para producir la separación de fases y el procedimiento se sigue como en el apartado anterior.

2. Separación y purificación de pigmentos por TLC.

La separación general de pigmentos se verifica sobre placas de vidrio (20 x 20 cm) revestidas en el laboratorio con gel de sílice 60 GF₂₅₄ (Merck n° 7730) y de espesor 0.7 mm. Una vez secas al aire se activan durante una hora en estufa a 120°C.

Con fines cualitativos se emplean placas flexibles de poliéster (40 x 80 mm) recubiertas de gel de sílice con indicador fluorescente UV₂₅₄, (Scharlau, S.A.) de 0.25 mm de espesor. Para la cromatografía en fase reversa se emplean placas Silicagel C₁₈ de 10 x 10 cm y 0.2 mm de espesor (Scharlau S.A.).

La cromatografía se desarrolla en cámara saturada, empleando los siguientes líquidos de desarrollo, según finalidad:

- Eter de petróleo (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1), para separación general de pigmentos (Mínguez Mosquera y Garrido Fernández, 1989).
- Metanol/acetona/agua (20:4:3) para separación de derivados clorofílicos oxidados (Mínguez Mosquera et al., 1993a).
- Hexano/piridina/dietilamina (7:1:0.5) para separación de derivados metaloclorofílicos.
- Diclorometano/acetato de etilo (4:1) para la purificación de luteína (Foppen, 1971).
- Benceno/acetona (4:1) para purificar clorofilas, violaxanteno y neoxanteno (Foppen, 1971).
- Benceno/etanol (22:1) para purificar luteoxanteno (Mínguez Mosquera y Garrido Fernández, 1986).

3. Identificación.

3.1.- Clorofilas y derivados.

3.1.1.- Obtención de patrones.

- **Clorofilas a y b.** Se aíslan de hojas frescas de espinacas mediante una extracción de pigmentos con acetona y posterior separación de los mismos por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice (Holden, 1976; Mínguez y Garrido, 1985). Así mismo clorofila a patrón es suministrada por la casa Sigma.

- **Feofitinas a y b.** Se preparan a partir de las respectivas soluciones puras de clorofilas en éter etílico, por acidificación con 2-3 gotas de HCl al 13% (v/v). Se agita la mezcla durante cinco minutos y transcurrido ese tiempo se elimina el ácido lavando con solución de Na₂SO₄ al 2%. Finalmente, la fase etérea se seca mediante filtración a través de Na₂SO₄ anhidro (Holden, 1976; Sievers e Hynninen, 1977).

- **Clorofilidas a y b.** Se obtienen mediante incubación de soluciones puras de las correspondientes clorofilas con clorofilasa, según adaptación de los métodos propuestos por

Holden (1976) y Jones et al. (1972). Como material biológico se utilizan hojas frescas de *Ailanthus altissima*, cuyo tejido está considerado como una de las fuentes más ricas de clorofilasa (McFeeters et al., 1971). El precipitado proteínico se obtiene según el método de Terpstra y Lambers (1983b). Se parte de 5 g de hojas frescas y troceadas. Se añaden 100 mL de acetona fría a -20°C y se trituran con Ultraturrax en baño de hielo picado para mantener la temperatura fría y minimizar la solubilización de la enzima. Se mantiene durante 1 min a velocidad mínima de homogeneización procurando impedir la formación de espumas que es síntoma de desnaturalización de la enzima. El residuo se recoge por filtración a vacío y se trata con la mezcla acetona/tampón clorofilasa dos veces al 80% y una al 70%. El tampón clorofilasa es tris-HCl 20 mM a pH 8 que contiene además NaCl 0.5 M y MgCl_2 10 mM. El precipitado proteínico así obtenido se deja secar a temperatura ambiente y se almacena a -20°C hasta su uso. La conversión de clorofilas a clorofilidas se realiza bajo las condiciones óptimas de activación de la enzima. La reacción se lleva a cabo en frascos de vidrio con tapón de rosca PVL, con arandela de teflón. Soluciones puras de clorofila *a* o clorofila *b* en acetona se incuban durante 24 horas a 30°C , con 0.5 g de polvo acetónico y tampón clorofilasa de forma que la concentración final de acetona sea del 50%. Una vez concluida la incubación los pigmentos se transfieren a éter etílico y se comprueba que la reacción ha sido completa mediante TLC sobre gel de sílice (Mínguez Mosquera et al., 1989).

- **Feoforbidas *a* y *b***. Pueden prepararse de forma análoga a feofitinas, por acidificación de la solución etérea de clorofilas, pero usando HCl del 30% (v/v) para provocar la hidrólisis del fitol (Hynninen, 1973), o bien por acidificación de las respectivas clorofilidas (Holden, 1976).

- **Epímeros en C_{10}** . Se forman disolviendo el correspondiente pigmento en cloroformo y manteniéndolo durante 2 h en el refrigerador (Watanabe et al., 1984).

- **Pirofeofitinas y pirofeoforbidas *a* y *b***. Se obtienen de las correspondientes feofitinas y feoforbidas por tratamiento térmico de estos compuestos en piridina, a 100°C durante 24 horas con reflujo (Schwartz et al., 1981).

- **Feofitinas y pirofeofitinas *a* y *b* de Cu**. Los complejos clorofílicos de cobre se preparan adicionando 20 mL de CuCl_2 1 M a una solución de la correspondiente feofitina en acetona (80 mL). Se añade a la mezcla en reacción cristales de ácido ascórbico para evitar

cambios oxidativos y se mantiene la quelación bajo atmósfera de N_2 durante 2 h, según describen Jones et al. (1968).

- **Feofitinas y pirofeofitinas *a* y *b* de Zn.** Se consiguen de forma similar a los complejos de cobre excepto que se añaden directamente cristales de $ZnCl_2$ (5 g) a la respectiva solución de feofitina en acetona (80 mL), y la mezcla se mantiene en agitación magnética durante 2 h (Jones et al., 1968).

- **Esteres metílicos de clorina *e_6* y rodina *g_7*.** Se preparan por saponificación de feoforbida *a* y feoforbida *b*, respectivamente, con solución de KOH al 0.5% en metanol (Hynninen, 1973).

- **Clorina *e_6* y rodina *g_7* libres.** Se obtienen a partir de sus respectivos ésteres metílicos por saponificación con solución metanólica de KOH al 30% a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno (Hynninen, 1973).

- **Mg-clorina *e_6*-fitol y Mg-rodina *g_7*-fitol.** Se forman tratando clorofila *a* o *b*, respectivamente en acetona con solución acuosa de KOH o NaOH al 0.5%. Después de 10 min de reacción se añade agua destilada y los pigmentos se transfieren a éter etílico (Mínguez y Gandul, en revisión).

- **Clorina *e_6*-fitol y rodina *g_7*-fitol.** Se preparan de manera análoga a feofitinas por acidificación de Mg-clorina *e_6*-fitol y Mg-rodina *g_7*-fitol, respectivamente.

3.1.2.- Pruebas de identificación.

La típica coloración que muestran estos compuestos en TLC bajo luz blanca y UV, así como los correspondientes valores de R_f , tanto en fase normal como reversa orientan su caracterización. La forma de los espectros de absorción electrónica, la localización y relación de los máximos en distintos disolventes y la co-cromatografía con los correspondientes patrones completan su identificación (Mínguez et al., 1989).

- Prueba para la presencia de Mg.

La solución del pigmento en éter etílico se trata con 2-3 gotas de HCl 13% y se mantiene en agitación durante 5 min (Sievers y Hynninen, 1977). Un cambio en la coloración es indicativo de la presencia de ión Mg^{2+} en el compuesto inicial. La transformación ocurrida se confirma por cromatografía y a partir del espectro de absorción.

- Prueba para la presencia de fitol.

Se determina según Bacón y Holden (1967). Para ello se incuban 3.5 mL de una solución de cada pigmento en KOH metanólica al 2.5% a 70°C durante 30 minutos. Posteriormente se enfría en hielo y se añade 0.75 mL de éter de petróleo (40-60°C), separándose las fases por adición de 5 mL de agua. El fitol se separa por TLC en silica gel GF₂₅₄ con benceno/acetato de etilo (19:1, v/v) como sistema solvente y se visualiza bajo luz UV a 254 nm.

3.2.- Carotenoides.

3.2.1.- Patrones.

Se obtienen en el laboratorio a partir de aceitunas frescas o espinacas, mediante extracción con acetona y posterior saponificación según se indica en el apartado 1.2. de la Metodología. La primera separación se lleva a cabo por TLC sobre gel de sílice usando éter de petróleo (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1). La posterior purificación de luteína, anteraxanteno, violaxanteno y neoxanteno se realiza usando los líquidos de desarrollo específicos que se indican en el punto 2. Auroxanteno y luteoxanteno se obtienen a partir de una solución pura de violaxanteno en etanol acidificando con HCl 0.1 N, transfiriendo a éter etílico y lavando con H₂O, hasta neutralidad. Neocromo y mutatoxanteno se obtienen siguiendo el mismo procedimiento a partir de neoxanteno y anteraxanteno, respectivamente (Khachic et al., 1986). β -caroteno patrón es así mismo suministrado por la casa Roche.

3.2.2.- Pruebas específicas para la caracterización de grupos funcionales.

Se identifican inicialmente teniendo en cuenta sus propiedades de adsorción, color y posición en la placa de cromatografía en capa fina así como la co-cromatografía con patrones puros. Las características espectrales que muestran, tanto en el visible como en el ultravioleta, en distintos disolventes, son contrastadas con las suministradas en la bibliografía (Foppen, 1971; Davies, 1976). Para la caracterización de grupos funcionales, se ensayan distintas reacciones químicas específicas que se describen a continuación (Jungalwala, 1962; Stobart et al., 1967; Davies et al., 1970; Davies, 1976; Bucke y Rahman, 1979).

- Espectro I.R..

El componente puro, disuelto en éter etílico, se seca y se mezcla con 0.3 g de KBr en un mortero de ágata hasta homogeneización total, se prensa para obtener la pastilla y a continuación se obtiene el espectro correspondiente. Esta técnica es útil principalmente para detectar grupos funcionales especiales como acetilénicos, alénicos, hidroxilos o cetónicos no reactivos.

- Prueba para los 5,6 epóxidos.

Los pigmentos con grupos 5,6-epóxidos en su molécula en medio ácido se transforman en 5,8-epóxidos, lo cual implica un cambio del color que muestran en solución y una modificación en la localización de los máximos en el espectro de absorción. En solución etanólica, al añadir unas gotas de HCl 0.1 N en la misma cubeta espectrofotométrica, los máximos del espectro de absorción experimentan un desplazamiento hipsocrómico de 15-20 nm si se trata de un grupo epóxido y de 35-40 nm si están presentes dos grupos epóxidos. En solución etérea la adición de HCl acuoso al 20% provoca un cambio de color, de amarillo a azul, en los carotenoides con grupos 5,6- ó 5,8-epóxidos. Por último en una mezcla de éter etílico/metanol/HCl concentrado (10:9:1) las xantofilas monoepóxidos se tornan a amarillo-verdoso y los diepóxidos a verdes-azulados.

Esta reacción ácida también se puede llevar a cabo en la placa de cromatografía. Una vez desarrollado el cromatograma se expone el pigmento 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 con dos grupos hidroxilos exclusivamente, adquieren un color marrón bordeado de verde. Los demás carotenoides, o no cambian de color o pasan a marrón.

- Prueba para los grupos carbonilos.

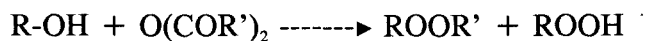
Se emplea la reacción de reducción a alcoholes con hidruros metálicos como LiAlH_4 ó NaBH_4 que actúan como fuente del agente reductor ión hidruro. El LiAlH_4 es un agente reductor mucho más fuerte, que reduce no sólo aldehidos y cetonas, sino también ácidos, ésteres y otros grupos funcionales polares.



A una solución del pigmento en etanol del 95%, se le añaden algunos cristales de NaBH_4 y se mantiene en refrigerador y oscuridad 3 h. Pasado este tiempo se transfiere el pigmento a éter etílico. La reducción se manifiesta en el espectro de absorción por un descenso en la absorbancia (intensidad de color), un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción, y un cambio notable en la forma del espectro.

- Prueba para los grupos hidroxilos (acetilación).

Los alcoholes se convierten en ésteres por reacción con los ácidos carboxílicos o con los cloruros de ácido. A una solución de pigmentos en 2 mL de piridina se le añaden 0.2 mL de anhídrido acético. Se deja reaccionar toda la noche y la reacción se corta añadiendo agua y transfiriendo a éter de petróleo. El número de ésteres que se forman, según que los alcoholes sean simétricos o no, se examinan por TLC ó HPLC.



La presencia de un sólo grupo hidroxilo da lugar a un único derivado acetilado. Si están presentes dos grupos hidroxilos el resultado es un derivado diacetilado y uno o dos derivados monoacetilados, dependiendo de que los grupos hidroxilos sean o no simétricos.

4. Cuantificación.

4.1.- Separación e identificación por HPLC.

Se utiliza el método puesto a punto por Mínguez et al., (1991c). El extracto de pigmentos, libre de materia grasa y disuelto en acetona, se filtra a través de una membrana de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro o se centrifuga en conos "Eppendorf". La separación se lleva a cabo en una columna C_{18} de fase reversa (Spherisorb ODS-2), de 25 cm de longitud, 4 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula. La columna va protegida con una precolumna de 3 cm x 4 mm empaquetada con el mismo material. Los eluentes usados fueron A: agua/reactivo de pares iónicos/metanol (1:1:8, v/v) y B: acetona/metanol (1:1, v/v). El reactivo de pares iónicos consiste en una solución de tetrabutilamonio (0.05 M) y acetato de amonio (1 M) en agua. Para evitar el deterioro de las partículas de sílice por el reactivo iónico, la columna se almacena en metanol/agua (1:1, v/v) después de su uso. La muestra inyectada (20 μL) se eluye a una velocidad de flujo de 2 mL/min, siguiendo el esquema de gradiente siguiente:

Tiempo (min)	% A	% B	Curva
Inicial	75	25	
8	25	75	Lineal (6)
10	25	75	Isocrática
18	10	90	Convexa (4)
23	0	100	Cóncava (10)
30	75	25	Cóncava (10)

Los números entre paréntesis corresponden al tipo de curva incluida en el programa del cromatógrafo líquido Water 600 E. La detección se realiza a 430 nm usando un detector de diodos programable.

La identificación de los picos se lleva a cabo comparando los espectros de absorción y sus tiempos de retención y factores de capacidad con los de los respectivos patrones. El factor de capacidad k se define como $k = (t_r - t_m)/t_m$ donde t_r es el tiempo de retención de cada componente y t_m el tiempo que tarda en eluir el disolvente no retenido.

4.2.- Cuantificación por HPLC.

La operación lenta y laboriosa de obtención de patrones de carotenoides y derivados clorofílicos en el laboratorio, unido a la incierta conservación de sus mezclas patrones debido a la sensibilidad de estos pigmentos a la luz, temperatura, etc., limitan las posibilidades de utilizar el método de cuantificación de patrón interno. Las clorofilas se degradan muy fácilmente a feofitinas cambiando totalmente sus características espectrofotométricas y, como consecuencia, en un pequeño intervalo de tiempo se pierde la certeza de que la concentración de la mezcla patrón sea la inicialmente medida. Este hecho obliga a la preparación continua de pigmentos puros, alargando excesivamente el tiempo de análisis. Para salvar esta complicación, lo más aconsejable es utilizar otra sistemática que estima las concentraciones de los componentes a partir de una extensión de la ley de Lamber-Beer, adaptada a sistemas no homogéneos (Torsi et al., 1992) y que se rige por la ecuación:

$$N_o = A_i F / \epsilon_\lambda L 10^3 \quad (1)$$

donde:

N_o = número de moles por cm^2

A_i = absorbancia \times tiempo (min)

F = velocidad de flujo (cm^3/min)

ϵ_λ = absortividad molar a la λ de detección

L = longitud de la celda (nm), que es específica de cada detector.

Haciendo las conversiones de unidades pertinentes y en el caso particular de $L = 10$ nm, tenemos:

$$N_o = A F 10^4 / \epsilon_\lambda \quad (2)$$

y para expresar la concentración de la muestra en mg/Kg de material biológico, la ecuación final que resulta es:

$$C = (A F V_f 10^{10}) / (E_{\lambda}^{\%} V_i pm) \quad (3)$$

C = concentración (mg/Kg).

A = área de pico (absorbancia × min).

F = velocidad de flujo (mL/min).

V_f = volumen en el que se recoge el extracto (mL).

E_λ[%] = absortividad específica a la longitud de onda de detección (absorbancia a la longitud onda λ que presenta 1 g de producto disuelto en 100 mL).

V_i = volumen de muestra inyectada en el cromatógrafo (mL).

pm = peso de muestra (g).

Los valores de E_λ[%] (que se muestran en la Tabla I) se calculan a partir del espectro de absorción obtenido con el detector para cada pigmento y de los valores de E_{λ_{max}}[%] que da la bibliografía (Wright y Shearer, 1984; Mínguez et al., 1991c). Para una concentración dada se cumple que:

$$C = E_{\lambda} / E_{\lambda}^{\%} = E_{\lambda_{max}} / E_{\lambda_{max}}^{\%}$$

Sin embargo, en la práctica pueden ocurrir ciertas variaciones en la sensibilidad instrumental (deterioro de la lámpara, cambios en el índice de refracción con el gradiente de elución, etc.) que afectan a la absorción de la luz y que repercuten por tanto en la cuantificación. Para controlar estos cambios, se multiplica la ecuación (3) por un factor de corrección (F_c) que se obtiene a partir de las rectas de calibrado de β-caroteno patrón en el caso de carotenoides (F_c = 0.850) y de clorofila a, para los derivados clorofílicos (F_c = 1.095).

La concentración de β-caroteno se mide directamente en hexano a partir del espectro de absorción. El valor de la extinción E, a la longitud de onda de máxima absorción, se sustituye en la ecuación:

$$E = E^{\%} \times c$$

TABLA I. Coeficientes de absorción electrónica en la mezcla eluente empleada en HPLC, correspondientes a los pigmentos clorofílicos y carotenoides identificados en las distintas muestras de aceitunas.

Pigmentos Clorofílicos	E₀430nm	E₀410nm	Pigmentos Carotenoides	E₀430nm
Clorofila <i>a</i>	840		β -caroteno	1844
Clorofila <i>b</i>	356		Luteína	1777
Clorofilida <i>a</i>	1220		Violaxanteno	1909
Clorofilida <i>b</i>	514		Neoxanteno	1353
Feofitina <i>a</i>	268	1290	Anteraxanteno	2023
Feofitina <i>b</i>	1545		Luteoxanteno	1440
Feofofbida <i>a</i>	394	1896	Auroxanteno	1709
Feofofbida <i>b</i>	2254		Mutatoxanteno	2193
Pirofeofitina <i>a</i>	287	1382	Neocromo	1751
Pirofeofitina <i>b</i>	1653			
Pirofeoforbida <i>a</i>	437	2102		
Pirofeoforbida <i>b</i>	2492			
Mg-clorina <i>e</i> ₆ -fitol	166	747		
Mg-rodina <i>g</i> ₇ -fitol	879			
Clorina <i>e</i> ₆ -fitol	131	848		
Rodina <i>g</i> ₇ -fitol	1907			
Feofitina <i>a</i> -Cu	647	765		
Pirofeofitina <i>a</i> -Cu	689	816		
Clorina <i>e</i> ₆ -fitol-Cu	53	916		

Donde $E^{1\%}$ es la absorbancia específica de una solución al 1% (1 g en 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:

$$C = (E \times V_f / E^{1\%} \times pm) \times 10000$$

C = concentración (mg/Kg).

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

pm = peso de muestra (g).

El coeficiente de extinción específico en hexano ($E_{450}^{1\%} = 2592$) se calcula a partir de los que da la bibliografía en otros disolventes (Davies, 1976).

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.

B. ACTIVIDAD CLOROFILASA

1.- Preparación del precipitado proteínico.

El método utilizado es una adaptación del que emplean Terpstra y Lambers (1983b). Se parte de 25 g de frutos deshuesados y troceados que se trituran con 500 mL de acetona a -20°C , siguiendo las precauciones de temperatura y velocidad de homogeneización anteriormente mencionadas en el apartado de preparación de clorofilidas por desesterificación enzimática. Después de macerar durante 15 min en congelador a -20°C , se retira el sobrenadante por decantación y el residuo se trata de nuevo con 200 mL de acetona. La operación se repite hasta que el sobrenadante no tiene color, generalmente 4 lavados son suficientes. Finalmente el precipitado se recoge por filtración a vacío y se deja secar a temperatura ambiente.

2.- Extracción de la enzima del precipitado proteínico.

El polvo de acetona (1 g) se extrae con 30 mL de tampón fosfato 5 mM, pH 7, que contiene KCl 50 mM y 0.24% de Tritón X-100, con agitación magnética durante 1 h a 30°C. El extracto se filtra a través de 4 capas de gasa y el filtrado se centrifuga a 12.000 g durante 10 min. El sobrenadante se usa como extracto crudo enzimático.

3.- Preparación de los sustratos.

Se emplean soluciones en acetona de clorofila *a* o clorofila *b* aisladas de hojas frescas de espinaca y que previamente han sido purificadas por TLC en silicagel GF₂₅₄ con el líquido de desarrollo éter de petróleo (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1).

4.- Reacción enzimática.

La mezcla de reacción contiene 0.1 μ mol de sustrato disuelto en acetona, bufer Tris 100 mM a pH 8.5 que contiene 0.24% de Tritón X-100, y el extracto crudo de clorofilasa en una relación de 1:5:5 (volumen total de 1.1 mL). La reacción se realiza en conos "Eppendorf" en un baño termostático a 40°C y bajo luz verde durante 5 horas. Una vez finalizada la incubación, se para la reacción congelando la mezcla a -20°C hasta su análisis. La mezcla se centrifuga a 13 000 g durante 5 min y se inyecta una alícuota del sobrenadante en el cromatógrafo líquido Waters 600 E para la cuantificación del producto. El sistema de elución en gradiente permite separar y cuantificar el producto formado (clorofilida) y el sustrato que no ha reaccionado (clorofila). La unidad de actividad, el catal, se define como la cantidad de enzima que se necesita para hidrolizar 1 mol de sustrato por segundo. La actividad específica se expresa como unidad de actividad por Kg de polvo acetónico.

C. DETERMINACION DE COBRE Y ZINC EN CENIZAS.

Los frutos, lavados y secos, se deshuesan y trituran con agua desionizada en proporción 1:1 (w/v) hasta conseguir una papilla homogénea. Veinte gramos de dicha papilla, pesados

con exactitud, se llevan a sequedad en cápsula de porcelana y tras añadir 2 mL de disolución de $Mg(NO_3)_2$ al 5% (w/v) en etanol se calcinan a 450°C durante 8 horas, tras lo cual las cenizas resultantes se blanquean, si es necesario, con 2 mL de HNO_3 concentrado. Las cenizas obtenidas se disuelven con dos porciones de 2 mL de HCl 6 N caliente y se filtran a vacío enrasando a 25 mL con agua desionizada.

La determinación de cobre y zinc se realiza mediante el espectrofotómetro de absorción atómica nebulizando la muestra en una llama aire/acetileno y utilizando una lámpara de cátodo hueco de cobre y zinc. La absorbancia se mide a 324.7 nm para cobre y 213.9 nm para zinc, con un Slit de 0.7 nm en ambos casos.

III. APARATOS UTILIZADOS.

- Aparato para la elaboración de placas de TLC Southern, Mod. Unoplen.
- Baño termostático con agitación Unitronic-320, Selecta.
- Centrífuga refrigerada Sorvall, Mod. RC-5.
- Centrífuga MSE, Mod. Micro-centaur.
- Cromatógrafo líquido Waters 600 E provisto de detector de fotodiodos array Waters 994 y printer-plotter Waters 5200.
- Deshuesador de aceitunas.
- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer, Mod. 2380.
- Espectrofotómetro FT-IR Varian, Mod. FTS-7.
- Espectrofotómetro UV/Vis Hewlett Packard, Mod. 8452 A, con computador HP 9000 serie 300, provisto de printer HP 2225 y registrador 7550 A.
- Homogeneizador "Politron", Ultraturrax Y25 Janke Kunkel Ika-Labortechnik.
- Lámpara Desaga UV/Vis, provista de luz blanca y ultravioleta UV_{254,366}.
- Liofilizador General.
- Rotavapor Büchi, Mod. R 110.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. IDENTIFICACION DE PIGMENTOS.

En la Tabla II se ofrecen las características del cromatograma obtenido en capa fina al desarrollar en paralelo, extractos de pigmentos libres de materia grasa a los que se les ha añadido el β -caroteno recuperado de la fase de hexano por saponificación, y correspondientes a: a) fruto fresco, b) fruto a los 4 días de su colocación en salmuera, c) fruto al final del proceso y d) fruto elaborado que presenta la alteración "Mancha verde". Las condiciones de separación utilizadas son placas de silicagel 60 GF₂₅₄ y líquido de desarrollo éter de petróleo (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1). Las bandas se enumeran del 1 al 15, según el valor decreciente de R_f que muestran en la placa cromatográfica y, así mismo, se incluye el color que presentan los distintos compuestos bajo luz blanca y UV.

Cada banda, separada en las condiciones anteriormente mencionadas, se raspa de la placa cromatográfica y eluye con acetona o la mezcla acetona/piridina (1:1), según la polaridad que presenta cada compuesto, y se inyecta una alícuota en el cromatógrafo de HPLC para comprobar su pureza. Mediante esta técnica de mayor resolución que la TLC, se comprueba que la mayoría de los compuestos se separan puros, aunque en cada caso están presentes dos o más isómeros representando generalmente el mayoritario más del 90%. La identificación de los isómeros se realiza, para carotenoides, en base al espectro de absorción electrónica en el eluyente que suministra el detector de fotodiodos-array y, en el caso de la fracción clorofílica, la confirmación se verifica mediante la comparación de los tiempos de retención con los mostrados por el correspondiente patrón preparado según Watanabe (1984).

En función del momento de la fermentación, las bandas n° 10 y n° 15 están formadas por más de un compuesto. En estos casos la solución de pigmentos correspondiente se vuelve a cromatografiar en TLC variando, según la localización de la banda en el cromatograma, el tipo de soporte y condiciones de elución hasta conseguir la separación individual de cada componente. La separación de pigmentos que conforman la banda n° 10, se consigue utilizando como soporte sílicagel y como líquido de desarrollo, benceno/etanol (22:1) ó diclorometano/ acetato de etilo (4:1), como se observa en la Tabla III. En la Tabla IV se muestran los valores de R_f y color de los compuestos que forman la banda n° 15, separados por TLC en fase reversa con placas de silicagel C₁₈ y la mezcla metanol/acetona/agua (20:4:3) como eluyente.

TABLA II. Características del cromatograma obtenido en TLC correspondiente a: fruto fresco, a los 4 días de su colocación en salmuera, fruto al final del proceso, y fruto elaborado que presenta la alteración "Mancha verde".

Banda n°	R _f	Fruto fresco	Fruto elaborado			Color en placa	
			Inicio fermentación	Final fermentación	Fruto con MV ^{b)}	Luz blanca	Luz UV
1	1.00	+++	+++	+++	+++	Amarillo-naranja	-
2	0.72	-	-	-	+	Azul	-
3	0.69	-	-	+	+	Gris	Fluorescencia fresa
4	0.63	-	-	+	+	Gris	Fluorescencia fresa
5	0.57	-	-	++++	++++	Gris	Fluorescencia fresa
6	0.53	-	-	+++	+++	Marrón-verdoso	Fluorescencia fresa
7	0.51	+++++	++++	-	-	Verde-azulado	Fluorescencia fresa
8	0.49	-	-	+	+	Marrón-verdoso	Fluorescencia fresa
9	0.44	+++++	+++	-	-	Verde-amarillento	Fluorescencia fresa
10	0.41	+++	+++	+++ ^{a)}	+++ ^{a)}	Amarillo-naranja	-
11	0.35	+	+	-	-	Amarillo	-
12	0.28	++	++	-	-	Amarillo	-
13	0.19	-	-	+	+	Amarillo	-
14	0.15	++	++	-	-	Amarillo-limón	-
15	0.00	-	+++ ^{a)}	+++ ^{a)}	+++ ^{a)}	Verde-grisáceo	Fluorescencia fresa

Soporte cromatográfico: Silicagel GF₂₅₄

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

a) Mezcla de compuestos.

b) Solapamiento entre las bandas 2-4.

TABLA III. Características del cromatograma obtenido en TLC para la separación de compuestos de la banda nº 10.

Banda nº	R_f^a	R_f^b	Fruto elaborado			Color en placa	
			Inicio fermentación	A los 12 días de colocación en salmuera	Final fermentación	Luz blanca	Luz UV
10.1	0.42	0.35	+++	+++	+++	Amarillo-naranja	-
10.2	0.39	-	-	+	-	Amarillo	-
10.3	-	0.26	-	-	+	Amarillo	-
10.4	-	0.12	-	-	+	Amarillo	-

Soporte cromatográfico: Silicagel GF₂₅₄

Líquidos de desarrollo: a) benceno/etanol (22:1)

b) diclorometano/acetato de etilo (4:1)

TABLA IV. Características del cromatograma obtenido en TLC para la separación de compuestos de la banda nº 15.

Banda nº	R _f	Fruto elaborado		Color en placa	
		Inicio fermentación	Final fermentación	Luz blanca	Luz UV
15.1	0.75	-	+	Marrón-verdoso	Fluorescencia fresa
15.2	0.69	-	+	Gris	Fluorescencia fresa
15.3	0.58	-	+	Gris	Fluorescencia fresa
15.4	0.36	+	-	Verde-marrón	Fluorescencia rosa
15.5	0.30	++	-	Verde-azulado	Fluorescencia rosa
15.6	0.28	-	+	Marrón-verdoso	Fluorescencia fresa
15.7	0.23	-	++	Gris	Fluorescencia fresa
15.8 ^{a)}	0.12	-	-	Azul	-

a) Pigmento presente únicamente en frutos con "mancha verde".

Para el conjunto de bandas solapadas, que en el extracto de pigmentos de frutos con "mancha verde" se sitúan en la zona comprendida entre los valores de R_f 0.49 a 0.63, se sigue análogo proceder. En este caso la separación de los compuestos, que se indican en la Tabla V, se consigue al emplear placas de silicagel 60 GF₂₅₄ y la mezcla solvente hexano/piridina/dietilamina (7:1:0.5).

En las Tablas VI y VII se recogen los valores de longitud de onda de máxima absorción, después de obtener el respectivo espectro de absorción electrónica de cada pigmento puro en distintos disolventes. Así mismo, se incluyen los resultados de las pruebas realizadas para determinar la presencia de Mg y fitol en los pigmentos clorofílicos, así como el de las específicas para la caracterización de los grupos funcionales de los compuestos carotenoides. En las Figuras 8 y 9 se muestra a título ilustrativo, el espectro de absorción de algunos de los compuestos más característicos.

La recopilación de todos los resultados (comportamiento cromatográfico, color en placa bajo luz blanca y UV, máximos de absorción y relación de picos en los espectros de absorción UV_{vis}, pruebas químicas específicas y de grupos funcionales, etc.), junto con la co-cromatografía de cada compuesto con el respectivo patrón, permiten la identificación de los pigmentos cuyas estructuras se muestran en las Tablas VIII y IX. En el caso particular de los distintos compuestos clorofílicos que poseen en su estructura el anillo isocíclico del tipo 3 (clorinas *e*₆ y rodinas *g*₇), la identificación se hace tentativa. Al no existir patrones comerciales, son necesarias pruebas complementarias que ayuden a confirmar su estructura molecular.

TABLA V. Características del cromatograma obtenido en TLC para la separación de compuestos del conjunto de bandas solapadas en la zona comprendida entre los valores de R_f 0.49 a 0.63, en el desarrollo cromatográfico standar del extracto de pigmentos de frutos con "mancha verde".

Banda n°	R_f	Color en placa		Pigmento identificado
		Luz blanca	Luz UV	
A	0.47	Gris	Fluorescencia fresa	Pirofeofitina <i>a</i>
B	0.44	Verde	Mancha oscura	Pirofeofitina <i>a</i> -Cu
C	0.40	Gris	Fluorescencia fresa	Feofitina <i>a</i>
D	0.36	Verde	Mancha oscura	Feofitina <i>a</i> -Cu
E	0.26	Marrón-verdoso	Fluorescencia fresa	Feofitina <i>b</i>
F	0.24	Marrón-verdoso	Fluorescencia fresa	Ester de rodina <i>g</i> ₇ -fitol

Soporte cromatográfico: Silicagel GF₂₅₄

Líquido de desarrollo: hexano/piridina/dietilamina (7:1:0.5)

TABLA VI. Características espectroscópicas en distintos disolventes y resultados de las pruebas químicas realizadas para la identificación de clorofilas y derivados.

Máximos de absorción (nm) ^{a)}		Presencia de Fitol	Presencia de Mg (Tratamiento con HCl)	Pigmento identificado
Eter etílico	Acetona			
(382),(412),430,533,578,615,662	(384),(412),430,536,580,616,662	+	+	Clorofila <i>a</i>
(430),455,549,595,644	(430),456,595,646	+	+	Clorofila <i>b</i>
408,471,505,534,609,667	408,466,504,534,554,608,666	+	-	Feofitina <i>a</i>
(412),434,525,555,599,655	(412),430,523,602,656	+	-	Feofitina <i>b</i>
408,471,505,534,609,667	408,466,504,534,554,608,666	+	-	Pirofeofitina <i>a</i>
	416,524,600,642	+	+	Mg-clorina <i>e</i> ₆ -fitol
	(422),444,575,624	+	+	Mg-rodina <i>g</i> ₇ -fitol
400,500,530,560,610,666		+	-	Clorina <i>e</i> ₆ -fitol
427,524,560,597,652		+	-	Rodina <i>g</i> ₇ -fitol
400,500,530,560,610,666		+	-	Ester de clorina <i>e</i> ₆ -fitol
427,524,560,597,652		+	-	Ester de rodina <i>g</i> ₇ -fitol
	400,422,546,602,650	+	-	Feofitina <i>a</i> -Cu
	400,422,546,602,650	+	-	Pirofeofitina <i>a</i> -Cu
(394),408,500,584,628		+	-	Clorina <i>e</i> ₆ -fitol-Cu
(394),408,500,584,628		+	-	Ester de clorina <i>e</i> ₆ -fitol-Cu
Acetona/Piridina (1:1)				
412,470,506,536,610,668	406,466,504,534,608,666	-	-	Feoforbida <i>a</i>
(418),438,526,556,600,656	(412),430,523,602,656	-	-	Feoforbida <i>b</i>
412,470,506,536,610,668	406,466,504,534,608,666	-	-	Pirofeoforbida <i>a</i>

a) Los máximos entre paréntesis son puntos de inflexión.

Clorofilas y carotenoides en aceitunas de la variedad Gordal ...

TABLA VII. Características espectroscópicas en distintos disolventes y resultados de las pruebas químicas realizadas para la identificación de carotenoides.

Máximos de absorción (nm) ^{a)}			Espectro de infrarrojo (FT-IR)		Prueba de epóxidos (tratamiento con HCl)		Pigmento identificado
Eter de petróleo	Etanol	Cloroformo	Grupo -OH	Grupo -C=O	Desplazamiento hipsocrómico en EtOH (nm)	Color en placa	
(426),444,470	(426),448,476	(434),458,482	-	-	0	Amarillo	<i>β</i> -caroteno
418,442,472	426,454,482	430,454,482	+	-	0	Marrón con borde verde	Luteína
400,420,446	404,428,454		+	-	20	Azul	Luteoxanteno
380,400,422	380,402,428	388,410,436	+	-	0	Azul	Auroxanteno
(405),426,456	(406),427,457	(417),437,468	+	-	0	Azul verdoso	Mutatoxanteno
(423),444,473	(421),443,473	(438),461,491	+	-	20	Azul verdoso	Anteraxanteno
414,436,466	418,440,468	422,446,476	+	-	40	Azul	Violaxanteno
399,418,446		402,426,454	+	-	0	Azul verdoso	Neocromo
410,436,466	412,434,464	420,444,476	+	-	14	Azul verdoso	Neoxanteno

a) Los máximos entre paréntesis son puntos de inflexión.

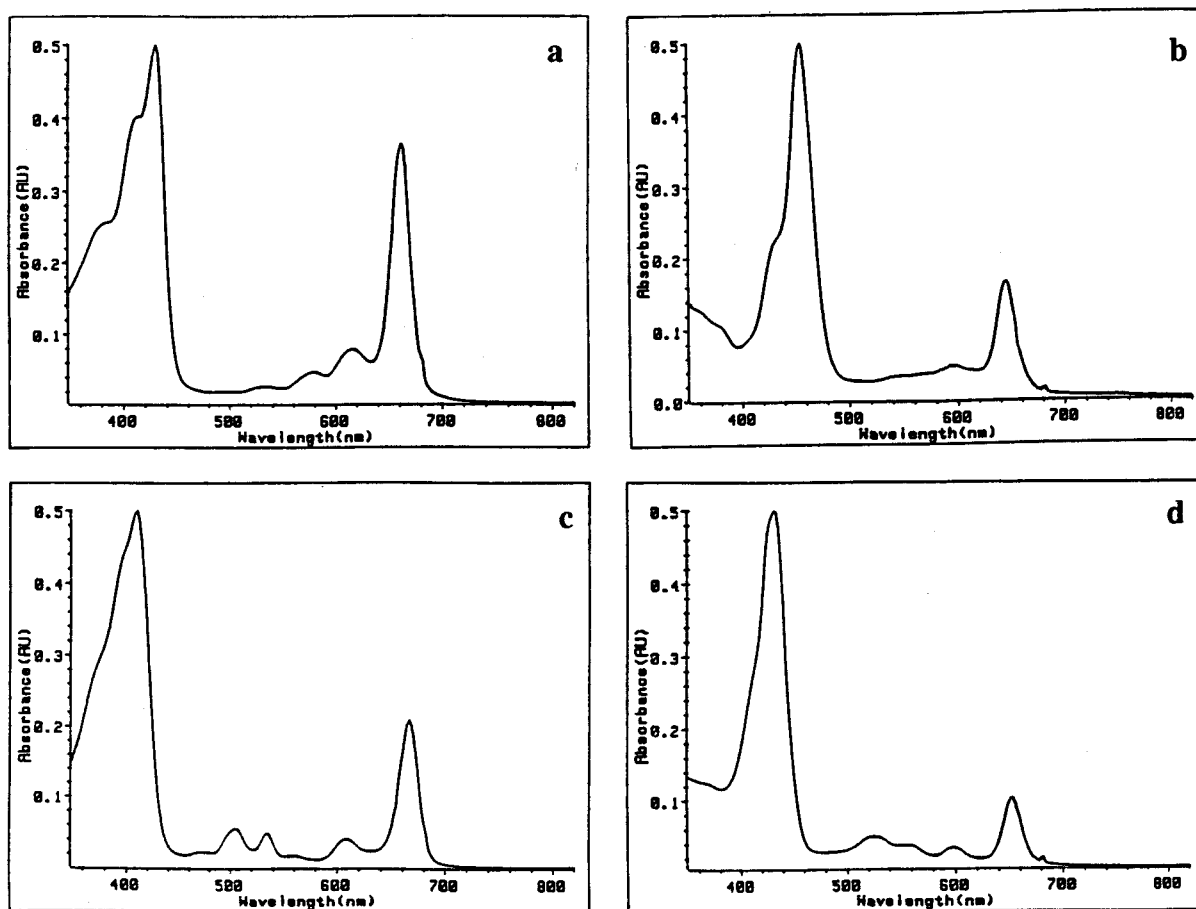


FIGURA 8: Espectro de absorción electrónica en acetona de: a) clorofila *a*, b) clorofila *b*, c) feofitina *a* y d) feofitina *b*.

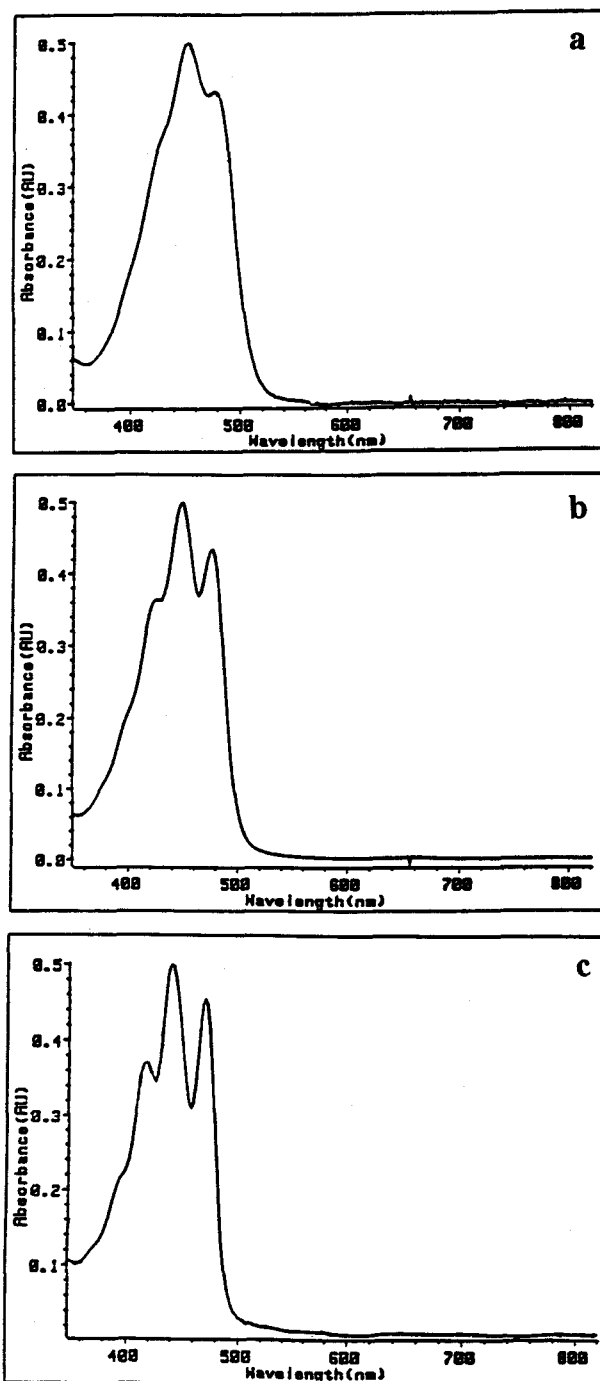
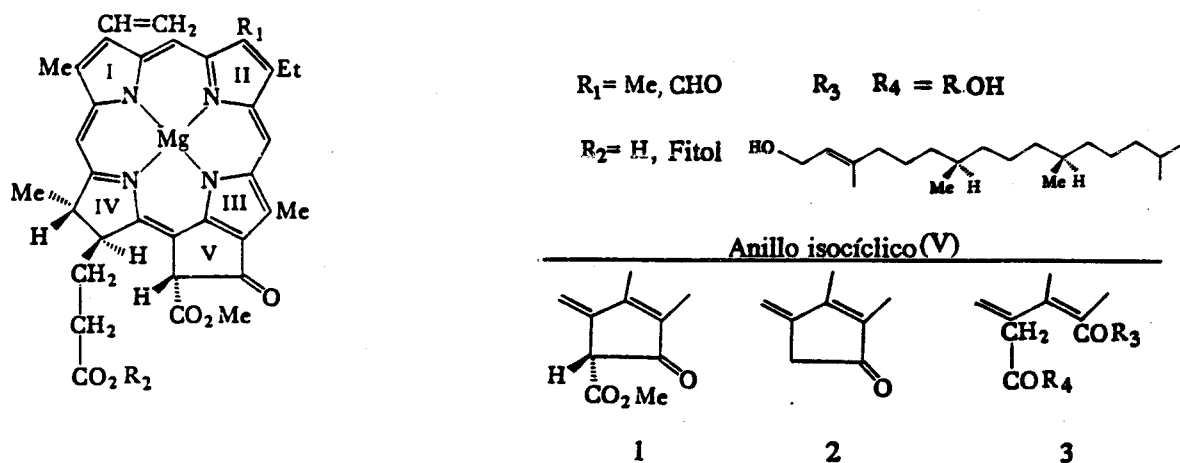


FIGURA 9: Espectro de absorción electrónica en acetona de: a) β -caroteno, b) luteína y c) violaxanteno.

TABLA VIII. Estructura de clorofilas y derivados identificados.



Estructura básica

Pigmento	Mg ^{a)}	R ₁	R ₂	Anillo isocíclico (V)	Banda n ^o
Clorofila <i>a</i>	+	Me	Fitol	1	7
Clorofila <i>b</i>	+	CHO	Fitol	1	9
Feofitina <i>a</i>	-	Me	Fitol	1	5
Feofitina <i>b</i>	-	CHO	Fitol	1	6
Pirofeofitina <i>a</i>	-	Me	Fitol	2	4
Feoforbida <i>a</i>	-	Me	H	1	15.2
Feoforbida <i>b</i>	-	CHO	H	1	15.1
Pirofeoforbida <i>a</i>	-	Me	H	2	15.3
Mg-clorina <i>e</i> ₆ -fitol	+	Me	Fitol	3 (R ₃ ,R ₄ =OH)	15.5
Mg-rodina <i>g</i> ₇ -fitol	+	CHO	Fitol	3 (R ₃ ,R ₄ =OH)	15.4
Clorina <i>e</i> ₆ -fitol	-	Me	Fitol	3 (R ₃ ,R ₄ =OH)	15.7
Rodina <i>g</i> ₇ -fitol	-	CHO	Fitol	3 (R ₃ ,R ₄ =OH)	15.6
Ester de clorina <i>e</i> ₆ -fitol	-	Me	Fitol	3 (R ₃ ,R ₄ =OR)	3
Ester de rodina <i>g</i> ₇ -fitol	-	CHO	Fitol	3 (R ₃ ,R ₄ =OR)	8
Feofitina <i>a</i> -Cu	-	Me	Fitol	1	D
Pirofeofitina <i>a</i> -Cu	-	Me	Fitol	2	B
Clorina <i>e</i> ₆ -fitol-Cu	-	Me	Fitol	3 (R ₃ ,R ₄ =OH)	15.8
Ester de clorina <i>e</i> ₆ -fitol-Cu	-	Me	Fitol	3 (R ₃ ,R ₄ =OR)	2

a) En Feofitinas, Pirofeofitina, Feoforbidas y Pirofeoforbida, Mg es reemplazado por 2H, y en los complejos cúpricos por Cu.

TABLA IX. Estructura de los pigmentos carotenoides identificados.

Banda nº	Pigmento identificado	Nombre sistemático	Estructura
1	<i>β</i> -caroteno	<i>β,β</i> -caroteno	
10.1	Luteína	<i>β,ε</i> -caroteno-3,3'-diol	
10.2	Luteoxanteno	5,6,5',8'-diepoxi-5,6,5',8'-tetrahidro- <i>β,β</i> -caroteno-3,3'-diol	
10.3	Auroxanteno	5,8,5',8'-diepoxi-5,8,5',8'-tetrahidro- <i>β,β</i> -caroteno-3,3'-diol	
10.4	Mutatoxanteno	5,8-epoxi-5,8-dihidro- <i>β,β</i> -caroteno-3,3'-diol	
11	Anteraxanteno	5,6-epoxi-5,6-dihidro- <i>β,β</i> -caroteno-3,3'-diol	
12	Violaxanteno	5,6,5',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro- <i>β,β</i> -caroteno-3,3'-diol	
13	Neocromo	5',8'-epoxi-6,7-didehidro-5,6,5',8'-tetrahidro- <i>β,β</i> -caroteno-3,5,3'-triol	
14	Neoxanteno	5',6'-epoxi-6,7-didehidro-5,6,5',6'-tetrahidro- <i>β,β</i> -caroteno-3,5,3'-triol	

II. EVOLUCION DE CLOROFILAS Y CAROTENOIDES DURANTE EL PROCESO DE CRECIMIENTO, DESARROLLO Y MADURACION DE LOS FRUTOS.

1.- Cambios en la composición de pigmentos.

En la Figura 10 se muestra a título de ejemplo, el cromatograma de HPLC al que responden los pigmentos presentes en los frutos durante todo el ciclo de la maduración. Por orden de elución son: neoxanteno, violaxanteno, anteraxanteno, luteína, clorofila *b*, clorofila *a* y β -caroteno. Ello evidencia que desde el punto de vista cualitativo la composición clorofílica y carotenoide de los frutos no varía con el progreso de la maduración.

En la Tabla X se muestra la concentración individual de pigmentos en los frutos, en distintas etapas de la maduración. Así mismo se incluye, en cada etapa, el valor medio total de clorofilas y carotenoides que poseen los frutos. Al margen del estado de la maduración, el pigmento mayoritario siempre es clorofila *a* seguido por clorofila *b*. Como componentes de la fracción carotenoide luteína destaca como el principal pigmento amarillo, seguido por β -caroteno y en inferior proporción neoxanteno, violaxanteno y, muy minoritariamente, anteraxanteno. En líneas generales, tanto la concentración de clorofilas, como la de la fracción carotenoide, sigue una pauta paralela, experimentando un descenso progresivo a medida que avanza la fecha de recolección. Ambas familias de pigmentos tienden a desaparecer al alcanzar los frutos la plena madurez, dando paso a los componentes antocianínicos que comienzan a manifestarse como pequeñas manchitas rojizas en la piel y que poco a poco, llegan a cubrir toda la superficie del fruto para, posteriormente, teñir de rojo-violeta incluso la pulpa interior (Vázquez Roncero, 1965). El paso por la coloración amarilla no supone incremento alguno en la fracción carotenoide, lo que excluye que exista ningún tipo de carotenogénesis en esta fase.

El patrón de evolución de pigmentos cloroplásticos se ajusta al que en general muestran los frutos cuya coloración final se debe a la síntesis de compuestos de otra naturaleza, como son las antocianinas que incluso pueden enmascarar la presencia de clorofilas y carotenoides. En estos casos el patrón carotenoide no cambia durante la maduración como ocurre en la aceituna, en la que los análisis evidencian que aún partiendo de frutos en un estado avanzado de madurez, en el cual su color superficial es morado o negro, siguen estando presentes

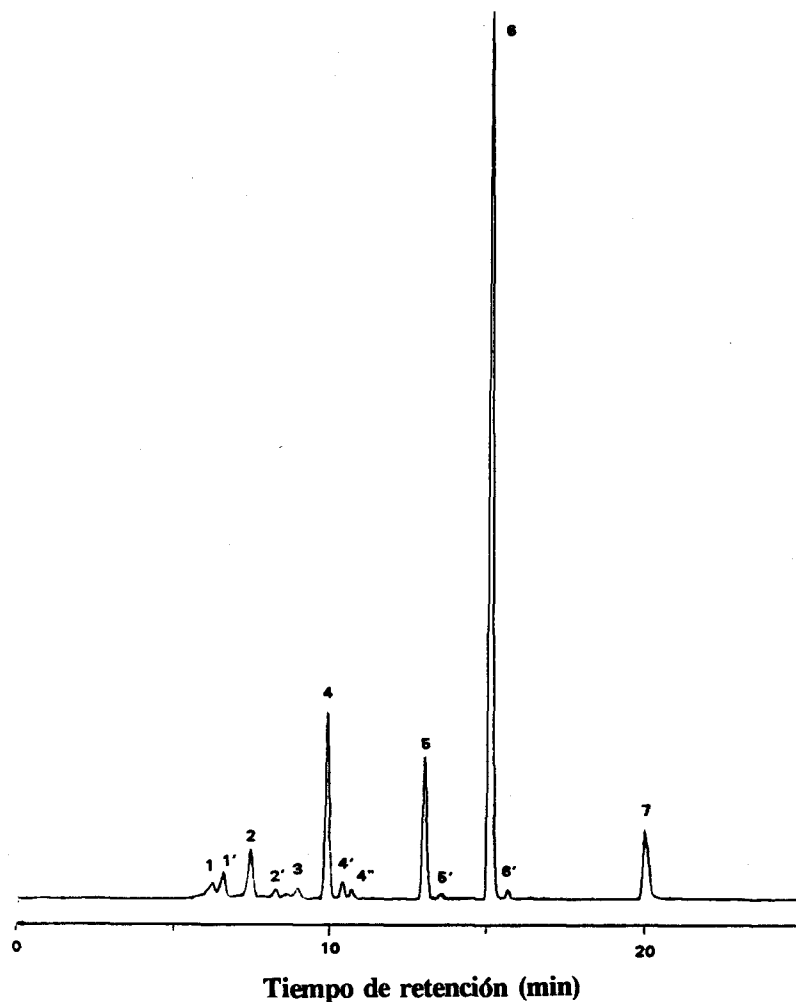


FIGURA 10: Cromatograma de HPLC de los pigmentos presentes en la aceituna Gordal durante todo el ciclo de la maduración. Identificación de picos: 1) neoxanteno, 1') neoxanteno, 2) violaxanteno, 2') isómero de violaxanteno, 3) anteraxanteno, 4) luteína, 4' y 4'') isómeros de luteína, 5) clorofila *b*, 5') clorofila *b'*, 6) clorofila *a*, 6') clorofila *a'* y 7) β -caroteno.

TABLA X. Cambios en la composición de pigmentos cloroplásticos (mg/kg) en aceitunas de la variedad Gordal durante las etapas de crecimiento, desarrollo y maduración.

Estados de madurez	n ^{a)}	Fracción clorofílica (\pm LC) ^{b)}			Fracción carotenoide (\pm LC)					
		Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofilas T	β -caroteno	Luteína	Neoxanteno	Violaxanteno	Anteraxanteno	Carotenoides T
Verde Intenso	8	156.47 \pm 13.96	60.42 \pm 5.60	216.89 \pm 19.38	6.64 \pm 0.80	13.64 \pm 1.95	6.27 \pm 0.96	5.76 \pm 0.88	0.15 \pm 0.04	32.46 \pm 4.30
Verde Claro	7	98.10 \pm 8.15	34.46 \pm 5.17	132.56 \pm 4.52	4.12 \pm 0.34	7.64 \pm 0.78	3.47 \pm 0.73	3.18 \pm 0.52	0.14 \pm 0.05	18.56 \pm 1.73
Verde-amarillento	6	67.61 \pm 5.18	18.78 \pm 2.94	86.39 \pm 6.18	3.42 \pm 0.31	6.62 \pm 0.51	2.31 \pm 0.54	2.31 \pm 0.57	0.23 \pm 0.09	14.89 \pm 1.52
Pintona	5	41.22 \pm 1.60	11.88 \pm 1.70	53.10 \pm 3.15	1.95 \pm 0.19	2.85 \pm 0.22	1.29 \pm 0.55	1.3 \pm 0.72	0.06 \pm 0.04	7.46 \pm 1.19
Envero	4	22.22 \pm 2.44	5.39 \pm 1.29	27.60 \pm 3.09	1.60 \pm 0.84	2.21 \pm 0.78	0.66 \pm 0.14	0.74 \pm 0.33	0.09 \pm 0.09	5.29 \pm 1.52
Morada	4	11.53 \pm 3.06	3.11 \pm 0.55	14.64 \pm 3.51	1.53 \pm 0.51	1.94 \pm 0.47	0.34 \pm 0.07	0.30 \pm 0.08	nd ^{c)}	4.10 \pm 1.08
Negra	4	4.12 \pm 2.05	1.55 \pm 0.90	5.67 \pm 2.77	0.32 \pm 0.35	0.79 \pm 0.22	0.12 \pm 0.06	0.10 \pm 0.06	nd	1.32 \pm 0.63

a) Número de muestras para cada estado de madurez.

b) Valores medios y límites de confianza ($p \leq 0.05$).

c) No detectado

clorofilas y carotenoides. Así mismo y al margen del alto contenido en materia grasa del fruto maduro, las xantofilas permanecen sin esterificar (Mínguez y Garrido, 1989). El hecho de que la composición cualitativa de la fracción carotenoide en aceitunas permanezca inalterada durante todo el proceso de maduración, corrobora que en todo momento se mantiene el patrón de pigmentos propio de un tejido verde, lo cual es indicativo de que el cloroplasto permanece intacto (Goodwin, 1976).

En cuanto a su evolución cuantitativa, a medida que la concentración de cada pigmento desciende en el fruto, se observa que al margen de que éste siga conteniendo carotenoides cloroplásticos residuales, las proporciones relativas de éstos varían respecto al principio. Aunque la composición porcentual inicial de cada carotenoide es la propia de tejidos verdes (luteína 42.0%, β -caroteno 20.5%, neoxanteno 19.3%, violaxanteno 17.7% y trazas de anteraxanteno 0.5%), a medida que avanza la maduración y el contenido carotenoide desciende, la composición porcentual se modifica incrementándose para los carotenoides mayoritarios (ligeramente para luteína 47.2% y muy notoriamente para β -caroteno 37.2%, en el estado morado) y decreciendo considerablemente la de los minoritarios con una mínima aportación en los estadios de plena madurez (neoxanteno 8.3% y violaxanteno 7.3%). Este hecho también ha sido evidenciado en otros frutos de análogas características (fresa, grosella roja, dátil, etc., (Gross, 1987). Dada la insignificante presencia de pigmentos cloroplásticos en los frutos muy maduros (aceitunas negras), el error que se comete en su medida puede distorsionar el conjunto de resultados, por lo que no se considera en el presente trabajo dicho estado de maduración.

2.- Patrón de evolución en la concentración de cada pigmento.

Para analizar este punto se tiene en cuenta tanto la pérdida porcentual de clorofilas y carotenoides entre etapas (Tabla XI), como la relación que muestran entre sí dichos compuestos (Tabla XII). En ambas tablas se pueden distinguir, según los datos obtenidos, tres etapas diferenciadas: fruto con predominio de color verde, rompiente y fase de maduración. El comportamiento de clorofila *a* y clorofila *b* cambia según la fase evolutiva del fruto. Mientras éste muestra color verde el porcentaje de disminución en la concentración es superior para clorofila *b*, lo cual está en concordancia en el aumento paulatino de la relación entre ambos pigmentos. En la aceituna con manchitas rojas (pintona) la relación desciende

TABLA XI. Pérdidas (%) de pigmentos (individual y por fracciones) entre los distintos estados de madurez.

<u>Estado de madurez</u>	<u>Fracción cloroflica</u>			<u>Fracción carotenoide</u>				
	<u>Cl a</u>	<u>Cl b</u>	<u>Cl T</u>	<u>β-c</u>	<u>Lut</u>	<u>Neox</u>	<u>Viol</u>	<u>Car T</u>
Verde Intenso	—	—	—	—	—	—	—	—
Verde Claro	37.30	42.97	38.88	37.95	43.99	44.66	44.79	42.82
Verde-amarillento	31.08	45.50	34.83	16.99	13.35	33.43	27.36	19.77
Pintona	39.03	36.74	38.53	42.98	57.14	44.16	43.72	49.90
Envero	46.09	54.63	48.02	17.95	22.46	48.84	43.08	29.09
Morado	48.11	42.30	46.96	4.38	12.22	48.48	59.46	22.50
Negra	64.27	50.16	61.27	79.08	59.28	64.71	66.67	67.80

Cl a: Clorofila a, Cl b: Clorofila b, Cl T: Clorofilas totales,
 β -c: β -caroteno, Lut: Luteina, Neox: Neoxanteno, Viol: Violaxanteno,
 Car T: Carotenoides totales

TABLA XII. Evolución de la relación que guardan entre sí los pigmentos mayoritarios y principales fracciones de pigmentos cloroplásticos en aceitunas de la variedad Gordal al avanzar los estados de madurez.

<u>Estado de madurez</u>	<u>n^{a)}</u>	<u>Cl a/Cl b (\pmLC)^{b)}</u>	<u>Cl T/Car T</u>	<u>Lut/β-c</u>
Verde Intenso	8	2.59 \pm 0.08	6.74 \pm 0.43	2.05 \pm 0.12
Verde Claro	7	2.89 \pm 0.37	7.17 \pm 0.63	1.86 \pm 0.14
Verde-amarillento	6	3.67 \pm 0.65	5.82 \pm 0.37	1.95 \pm 0.21
Pintona	5	3.50 \pm 0.42	7.21 \pm 1.10	1.48 \pm 0.28
Envero	4	4.18 \pm 0.90	5.31 \pm 1.00	1.48 \pm 0.72
Morada	4	3.70 \pm 0.63	3.58 \pm 0.36	1.28 \pm 0.19
Negra	4	2.78 \pm 1.43	4.29 \pm 0.54	3.10 \pm 2.06

^{a)} Número de muestras para cada estado de madurez.

^{b)} Valores medios y límites de confianza ($p \leq 0.05$).

y la pérdida porcentual de pigmentos se invierte, afectando más a clorofila *a* para, en el paso siguiente de la maduración, revertir a la situación de fruto verde. En el estado de rompiente (envero), la razón entre clorofilas alcanza su máximo valor. A continuación, la relación descende y el porcentaje de pérdida es claramente superior para clorofila *a*. Como conclusión se puede deducir que en las aceitunas de la variedad Gordal, mientras el fruto está verde, la degradación inicial de clorofilas afecta de forma preferente a clorofila *b* y superada una etapa intermedia de cierta fluctuación, en el fruto ya maduro, clorofila *a* desaparece más rápidamente que la *b*.

Aunque se postula que la velocidad de degradación de clorofila *a* es más rápida que la de clorofila *b*, por estar ésta más oxidada, lo cierto es que según el fruto concreto de estudio, los resultados orientan distintas posibilidades, encontrando unos autores degradación preferente por clorofila *a* (Jahn, 1975; Gross et al., 1983), en cuyo caso la razón clorofila *a/b* descende y otros por clorofila *b* (Shimokawa, 1979; Gross, 1981), incrementándose entonces dicha relación. Otros autores han evidenciado una disminución proporcional de ambas clorofilas, aunque eventualmente se constaten oscilaciones puntuales, en cuyo caso, la relación entre ambos compuestos permanece constante (Eilati et al., 1975), o bien, fluctuaciones en la relación clorofila *a/b*, aumentando primero y disminuyendo posteriormente (Knee, 1972; Lessertois y Monèger, 1978). Está claro pues que durante la maduración de los frutos, la desaparición de clorofilas no sigue un patrón único.

Individualmente el patrón de evolución de cada carotenoide en la aceituna no se ajusta a un modelo único. Todos experimentan una notoria pérdida de concentración en el primer paso de la maduración. Luteína y β -caroteno, dada su dominancia dentro de la fracción carotenoide, son los compuestos que van a marcar la tendencia del conjunto de pigmentos amarillos. Estando el fruto aún verde, en la segunda etapa, aunque se sigue perdiendo pigmentación el porcentaje se reduce considerablemente para a partir de ahí, llegada la fase de maduración, seguir cada carotenoide un rumbo distinto en su degradación. El período de relentización corresponde a un solapamiento entre una degradación algo más lenta de β -caroteno respecto a la etapa anterior junto con una mínima degradación de luteína, con un resultado global neto, suma de ambos que supone el mantenimiento del contenido carotenoide durante esta etapa. Neoxanteno y violaxanteno a su vez, se comportan de forma paralela experimentando las mayores y más notorias pérdidas entre todas las etapas.

En consecuencia, es de destacar que mientras en el fruto domina la coloración verde, el único punto en común para cada uno de los carotenoides presentes en la aceituna es que experimentan la mínima degradación en el paso al verde-amarillento. Respecto a la relación que mantienen entre sí los carotenoides mayoritarios, luteína y β -caroteno, disminuye al avanzar la maduración, lo cual pone de manifiesto la mayor degradación de luteína frente a β -caroteno, situación contraria a la que suele describir la bibliografía. Normalmente β -caroteno se destruye más rápidamente que luteína quien llega a representar más de la mitad de los carotenoides cloroplásticos. No obstante, en la cereza Okombi et al. (1980) encontraron este metabolismo al revés, predominando β -caroteno en el fruto maduro. Los carotenoides minoritarios, neoxanteno y violaxanteno, disminuyen a la par por lo que su relación se ha omitido.

Una vez comentada la disminución en la concentración de pigmentos de forma individualizada, se pasa a considerar su entidad como fracciones en cuanto a su participación en el color verde y amarillo de los frutos. Mientras en la aceituna predomina el color verde, el descenso porcentual de la fracción carotenoide es superior al que experimenta la cloroflica. En el paso a verde-amarillento, ambas fracciones de pigmentos atenúan su degradación, siendo notoria la que muestra la carotenoide. Posiblemente este hecho sea el responsable de la visualización del color amarillo en la superficie del fruto.

Respecto al comportamiento global de la fracción carotenoide, se produce una drástica caída de concentración al pasar el fruto de coloración verde intensa a verde clara, seguido de una cierta relentización o incluso mantenimiento de su contenido en el paso del estado verde claro a verde-amarillento. Al final de esta última etapa comienza la síntesis de compuestos antociánicos que con posterioridad enmascararán por completo la coloración cloroplástica del fruto. Esta nueva etapa supone el comienzo de la maduración del fruto propiamente dicha. El tránsito de fruto verde-amarillento a rompiente provoca otro fuerte descenso en el contenido carotenoide para, en el paso siguiente, atenuar el ritmo de su degradación.

En la Tabla XII, se puede observar cómo la relación que mantienen entre sí ambas familias de pigmentos desciende sensiblemente justo en el estado de verde-amarillento. La mayor pérdida de clorofilas en esta etapa desenmascara la presencia carotenoide que a su vez por razones, de momento desconocidas, ha sido menos afectada en el proceso degradativo general que afecta a estos pigmentos. Si se considera como indicio claro de maduración la

aparición de antocianinas en la superficie del fruto, manchitas rojas, es a partir de ese momento cuando las clorofilas aceleran casi en dos veces su degradación con respecto a la de carotenoides, signo que se evidencia como es lógico, en el descenso paulatino de relación entre fracciones.

El sistemático y mínimo descenso de la fracción carotenoide al pasar del estado verde claro al verde-amarillento, parece indicar que durante esta etapa la fracción carotenoide se estabiliza. Porcentualmente, el descenso de la fracción carotenoide (19.77%) contrasta con el 34.83% de pérdidas que experimenta la fracción clorofílica, lo que avala la hipótesis de que durante este tránsito, la concentración de la fracción carotenoide se estabiliza. Los descensos en concentración en esta etapa confirman este hecho ya que en valor absoluto las clorofilas reducen su velocidad de degradación en un 4%, mientras la fracción carotenoide lo hace en un 23%. Esta sola diferencia ya de por sí evidencia un cambio notorio en el ritmo de degradación de ambas familias de pigmentos en ese momento concreto del ciclo de la maduración.

Aunque en general las diferencias entre los valores medios que definen las distintas poblaciones que conforman cada estado de maduración de aceitunas, se aprecian directamente como distintas, se les realizó a todos el test de Duncan. Concretamente en el caso de luteína, entre los estados verde claro y verde-amarillento, las diferencias entre poblaciones no son significativas a nivel estadístico ($p < 0.05$). Como consecuencia, la concentración de luteína es estadísticamente constante durante ambos períodos, lo cual explica el mantenimiento de la pigmentación amarilla mientras que las clorofilas continúan con un ritmo mayor de degradación, haciendo que el fruto adopte una coloración externa con un mayor matiz amarillento.

La progresiva desorganización y pérdida de funcionalidad que experimentan los cloroplastos desde que comienza la degradación continuada de clorofilas, puede ser la causa de que alcanzado cierto estadio crítico la velocidad de degradación de carotenoides se relentize. Tal y como apunta Gross (1987), condiciones particulares que existen dentro del cloroplasto de distintos frutos y también durante los distintos períodos de la maduración, pueden promover un diferente acomplejamiento de pigmentos y proteínas, provocando una variación en la estabilidad y/o labilidad de los pigmentos, lo que se traduce en una modificación de la velocidad de degradación de los mismos. Este estadio crítico coincide

temporalmente en la aceituna con la aparición de los compuestos antociánicos, hecho que marca el comienzo de la maduración del fruto.

En la elaboración de aceitunas verdes de mesa, los frutos se recolectan en el estado de maduración verde claro a verde-amarillento que, como indica el gráfico de la Figura 7, se corresponde con el mes de Septiembre y mediados de Octubre. En el estado anterior previo a la maduración, el fruto pudiera estar predisponiendo su maquinaria enzimática o metabólica para entrar de lleno en la etapa de la maduración. Por causas inherentes al propio proceso, pudiera ocurrir que los complejos clorofila-proteína y carotenoide-proteína adopten diferente organización dentro de las membranas del tilacoide, protegiéndose de la degradación de forma diferente, lo cual determinaría la distinta velocidad de destrucción. A partir de este momento, e iniciada ya la síntesis de antocianinas, la desaparición de clorofilas es del orden de dos veces superior a la de carotenoides.

Como consideración final a todo el presente estudio, queda patente que para la vida del fruto, el momento de su recolección para su elaboración como aceitunas verdes de mesa, es el más crítico de todo el proceso de la maduración.

III. IMPLICACION DE CLOROFILASA EN EL METABOLISMO DE CLOROFILAS.

1.- Desarrollo del fruto y contenido en humedad durante los cambios estacionales.

En la Figura 11 se incluye tanto la evolución de humedad como el incremento en peso del fruto en función de la fecha de recolección. En el gráfico correspondiente a la representación de la humedad pueden claramente diferenciarse tres etapas. La primera de rápido crecimiento, que abarca las cuatro primeras semanas y en la que el fruto incrementa su humedad desde un 71% a un 76%. La segunda etapa, comprendida entre las semanas 5 y 14, se caracteriza por la fluctuación en el contenido en humedad que crece y decrece lentamente dentro de unos márgenes estrechos (76-79%). La tercera etapa es de clara estabilización alrededor de un 75%. El alto contenido en agua que muestran los frutos de la variedad Gordal en el estado de maduro al compararla con otras variedades (57.5% en Hojiblanca y 68.8% en Manzanilla), está en relación directa con su bajo contenido en aceite. Es por esta razón que dicha variedad se destina exclusivamente a su consumo como aceituna de mesa.

Respecto al peso del fruto, éste aumenta hasta aproximadamente la tercera semana del mes de Septiembre (semana 14), alcanzando un valor máximo de unos 10 g que ya permanece prácticamente constante hasta el final de la maduración. La estabilización en el peso del fruto es simultánea con la del contenido en humedad y prácticamente coincide con la síntesis máxima de ácidos grasos (Vázquez Roncero et al., 1965). El punto de inflexión que marca dicha estabilización, supone el tránsito del período de crecimiento al de maduración.

2.- Evolución de clorofilas durante los cambios estacionales.

En la Tabla XIII se recogen los valores de concentración individual para clorofila *a* y clorofila *b* encontrados en los frutos según su fecha de recolección a lo largo del proceso de crecimiento y maduración de la aceituna. En la Figura 12 se muestra la evolución de clorofila *a* y clorofila *b* frente al tiempo, referido a peso de fruto seco. Al igual que ocurría con el contenido en humedad, se pueden diferenciar varias etapas en el patrón de evolución de ambas clorofilas, aunque en una primera apreciación destacan únicamente dos.

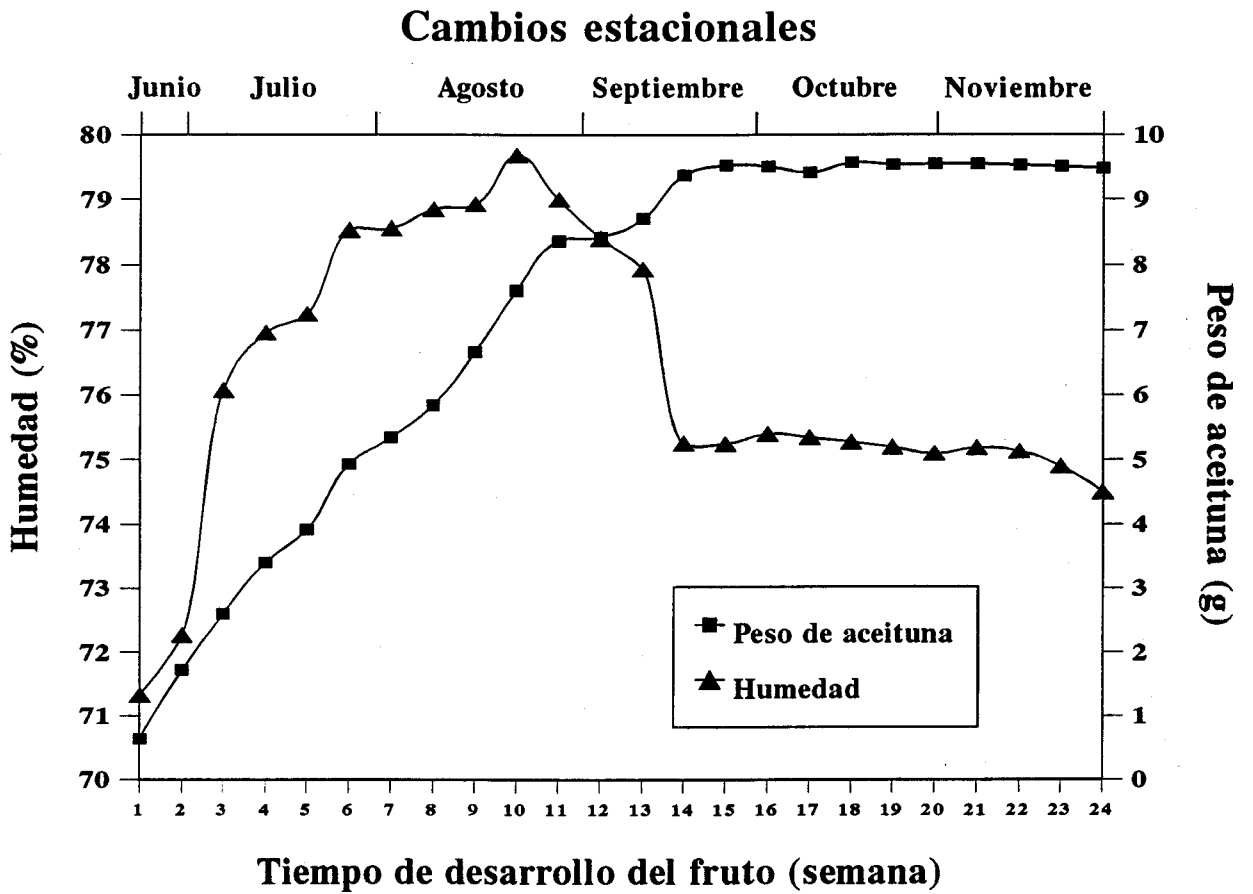


FIGURA 11: Evolución de la humedad y peso de la aceituna de la variedad Gordal durante su desarrollo y maduración.

TABLA XIII. Evolución de la concentración de clorofilas (mg/kg de fruto) durante el desarrollo y maduración de aceitunas de la variedad Gordal.

Estado de madurez	Cl <i>a</i>	Cl <i>b</i>
Verde Intenso		
21-6-93	147.35	57.47
28-6-93	164.86	64.52
5-7-93	166.38	59.13
12-7-93	181.11	72.50
19-7-93	170.04	65.11
26-7-93	149.69	58.56
2-8-93	140.66	54.84
9-8-93	131.68	51.24
Verde Claro		
17-8-93	108.66	32.24
23-8-93	98.79	32.28
30-8-93	99.92	33.70
6-9-93	102.30	38.03
13-9-93	100.41	42.17
20-9-93	96.58	37.95
27-9-93	80.07	24.83
Verde-amarillento		
4-10-93	70.96	22.49
7-10-93	72.55	16.09
11-10-93	70.35	21.48
14-10-93	68.96	15.66
18-10-93	61.21	17.79
21-10-93	61.62	19.17
Pintona		
25-10-93	42.00	13.11
26-10-93	43.09	13.01
27-10-93	40.01	10.32
28-10-93	40.64	12.49
29-10-93	40.36	10.49
Envero		
2-11-93	22.43	6.51
3-11-93	22.90	4.76
4-11-93	20.01	4.82
5-11-93	23.52	5.45
Morada		
8-11-93	13.87	3.60
11-11-93	12.33	2.99
15-11-93	9.79	3.08
18-11-93	10.12	2.78
Negra		
22-11-93	5.83	2.34
25-11-93	4.38	1.07
29-11-93	3.25	1.58
2-12-93	3.01	1.22

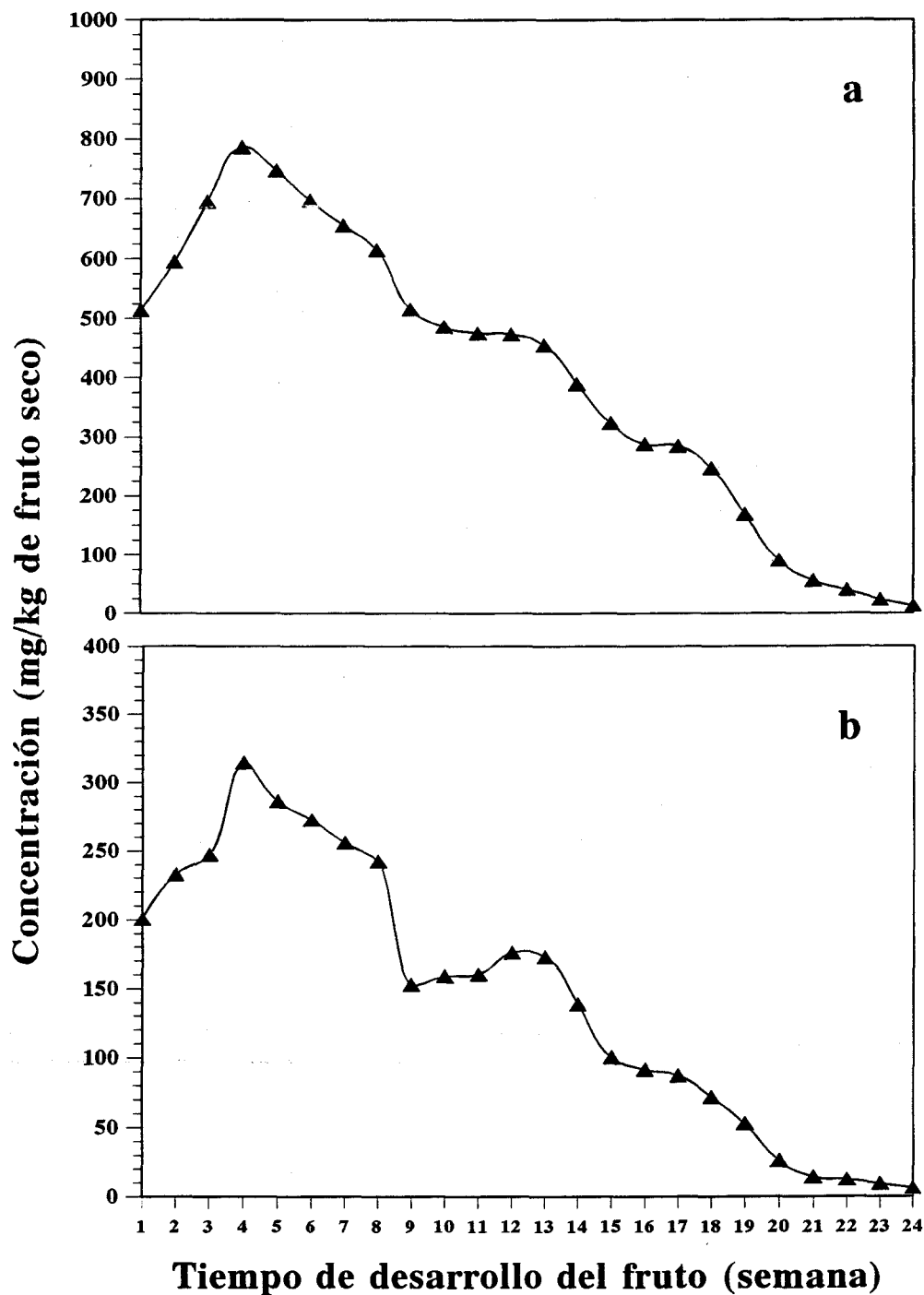


FIGURA 12: Evolución de la concentración de clorofila *a* y clorofila *b* en la aceituna de la variedad Gordal durante su desarrollo y maduración.

La primera, coincidente temporalmente con el aumento rápido en contenido en humedad (semanas 1 y 4), se caracteriza por un incremento continuado en la concentración de clorofilas *a* y *b*, y que se asocia directamente con una fase de síntesis. A partir de este momento, se inicia un descenso sistemático en la concentración de clorofilas que, aunque de forma discontinua, dura hasta el final del proceso. En consecuencia, esta segunda etapa es de mayor duración que la primera. La secuencia marcada por ambas clorofilas durante el ciclo evolutivo de la aceituna puede considerarse en líneas generales paralelo, aunque en determinados momentos, y de forma puntual, difieran de manera más o menos significativa, lo cual será objeto de un estudio detallado.

Etapa de síntesis.

Durante las primeras semanas de formación y crecimiento de los frutos se origina un aumento progresivo de clorofilas hasta alcanzar su valor máximo hacia mediados del mes de Julio (semana 4), cuando el fruto aunque aún es bastante pequeño (aproximadamente un tercio de su peso final), tiene ya totalmente diferenciado el hueso. Según los pocos datos que aporta la bibliografía (Rodríguez de la Borbolla et al., 1955; 1956) sobre los cambios originados en la composición de la aceituna durante su desarrollo, el contenido de azúcares aumenta durante este período, para iniciar a partir de esta fecha un descenso progresivo al avanzar la maduración en cuyas últimas etapas, ya en el mes de Noviembre, parece detenerse y permanecer constante.

El incremento en concentración de clorofilas, y por lo tanto en la capacidad fotosintética del fruto, probablemente sea la causa del aumento paralelo en la formación de azúcares. Al ocurrir este hecho en el período comprendido entre la formación del fruto en el árbol hasta que alcanza un tamaño determinado en el mes de Julio, se podría interpretar como una orientación preferente del metabolismo del fruto hacia la biosíntesis de metabolitos primarios esenciales para el crecimiento, desde el punto de vista energético y estructural.

Etapa de descenso en la concentración de clorofila.

Tras el incremento inicial de concentración de clorofila, se inicia un descenso paulatino que se continúa hasta la maduración del fruto. Este descenso coincide temporalmente con parte de la etapa de crecimiento del fruto y plenamente con la fase de maduración. Podría

ocurrir que en esta etapa se estuvieran manifestando dos efectos, uno de dilución por aumento de tamaño del fruto y otro de degradación de clorofilas por pérdida progresiva de funcionalidad de la maquinaria fotosintética. En algún momento ambos efectos podrían concurrir de forma solapada.

- *Efecto de dilución por crecimiento.* El desarrollo del fruto que culmina en la semana 14, va acompañado de un aumento del parénquima de reserva o pulpa, que provoca en la aceituna un incremento considerable en su peso que no es paralelo al experimentado por la superficie del fruto. Este hecho puede ser el causante del descenso detectado en la concentración de clorofilas durante la etapa de crecimiento. Aunque el contenido neto de clorofilas (mg de clorofilas por fruto) aumente mientras el fruto esté en fase de crecimiento, el resultado encontrado, al estar referido a mg/Kg de fruto seco, no lo reflejaría por un efecto de dilución. Para comprobar este punto, se recogieron aceitunas de distinto tamaño (entre 2 y 8 g de peso) y se analizó el contenido de clorofilas expresando los resultados en μg por fruto y en mg por Kg de fruto seco. Estos datos se corresponden con los de las semanas 5 a 11 de la Figura 12. Como puede observarse en la Figura 13, los comentarios anteriores quedan avalados con dicho ensayo en el que se comprueba la distinta evolución que muestran los gráficos, según la expresión de resultados.

Atribuyendo el descenso en concentración de clorofilas durante este período únicamente al efecto de dilución, la relación entre clorofilas *a* y *b* debería seguir una determinada pauta. Sin embargo, las oscilaciones que se detectan en el descenso en concentración de ambas clorofilas hace que dicha relación fluctúe, lo cual no es atribuible directamente a un progresivo efecto de dilución por crecimiento del fruto. Aunque la caída de ambas clorofilas en esta etapa es continuada y más o menos constante, como sería de esperar por el efecto de dilución, esta secuencia no se mantiene y además, el decrecimiento en la concentración de clorofila *b* tiende a ser ligeramente mayor que el acusado por clorofila *a*. Mientras clorofila *a* desaparece cada semana entre un 4.92% y un 6.72%, clorofila *b* lo hace en un 4.70% y 9.05% (Tabla XIV), hasta llegar a la semana 9 en la que se detecta una caída considerable en la concentración de ambos pigmentos, centrada en un 16.15% para clorofila *a*, y un 36.83% para clorofila *b*, lo que supone para este último, una disminución en concentración del 20% más que la experimentada por clorofila *a*.

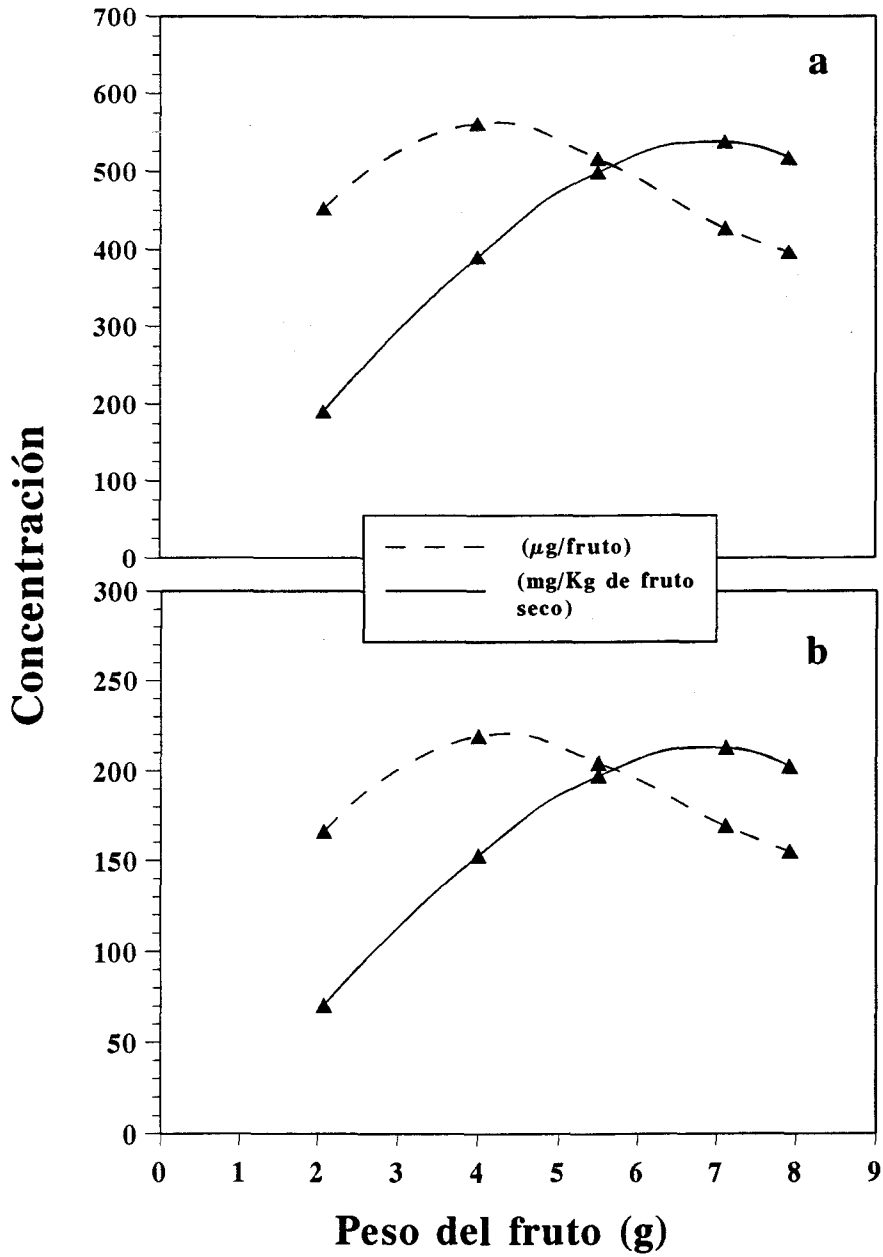


FIGURA 13: Evolución de clorofila *a* y clorofila *b* en la aceituna Gordal, según se exprese por unidad de fruto o por Kg de fruto seco.

TABLA XIV. Aumento o disminución en la concentración de los pigmentos clorofílicos presentes en las aceitunas de la variedad Gordal, conforme progresa el desarrollo del fruto. Diferencias entre semanas, (mg/kg de peso seco de fruto) y (%).

Semana del control	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>	
	mg/kg F.seco	%	mg/kg F.seco	%
1 ^a	—	—	—	—
2 ^a	(+) 80.57	(+)15.68	(-)32.22	(+)16.07
3 ^a	(+)100.76	(+)16.95	(+)14.43	(+) 6.20
4 ^a	(+) 90.80	(+)13.06	(+)67.57	(+)27.35
5 ^a	(-) 38.65	(-) 4.92	(-)28.47	(-) 9.05
6 ^a	(-) 50.22	(-) 6.72	(-)13.45	(-) 4.70
7 ^a	(-) 41.13	(-) 5.90	(-)16.97	(-) 6.22
8 ^a	(-) 41.05	(-) 5.26	(-)13.51	(-) 5.28
9 ^a	(-) 99.31	(-)16.15	(-)89.24	(-)36.83
10 ^a	(-) 29.57	(-) 5.73	(+) 5.84	(+) 3.82
11 ^a	(-) 10.32	(-) 2.12	(+) 1.62	(+) 1.02
12 ^a	(-) 1.99	(-) 0.42	(+)15.66	(+) 9.76
13 ^a	(-) 18.66	(-) 3.94	(-) 2.96	(-) 1.68
14 ^a	(-) 64.81	(-)14.24	(-)34.21	(-)19.75
15 ^a	(-) 66.86	(-)17.13	(-)38.67	(-)27.82
16 ^a	(-) 35.06	(-)10.84	(-) 8.89	(-) 8.86
17 ^a	(-) 3.06	(-) 1.06	(-) 4.28	(-) 4.68
18 ^a	(-) 37.77	(-)13.23	(-)15.19	(-)17.43
19 ^a	(-) 78.27	(-)31.61	(-)19.09	(-)26.53
20 ^a	(-) 76.26	(-)46.80	(-)26.73	(-)50.57
21 ^a	(-) 34.18	(-)37.94	(-)11.63	(-)44.51
22 ^a	(-) 16.54	(-)29.58	(-) 2.12	(-)14.62
23 ^a	(-) 16.14	(-)41.00	(-) 3.07	(-)24.80
24 ^a	(-) 10.50	(-)45.20	(-) 3.10	(-)33.30

Ambas desviaciones, como son, la diferente relación en el descenso de clorofilas *a* y *b* en determinados momentos, y la mayor disminución de pigmentos detectada en la semana 9, podrían interpretarse como reorganizaciones metabólicas puntuales. Posiblemente la carencia de los intermediarios comunes en la síntesis de clorofila *a* y *b* haga necesario reutilizar la clorofila *b* existente en favor de la síntesis de la *a* haciendo que el fruto modifique sus sistemas de actuación en función de las necesidades que se creen. Comúnmente, la bibliografía existente sobre el tema hace mención a una degradación de clorofilas preferente para una u otra durante el período de maduración de los frutos. A este respecto, hay que aclarar que los trabajos encontrados en la literatura se refieren generalmente a investigaciones realizadas sobre hojas senescentes o frutos ya maduros, sin estudiar lo que acontece en la fases precedentes (Jahn, 1975; Shimokawa, 1979; Gross et al., 1983).

En las últimas etapas de la fase de crecimiento (semanas 9 a 14) el fruto incrementa su peso en torno a un 40% y sin embargo la concentración de clorofila permanece constante lo que es indicativo de una clara síntesis de estos pigmentos para contrarrestar la dilución que supone este aumento en peso. En esta etapa, el descenso en concentración de clorofila *a* oscila entre un 0.42% y un 3.94%, lo que supone prácticamente durante este período un mantenimiento en la concentración de este compuesto. En términos de contenido neto de clorofila, esta última etapa supone una fuerte síntesis de clorofilas *a* y *b* que se da en la fase inmediatamente anterior a la maduración. Esto puede hacer pensar que el fruto está aumentando su capacidad metabólica para predisponerse a la síntesis de los ácidos grasos. De hecho, entre las semanas 11 y 12 es cuando la presencia de aceite comienza a ser detectable durante el proceso de extracción de pigmentos. En lo que respecta a clorofila *b*, se detecta en este mismo período un comportamiento inverso, ya que incrementa su concentración entre un 1.02% y un 9.76%. Esta tendencia en la evolución de clorofila *b*, podría interpretarse como un período de fuerte acumulación.

En principio se podría explicar este fenómeno con argumentos análogos a los de la etapa anterior. Si al llegar a la semana 9 clorofila *b* experimenta un descenso en su concentración muy drástico motivado por los cambios que en el fruto se están originando, una vez que los mecanismos que han propiciado tales cambios se normalizan, los propios implicados en la síntesis de pigmentos podrían tender a trabajar con mayor rendimiento a fin de recuperar los niveles de clorofila *b* necesarios para alcanzar el equilibrio y el buen funcionamiento de la

planta. De esta forma, la cantidad de clorofila *b* aumentaría hasta llegar a alcanzar las proporciones en que se encontraba frente a clorofila *a* en las semanas anteriores a la 9.

- *Degradación de clorofilas.* Al alcanzar el fruto el tamaño y peso máximo (a partir de la semana 14), el descenso en concentración de clorofilas es continuado. En estas condiciones la pérdida de clorofilas es real y sólo atribuible a la degradación metabólica de estos pigmentos.

Para clorofila *a* entre las semanas 13 y 16 el descenso llega a ser un 36.6% mientras que para clorofila *b* en el mismo período es de un 47.21%, volviéndose a detectar otra vez una mayor incidencia en la degradación de este último compuesto. Incluso entre las semanas 16 y 17, que se amortigua el ritmo de desaparición de ambas clorofilas (las pérdidas se sitúan, según se refleja en los datos de la Tabla XIV, en un 1.06% para clorofila *a* y un 4.68% para clorofila *b*), sigue afectándose otra vez más el mencionado pigmento.

Llegados ya al mes de Octubre, el estado predominante de las aceitunas es el verde-amarillento o cambiante, y el descenso progresivo de clorofilas se acentúa. Entre las semanas 17, 18 y 19 clorofila *a* decrece respectivamente, un 13.23% y un 31.61%. Clorofila *b* en el mismo intervalo, se degrada en un 17.43% y 26.53%. Al avanzar la maduración se comienzan a visualizar pequeñas manchas púrpuras en la superficie de la aceituna, debido a la síntesis de antocianinas, que van aumentando de tamaño con el tiempo hasta llegar a cubrir totalmente la piel del fruto ya en el estado de envero, hacia principios de Noviembre (semana 20). En las últimas fechas controladas, durante el mes de Noviembre, se encuentran aceitunas cada vez más moradas que se caracterizan por tener este color en la piel y en mayor o menor intensidad, según el grado de madurez del fruto, en la pulpa, llegando finalmente a pasar al estado de negra.

Se concluye en esta última etapa con la desaparición prácticamente total de clorofilas, cuya concentración en el último control, ya en el estado negro, supone una pérdida de alrededor a un 98% respecto al máximo valor encontrado en la semana 4, tanto para clorofila *a* como para clorofila *b*. La ínfima presencia de pigmentos en estos últimos estados deja de ser significativa, perdiendo prácticamente todo su protagonismo en el conjunto de la aceituna.

3.- Evolución de clorofilasa durante los cambios estacionales.

La evolución de actividad clorofilasa durante el proceso de maduración de la aceituna, tanto sobre el sustrato clorofila *a* (Figura 14a) como sobre el sustrato clorofila *b* (Figura 14b), expresada en ncat/kg de polvo acetónico, evidencia que la enzima está presente durante todo el proceso evolutivo del fruto, y muestra dos destacados máximos de actividad en dos períodos diferenciados y concretos. El primer máximo de clorofilasa se da durante la fase de crecimiento del fruto, coincidiendo con el período de síntesis masiva de clorofilas. El segundo máximo de actividad se corresponde con el período en el cual la aceituna se encuentra cercana a alcanzar el máximo desarrollo, momento en el que la síntesis de clorofila se hace prácticamente paralela al aumento en peso del fruto y que se manifiesta como un período en el cual, la concentración de estos pigmentos se mantiene prácticamente constante.

Es de destacar la diferente actividad que muestra clorofilasa en los dos momentos claves del desarrollo del fruto. Cuando el sustrato es clorofila *a*, el valor de actividad enzimática para el segundo máximo (momento de estabilización de clorofilas), es del orden de un 32% superior que el encontrado en el primero (síntesis de clorofilas). Cuando el sustrato es clorofila *b* la diferencia se sitúa en un 29.14%. La mayor actividad encontrada para ambas clorofilas en el segundo máximo se traduce en una presencia de clorofilasa mucho más activa cuando el fruto está en alto grado de desarrollo que al principio de su formación. Esto puede deberse tanto a un incremento en la cantidad de enzima presente en el fruto, como a la posible modificación vía regulación intrínseca de la actividad.

En las Figuras 15a y 15b, se incluye la evolución de actividad enzimática sobre los mismos sustratos, referida a peso de fruto seco. Como es fácil deducir, aunque en líneas generales reproduce los comentarios anteriores, son notorias las diferencias existentes. Al margen de que los niveles de actividad sean en todo momento inferiores, llama la atención no sólo la atenuación de actividad clorofilasa en los momentos donde se producen los máximos de actividad, sino la inversión entre la relación que muestran los mismos. Este hecho no supone ninguna contradicción con lo descrito anteriormente ya que la nueva referencia que se ha tomado es el peso seco del fruto y este no permanece constante a lo largo del proceso de maduración. Puede asegurarse que esta disminución es solo ficticia y

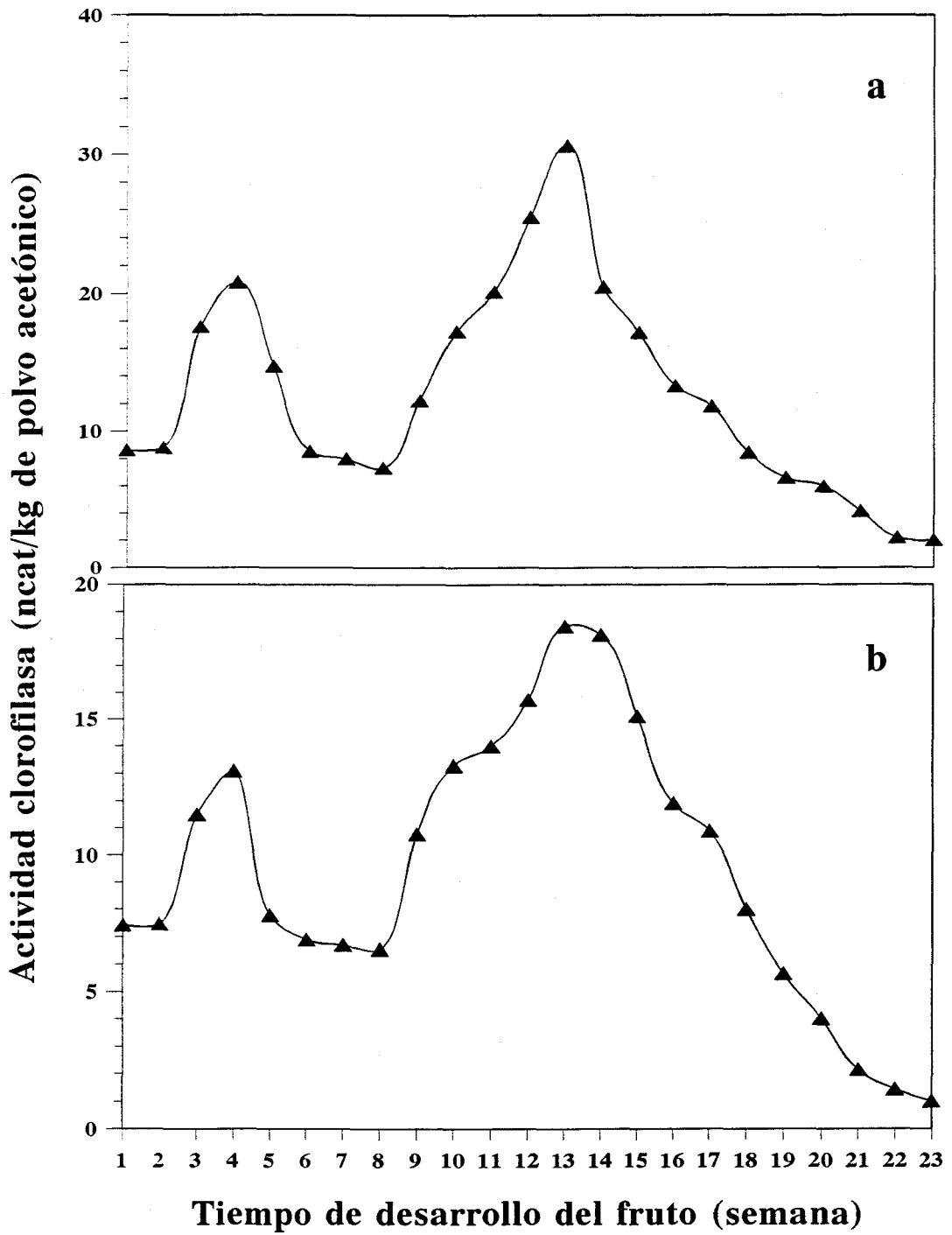


FIGURA 14: Evolución de la actividad clorofilasa (ncat/kg de polvo acetónico) durante el proceso de maduración de la aceituna Gordal, sobre el sustrato: a) clorofila *a* y b) clorofila *b*.

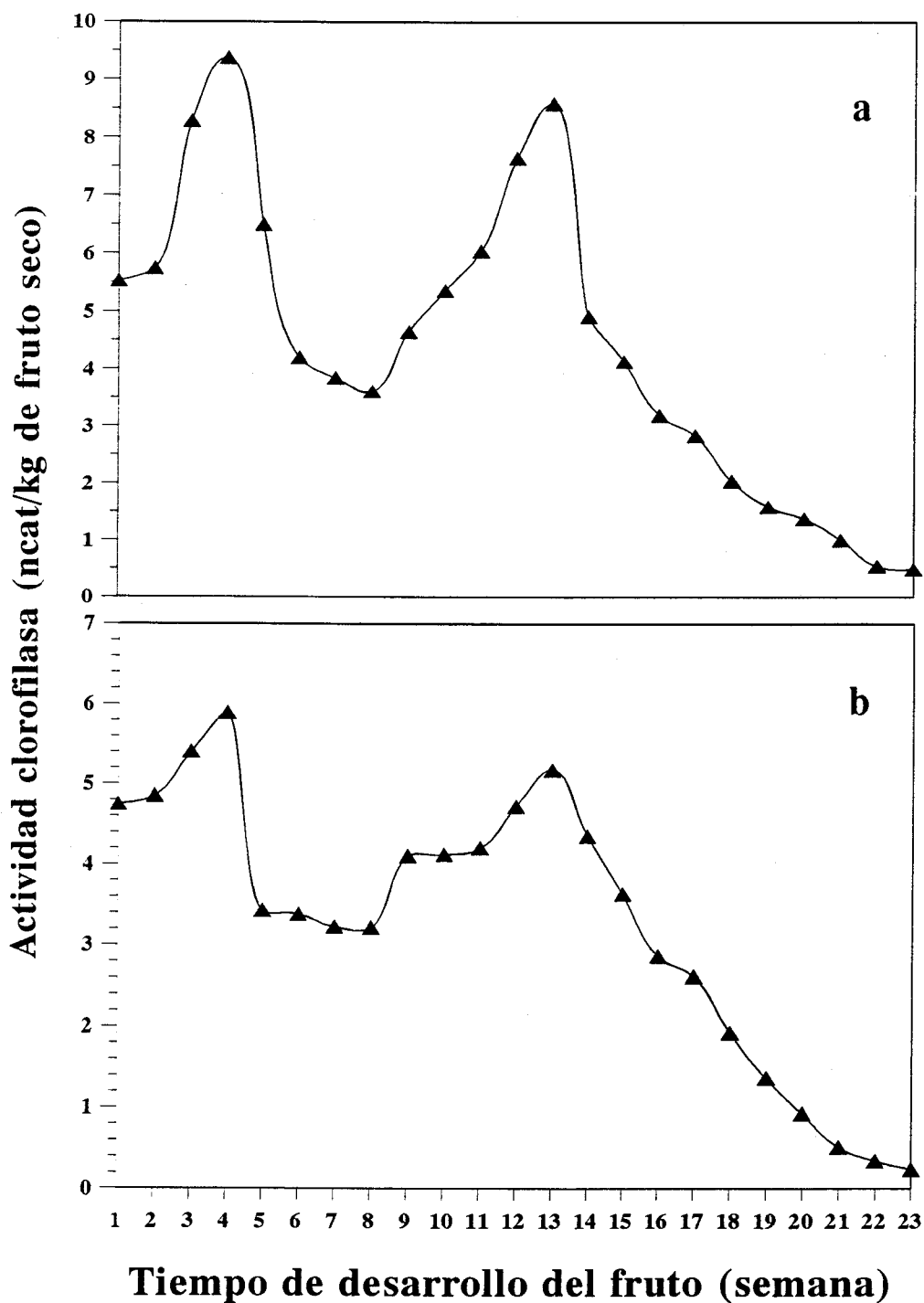


FIGURA 15: Evolución de la actividad clorofilasa (ncat/kg de fruto seco) durante el proceso de maduración de la aceituna Gordal, sobre los sustrato: a) clorofila *a* y b) clorofila *b*.

simplemente se debe a una dilución de la actividad enzimática dentro de un mayor peso de muestra.

La explicación, de la distinta información que se desprende según el material de referencia sobre la actividad clorofilasa, está en relación directa con la compleja composición del fruto del olivo. Durante la obtención del polvo enzimático los lavados acetónicos eliminan los componentes liposolubles, que representan una mayor proporción en el peso de la aceituna a medida que el fruto está más desarrollado. Al referir la actividad de la enzima a la cantidad de polvo enzimático empleado se obtiene una clara descripción de las tasas de actividad en el concentrado protéico libre de grasa, agua e inhibidores y tendría un sentido aproximado a la teórica cantidad máxima de actividad. La segunda representación expresa la actividad enzimática existente en la porción de fruto no acuosa, es decir en el conjunto de estructuras, membranas y orgánulos del fruto, que se asemejaría más a las condiciones reales del fruto. En consecuencia, ambas representaciones son válidas y la información que suministran puede considerarse complementaria.

4.- Implicación de clorofilasa en la evolución de clorofilas.

Conectando la evolución observada en la actividad clorofilasa en aceitunas, con los comentarios realizados sobre la evolución de clorofilas, parece bastante factible una posible intervención de clorofilasa en la biosíntesis de pigmentos, conclusión a la que se llega tras el análisis de la curva evolutiva de ambos parámetros que se comentará a continuación.

Durante la fase de crecimiento del fruto, se observa un incremento de la acción de clorofilasa hasta llegar a un máximo que coincide con la mayor concentración de pigmentos encontrada en la aceituna, en la semana 4 del control. A partir de este momento comienza a ser menor la actividad de clorofilasa, hecho que ocurre simultáneamente a la relentización en la síntesis de clorofila respecto al crecimiento del fruto y que se manifiesta como un descenso en concentración de los pigmentos. Es posible que la actividad de clorofilasa residual esté relacionada con los bajos niveles de síntesis de clorofila.

El tramo final de la etapa de crecimiento del fruto (semanas 10 a 14) se manifestaba como un período de estabilización en la concentración de clorofilas, lo que fue interpretado

como una etapa de síntesis real ya que suponía un crecimiento en el contenido clorofílico paralelo al crecimiento del fruto. En este mismo período de tiempo es cuando vuelve a aparecer un máximo en la actividad de clorofilasa, lo que corrobora que este período es claramente biosintético y predispone al fruto para la posterior etapa de maduración. El hecho de que proporcionalmente el aumento en clorofila *b* fuera más notable que en clorofila *a* puede ser explicado en base a la actividad que muestra clorofilasa frente a los dos posibles sustratos. Al calcular el porcentaje de diferencia que hay entre el valor de actividad en cada semana de la etapa en cuestión y el máximo correspondiente a la semana 13, podemos comprobar que en el caso de clorofila *b*, el poder de actuación de clorofilasa se encuentra próximo a su máximo durante más tiempo que para clorofila *a*, según se deduce de la Tabla XV. Mientras que en la semana 10 el valor de actividad enzimática sobre clorofila *a* dista de su máximo (semana 13), en un 42.62%, la actividad clorofilasa sobre el sustrato clorofila *b* sólo se diferencia de su máximo un 28.01%. Este mismo hecho se repite en las semanas 11 y 12. Estos razonamientos conducen a la posibilidad de que en el período comprendido entre las semanas 10-14, la enzima clorofilasa podría trabajar a un ritmo más acelerado sobre la síntesis de clorofila *b* que sobre la *a*.

La enzima clorofilasa actúa por tanto de forma preferente en la dirección anabólica mientras el fruto se desarrolla, y puntualmente con una mayor afinidad por la síntesis de clorofila *b*, aunque la superposición del efecto de dilución por crecimiento del fruto, no permite observar este hecho de forma directa.

TABLA XV. Diferencias entre el máximo valor de actividad clorofilasa (semana 13) y los correspondientes a las semanas anteriores más próximas, (%).

<u>Semana</u>	<u>Cl <i>a</i></u>	<u>Cl <i>b</i></u>
9	60.09	41.60
10	43.62	28.01
11	34.32	24.16
12	16.77	14.84

IV. TRANSFORMACION DE CLOROFILAS Y CAROTENOIDES DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACION LACTICA.

1.- Evolución cualitativa.

Los componentes clorofílicos fueron convenientemente caracterizados y cuantificados a medida que evolucionaba el proceso de fermentación verificándose en cada momento el conjunto de pruebas necesarias para la identificación. Análogo proceder se siguió para la fracción carotenoide. En la Figura 16 se incluyen los cromatogramas de HPLC correspondientes a frutos procedentes de cuatro momentos significativos del proceso de elaboración: a) Fruto fresco, b) a los 4 días de su colocación en salmuera, c) a los 12 días y d) final del proceso. En la Tabla XVI se muestran las características cromatográficas y espectroscópicas encontradas en el eluyente para cada uno de los pigmentos identificados. Los picos se enumeran por orden de elución en el sistema cromatográfico, contemplando el total de pigmentos identificados. Aunque β -caroteno está presente en todo momento, su ausencia en los cromatogramas responde a que se valora directamente en la fase de hexano, como se recordará del apartado de Metodología.

La simple observación visual de los mencionados cromatogramas de HPLC evidencian los cambios cualitativos que se originan en la composición de pigmentos a medida que progresa la fermentación.

En el fruto fresco (Figura 16a) sólo se contabilizan clorofila *a* y clorofila *b* en la fracción clorofílica, y en la carotenoide, están presentes β -caroteno, luteína, neoxanteno, violaxanteno y anteraxanteno. En el cromatograma correspondiente a la Figura 16b, se detectan además de los anteriores, los derivados clorofílicos Mg-clorina e_6 -fitol y Mg-rodina g_7 -fitol. Pasados los 12 primeros días de la puesta de los frutos en salmuera, se observan nuevos picos de pigmentos en el cromatograma resultante (Figura 16c). La fracción clorofílica se incrementa con la aparición de feofitinas *a* y *b*, pirofeofitina *a*, feoforbida y pirofeoforbida *a*, clorina e_6 -fitol, ester de clorina e_6 -fitol y rodina g_7 -fitol. En la fracción carotenoide se encuentran además de los iniciales, luteoxanteno, auroxanteno y mutatoxanteno. En el fruto totalmente fermentado (Figura 16d), desaparecen clorofilas *a* y *b*, Mg-clorina e_6 -fitol y Mg-

TABLA XVI. Características cromatográficas y espectrales encontradas en el eluente para los distintos pigmentos separados por HPLC.

Pico n°	k ^{a)}	r _{i,st} ^{b)}	Pigmento	Máximos de absorción (nm)						Relación de máximos ^{c)}
				I	II	III	IV	V	VI	
1	2.10	0.38	Feofoorbida <i>b</i>	(412)	436	524	598	654		5.1 II/V
2	3.09	0.56	Feofoorbida <i>a</i>	410	(479)	506	534	608	666	1.8 I/VI
3	3.28	0.59	Neoxanteno	414	438	466				90
3'	3.60	0.65	Isómero Neoxanteno	414	438	466				90
4	3.69	0.67	Neocromo	398	422	448				78
4'	3.94	0.71	Isómero Neocromo	398	422	448				78
5	4.11	0.75	Violaxanteno	416	440	470				94
6	4.46	0.81	Luteoxanteno	400	424	450				107
7	4.50	0.82	Pirofeofoorbida <i>a</i>	410	(479)	506	534	608	666	2.4 I/VI
8	4.56	0.83	Auroxanteno	380	400	424				103
8'	4.62	0.84	Isómero Auroxanteno	380	400	424				103
5'	4.75	0.86	Isómero Violaxanteno	412	436	466				94
9	4.96	0.90	Anteraxanteno	(420)	444	474				22
10	5.22	0.95	Mutatoxanteno	(404)	426	452				39
11	5.52	1.00	Luteína	424	446	474				60
12	6.05	1.10	Mg-rodina <i>g</i> ₇ -fitol	(350)	450	578	624			7.83 II/IV
11'	6.11	1.11	Isómero Luteína	418	440	468				42
11''	6.26	1.13	Isómero Luteína	416	438	466				27
13	6.42	1.16	Rodina <i>g</i> ₇ -fitol	(408)	426	(530)	(570)	596	648	6.54 II/VI
14	6.62	1.20	Mg-clorina <i>e</i> ₆ -fitol	416	(524)	(600)	646			2.60 I/IV
15	7.29	1.32	Clorina <i>e</i> ₆ -fitol	400	500	532	602	660		3.86 I/V
16	7.96	1.44	Clorofila <i>b</i>	466	600	650				3.3 I/III
16'	8.24	1.49	Clorofila <i>b</i> '	466	600	650				3.3 I/III
17	9.18	1.66	Clorofila <i>a</i>	(384)	(412)	432	(580)	616	664	1.3 III/VI
17'	9.57	1.73	Clorofila <i>a</i> '	(384)	(412)	432	(580)	616	664	1.3 III/IV
18	9.91	1.80	Ester de rodina <i>g</i> ₇ -fitol	(408)	426	(530)	(570)	596	648	6.54 II/VI
19	11.21	2.03	Feofitina <i>b</i>	(412)	436	524	598	654		5.1 II/V
19'	11.91	2.16	Feofitina <i>b</i> '	(412)	436	524	598	654		5.1 II/V
20	12.84	2.33	Ester de clorina <i>e</i> ₆ -fitol	400	500	532	602	660		3.86 I/V
21	13.22	2.39	Feofitina <i>a</i>	410	(470)	506	534	608	666	1.8 I/VI
21'	13.75	2.49	Feofitina <i>a</i> '	410	(470)	506	534	608	666	1.8 I/VI
22	16.05	2.91	Pirofeofitina <i>a</i>	410	(470)	506	534	608	666	2.4 I/VI

Nota: a) k: Factor de capacidad = $(t_r - t_m) / t_m$; b) r_{i,st}: Retención relativa = $k_i / k_{Luteína}$; c) %III/II para carotenoides

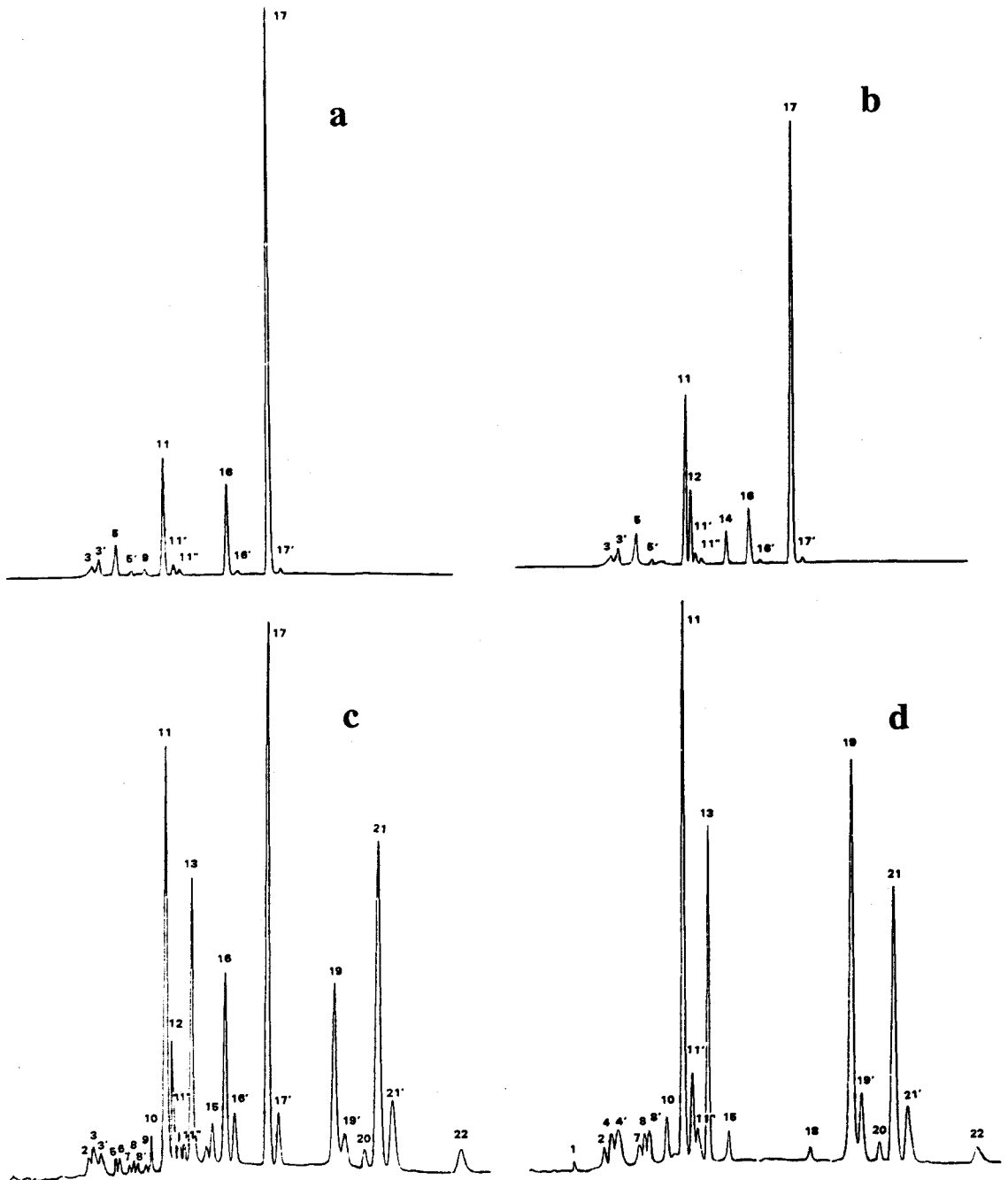


FIGURA 16: Cromatogramas de HPLC de los extractos de pigmentos de frutos procedentes de cuatro momentos significativos del proceso de elaboración: a) Fruto fresco, b) a los 4 días de su colocación en salmuera, c) a los 12 días y d) final del proceso. Identificación de picos: 1) feoforbida *b*, 2) feoforbida *a*, 3) neoxanteno, 3') isómero de neoxanteno, 4) neocromo, 4') isómero de neocromo, 5) violaxanteno, 5') isómero de violaxanteno, 6) luteoxanteno, 7) pirofeoforbida *a*, 8) auroxanteno, 8') isómero de auroxanteno, 9) anteraxanteno, 10) mutatoxanteno, 11) luteína, 11') isómeros de luteína, 12) Mg-rodina-*g*₇-fitol, 13) rodina-*g*₇-fitol, 14) Mg-clorina-*e*₆-fitol, 15) clorina-*e*₆-fitol, 16) clorofila *b*, 16') clorofila *b*', 17) clorofila *a*, 17') clorofila *a*', 18) ester de rodina-*g*₇-fitol, 19) feofitina *b*, 19') feofitina *b*', 19) ester de clorina-*e*₆-fitol, 20) feofitina *a*, 20') feofitina *a*', 22) pirofeofitina *a*.

rodina g_7 -fitol. Como componentes de la fracción verde permanecen feofitinas a y b , clorina e_6 -fitol y rodina g_7 -fitol (tanto libres en los restos del anillo isocíclico como esterificados), pirofeofitina y pirofeoforbida a , feoforbida a y su análogo b , de nueva formación. Así mismo, de la fracción amarilla desaparecen neoxanteno, violaxanteno, anteraxanteno y luteoxanteno y se origina un nuevo compuesto, neocromo, junto con los ya existentes auroxanteno, mutatoxanteno, luteína y β -caroteno.

2.- Evolución cuantitativa.

En las Tablas XVII a XIX se muestra la concentración inicial de clorofila a y clorofila b en los frutos así como el progreso de la evolución cualitativa y cuantitativa de estos pigmentos durante el proceso de fermentación láctica de aceitunas de la variedad Gordal, en función del tiempo y de la evolución del pH tanto en la salmuera de fermentación como en el jugo del propio fruto.

Las Tablas XVII y XVIII corresponden a frutos elaborados en la campaña 1992 cuyos controles se realizaron de forma espaciada porque se presuponía, por estudios anteriores en otras variedades, cómo evolucionaba la transformación de pigmentos. Dado que ésta fue notoriamente diferente a la experimentada por aceitunas de las variedades Manzanilla y Hojiblanca, en la campaña siguiente (Tabla XIX), el control se verificó en un sólo fermentador, pero con toma de muestra a intervalos de tiempo mucho más cortos. Los resultados de la fracción carotenoide, correspondientes a las dos campañas, se muestran en las Tablas XX, XXI y XXII.

Respecto a la fracción clorofílica, en el fruto fresco sólo se contabilizan clorofila a y clorofila b . Al día siguiente de la colocación de las aceitunas en salmuera, además de los anteriores, se detectan los derivados clorofílicos Mg-clorina e_6 -fitol y Mg-rodina g_7 -fitol, formados a partir de sus predecesores clorofila a y clorofila b , respectivamente, y cuya concentración, junto con la del resto de clorofilas no transformadas, permanece considerablemente alta hasta el día 12 del curso de la fermentación. Estos compuestos se originan por solvolisis del anillo V de la molécula de clorofila en condiciones alcalinas oxidantes (Hynninen, 1973). Hay que destacar que la formación de tales pigmentos en los frutos fue inesperada, ya que en estudios anteriores realizados en otras variedades de aceitunas de mesa sometidas al mismo proceso, pero según sistema tradicional, no se habían originado.

TABLA XVII. Evolución de la concentración ($\mu\text{mol/Kg}$) de clorofilas y sus productos de degradación en función del valor de pH y días en salmuera, durante el proceso de fermentación láctica. (Campaña 92, fermentador 1).

Días	Valor de pH		Serie a							Serie b					
	Salmuera	Fruto	Cl	Mg-C-f	Ff	pyFf	Fb ^{a)}	C-f ^{b)}	Total	Cl	Mg-R-f	Ff	Fb	R-f ^{b)}	Total
0	—	—	62.72	—	—	—	—	—	62.72	22.20	—	—	—	—	22.20
4	5.48	7.90	54.54	3.20	0.72	0.62	—	0.54	59.62	17.05	1.81	0.12	—	—	18.98
12	4.41	5.39	36.28	0.54	15.42	3.12	—	3.70	59.06	17.76	1.30	0.31	—	0.49	19.86
18	4.60	4.70	21.81	—	30.85	2.27	0.74	4.86	60.53	15.90	0.56	2.17	—	1.36	19.99
25	4.24	4.89	17.92	—	31.29	2.33	0.78	4.70	57.02	14.40	—	1.24	—	1.69	17.33
40	4.24	4.71	12.51	—	31.82	2.53	0.83	4.58	52.27	11.55	—	2.83	—	1.84	16.22
53	3.80	3.95	4.72	—	34.50	2.17	0.71	4.98	47.08	5.54	—	5.20	—	1.98	12.72
90	3.73	3.82	—	—	33.24	2.19	0.63	5.15	41.21	—	—	5.57	0.04	1.95	7.56

En los valores se incluye la aportación de a) pirofeoforbida a y b) los respectivos ésteres.

Cl: clorofila; Mg-C-f: Mg-clorina e_6 -fitol; Ff: feofitina; pyFf: pirofeofitina; Fb: feoforbida; C-f: clorina e_6 -fitol; Mg-R-f: Mg-rodina g_7 -fitol; R-f: rodina g_7 -fitol

TABLA XVIII. Evolución de la concentración ($\mu\text{mol/Kg}$) de clorofilas y sus productos de degradación en función del valor de pH y días en salmuera, durante el proceso de fermentación láctica. (Campaña 92, fermentador 2).

Días	Valor de pH		Serie a							Serie b					
	Salmuera	Fruto	Cl	Mg-C-f	Ff	pyFf	Fb ^{a)}	C-f ^{b)}	Total	Cl	Mg-R-f	Ff	Fb	R-f ^{b)}	Total
0	—	—	62.72	—	—	—	—	—	62.72	22.20	—	—	—	—	22.20
4	5.54	7.89	50.97	3.39	2.11	0.84	—	0.78	58.09	18.09	1.94	0.07	—	—	20.10
12	4.44	5.66	33.77	0.41	20.92	2.44	0.93	4.11	62.58	16.59	1.49	0.88	—	0.60	19.56
18	4.66	5.14	17.47	—	22.53	2.77	1.01	4.76	48.54	11.34	0.86	1.20	—	1.14	14.54
25	4.14	4.33	11.99	—	28.30	2.45	0.56	4.54	47.84	9.56	0.25	2.56	—	1.68	14.05
40	4.04	4.16	5.76	—	33.91	2.24	0.66	5.89	48.46	6.36	—	4.93	—	1.95	13.24
53	3.79	3.91	2.16	—	32.98	2.11	0.64	5.10	42.99	3.45	—	5.21	—	2.03	10.69
90	3.71	3.81	—	—	34.02	2.22	0.54	5.76	42.51	—	—	5.29	0.05	1.99	7.33

En los valores se incluye la aportación de a) pirofeoforbida a y b) los respectivos ésteres.

Cl: clorofila; Mg-C-f: Mg-clorina e_6 -fitol; Ff: feofitina; pyFf: pirofeofitina; Fb: feoforbida; C-f: clorina e_6 -fitol; Mg-R-f: Mg-rodina g_7 -fitol; R-f: rodina g_7 -fitol

TABLA XIX. Evolución de la concentración ($\mu\text{mol/Kg}$) de clorofilas y sus productos de degradación en función del valor de pH y días en salmuera, durante el proceso de fermentación láctica. (Campaña 93).

Días	Valor de pH		Serie a							Serie b					
	Salmuera	Fruto	Cl	Mg-C-f	Ff	pyFf	Fb ^{a)}	C-f ^{b)}	Total	Cl	Mg-R-f	Ff	Fb	R-f ^{b)}	Total
0	—	—	109.30	—	—	—	—	—	109.30	29.02	—	—	—	—	29.02
1	9.20	9.80	97.16	18.55	—	—	—	—	115.71	20.66	7.88	—	—	—	28.54
2	8.95	9.50	97.82	17.70	—	—	—	—	115.52	22.15	7.51	—	—	—	29.66
3	5.36	8.31	96.06	18.05	—	—	—	—	114.11	22.81	7.97	—	—	—	30.78
4	5.35	7.76	94.93	18.29	—	—	—	—	113.22	21.99	7.17	—	—	—	29.16
5	5.39	7.01	87.97	15.59	1.79	0.18	—	1.71	107.24	21.38	8.05	0.11	—	—	29.54
6	5.66	6.89	84.60	15.53	1.33	0.73	—	1.64	103.83	21.81	7.87	0.06	—	—	29.74
7	5.18	6.81	78.33	13.34	6.79	3.81	—	4.28	106.55	22.03	7.09	0.09	—	0.28	29.49
8	4.91	6.29	76.48	11.12	8.93	3.35	—	7.52	107.40	22.20	7.04	0.21	—	0.28	29.73
9	4.82	6.06	70.25	8.31	13.74	4.32	—	9.26	105.88	22.40	6.46	0.31	—	0.49	29.66
12	4.56	5.71	48.84	2.86	30.67	4.26	—	12.70	99.33	20.81	6.09	1.30	—	1.87	30.07
14	4.44	5.54	42.67	2.35	36.61	4.40	1.57	13.41	99.44	18.89	6.12	1.87	—	1.89	28.77
16	4.41	5.16	38.62	0.68	39.95	5.52	2.18	14.80	99.57	17.98	3.47	2.06	—	3.46	26.97
19	4.33	4.95	35.81	0.86	40.38	4.94	1.71	14.95	96.94	17.95	3.65	2.57	—	3.84	28.01
22	4.30	4.76	21.11	0.37	49.53	5.78	1.79	16.86	93.65	16.94	2.96	2.71	—	3.21	25.82
26	4.12	4.53	16.21	0.23	53.61	5.58	1.92	17.54	93.17	14.04	2.76	4.48	—	4.07	25.35
33	4.09	4.40	3.82	—	54.66	5.72	1.88	23.88	88.08	4.86	1.58	5.08	—	5.90	17.42
53	3.91	3.99	0.72	—	55.51	5.46	2.14	23.02	84.71	0.65	—	6.76	—	7.72	15.13
82	3.82	3.87	—	—	52.44	4.12	1.19	22.99	79.55	—	—	7.99	0.03	7.42	15.44

En los valores se incluye la aportación de a) pirofeoforbida a y b) los respectivos esteres.

Cl: clorofila; Mg-C-f: Mg-clorina e_6 -fitol; Ff: feofitina; pyFf: pirofeofitina; Fb: feoforbida; C-f: clorina e_6 -fitol; Mg-R-f: Mg-rodina g_7 -fitol; R-f: rodina g_7 -fitol

TABLA XX. Evolución de la concentración ($\mu\text{mol/Kg}$) de pigmentos carotenoides en función del valor de pH y días en salmuera, durante el proceso de fermentación láctica. (Campaña 92, fermentador 1).

Días	Valor de pH		β -c	Lut	Neox	Viol	Ant	Mut	Luteox	Aurox	Ncr	Total
	Salmuera	Fruto										
0	—	—	3.25	7.39	2.79	2.97	0.34	—	—	—	—	16.74
4	5.48	7.90	3.63	7.80	3.31	1.98	0.37	—	—	—	—	17.09
12	4.41	5.39	4.18	7.29	2.44	0.86	0.06	0.20	0.39	0.10	—	15.52
18	4.60	4.70	4.13	7.76	3.01	0.35	0.08	0.32	0.43	0.53	—	16.61
25	4.24	4.89	3.25	7.18	2.09	0.35	0.01	0.22	0.25	0.26	—	13.61
40	4.24	4.71	3.64	7.01	2.49	0.25	0.03	0.42	0.45	0.45	—	14.74
53	3.80	3.95	3.63	7.16	—	—	—	0.60	0.36	0.70	1.73	14.18
90	3.73	3.82	3.07	6.72	—	—	—	0.35	—	0.57	1.45	12.16

β -c: β -caroteno, Lut: Luteína, Neox: Neoxanteno, Viol: Violaxanteno, Ant: Anteraxanteno; Mut: Mutatoxanteno; Luteox: Luteoxanteno; Aurox: Auroxanteno; Ncr: Neocromo

TABLA XXI. Evolución de la concentración ($\mu\text{mol/Kg}$) de pigmentos carotenoides en función del valor de pH y días en salmuera, durante el proceso de fermentación láctica. (Campaña 92, fermentador 2).

Días	Valor de pH		β -c	Lut	Neox	Viol	Ant	Mut	Luteox	Aurox	Ncr	Total
	Salmuera	Fruto										
0	—	—	3.25	7.39	2.79	2.57	0.34	—	—	—	—	16.34
4	5.54	7.89	3.61	6.92	2.96	2.29	0.26	—	—	—	—	16.04
12	4.44	5.66	3.68	6.99	2.87	0.76	0.05	0.32	0.39	0.08	—	15.14
18	4.66	5.14	2.97	6.73	2.72	0.43	0.01	0.24	0.38	0.51	—	13.99
25	4.14	4.33	3.14	6.46	1.96	0.19	0.05	0.20	0.35	0.36	—	12.71
40	4.04	4.16	3.61	7.06	1.79	—	—	0.30	0.36	0.68	—	13.80
53	3.79	3.91	2.53	6.76	—	—	—	0.29	0.26	0.53	1.14	11.51
90	3.71	3.81	2.75	6.89	—	—	—	0.33	—	0.41	1.25	11.63

β -c: β -caroteno; Lut: Luteína; Neox: Neoxanteno; Viol: Violaxanteno; Ant: Anteraxanteno; Mut: Mutatoxanteno; Luteox: Luteoxanteno; Aurox: Auroxanteno; Ncr: Neocromo

Tabla XXII. Evolución de la concentración ($\mu\text{mol/Kg}$) de pigmentos carotenoides en función del valor de pH y días en salmuera, durante el proceso de fermentación láctica. (Campaña 92).

Días	Valor de pH		β -c	Lut	Neox	Viol	Ant	Mut	Luteox	Aurox	Ncr	Total
	Salmuera	Fruto										
0	—	—	9.67	16.55	6.41	4.86	0.32	—	—	—	—	37.81
1	9.20	9.50	9.74	17.22	6.69	4.27	0.39	—	—	—	—	38.31
2	8.95	9.80	9.16	15.31	6.56	2.91	0.43	—	—	—	—	34.37
3	5.36	8.31	9.80	16.70	6.77	2.77	0.24	—	—	—	—	36.28
4	5.35	7.76	9.39	15.71	7.45	2.78	0.31	—	—	—	—	35.64
5	5.39	7.01	8.23	14.32	6.61	2.43	0.32	—	—	—	—	31.91
6	5.66	6.89	8.42	13.95	5.86	2.38	0.37	—	—	—	—	30.98
7	5.18	6.81	8.25	14.50	6.61	2.61	0.34	0.09	—	—	—	32.40
8	4.91	6.29	8.34	13.80	6.61	2.51	0.26	0.25	—	—	—	31.77
9	4.82	6.06	8.27	15.66	6.91	2.48	0.21	0.26	—	—	—	33.79
12	4.56	5.71	8.38	15.92	6.62	1.36	0.10	0.52	0.53	—	—	33.43
14	4.44	5.54	8.40	13.50	6.07	1.34	—	0.32	0.43	—	—	30.06
16	4.41	5.16	8.60	15.04	3.58	0.62	—	0.79	0.20	0.18	—	29.01
19	4.33	4.95	7.99	15.10	3.44	0.35	—	0.60	0.23	0.58	—	28.29
22	4.30	4.76	7.97	16.54	4.28	0.27	—	0.48	0.33	0.53	—	30.04
26	4.12	4.53	6.57	14.92	4.04	0.22	—	0.58	0.28	0.67	—	27.28
33	4.09	4.40	7.77	12.65	2.08	0.12	—	0.36	0.18	0.73	0.53	24.42
55	3.91	3.99	7.69	14.20	0.55	—	—	0.46	0.20	0.62	1.58	25.30
82	3.82	3.87	6.37	9.37	—	—	—	0.38	—	0.43	0.88	17.43

β -c: β -caroteno; Lut: Luteína; Neox: Neoxanteno; Viol: Violaxanteno; Ant: Anteraxanteno; Mut: Mutatoxanteno; Luteox: Luteoxanteno; Aurox: Auroxanteno; Ncr: Neocromo

En la elaboración de aceitunas de mesa, como se recordará, el tratamiento inicial de los frutos con álcali para eliminar el glucósido amargo oleuropeína y favorecer la permeabilidad de la piel de los frutos ocasiona a pesar de los lavados, tanto en la salmuera como en el propio fruto, un pH alcalino inicial que tiende a la neutralidad en pocos días. En otras variedades esta situación propiciaba la activación de la enzima clorofilasa y ocasionaba durante este período, la formación de los derivados clorofílicos desesterificados clorofilidas y feoforbidas.

La aceituna Gordal al poseer unas características morfológicas totalmente distintas a la Manzanilla, se comporta de forma diferente, frente a similares condiciones, durante el proceso fermentativo, y requiere por tanto ligeras variaciones en el proceso previo a su colocación en salmuera, por su menor textura. El tratamiento con NaOH se realiza con una concentración inferior a la empleada con otras variedades. La salmuera inicial también difiere en su concentración a la empleada en el resto de variedades, siendo en esta ocasión ligeramente más baja. Como consecuencia de todos estos factores, parece que la aceituna Gordal muestra dificultad para alcanzar con rapidez un equilibrio entre el pH interior de los frutos y el exterior que se va produciendo en la salmuera, como se muestra en las Tablas XVII a XIX. A título comparativo, en la Tabla XXIII se incluye la evolución de pH en el jugo de los frutos y en la salmuera de fermentación para la variedad Manzanilla elaborada según sistema tradicional. La diferencia entre la pauta que marca el descenso del valor de pH en fruto y salmuera durante el proceso de fermentación para ambas variedades, es evidente.

Podría ocurrir que, al haber estado sometidos estos frutos a un tratamiento alcalino suave, la permeabilidad de la piel sea menor y aunque el paso de materia fermentable a la salmuera es evidente, también se conoce que estos frutos tienen un mayor contenido en azúcares que otras variedades, lo cual podría explicar que la fermentación en el medio exterior se inicie aún cuando en el interior de los frutos el pH sea claramente alcalino. La difusión de componentes al medio de cultivo puede en esta variedad ser más lenta que en otras, pero el alto nivel en la concentración de azúcares de sus frutos, y por tanto su rápida tendencia a la fermentación, ha impedido conocer hasta la fecha que en el interior del fruto quede retenido durante un corto período de tiempo cierta concentración de NaOH.

TABLA XXIII. Evolución de pH de la salmuera de fermentación y del jugo de los frutos de la variedad Manzanilla durante su elaboración como aceitunas de mesa según sistema tradicional.

Días	Valor de pH	
	Salmuera	Fruto
0	—	—
4	8.28	8.44
6	6.93	7.28
8	5.49	6.67
10	5.49	5.17
14	4.56	5.40
19	4.76	5.41
20	4.65	5.08
26	4.57	4.83
30	4.60	4.69
33	4.52	4.55
40	4.42	4.61
50	4.46	4.53
54	4.35	4.44
89	4.21	4.33
104	4.25	4.45

Esta situación inicial marca ya de entrada unas características en la composición de pigmentos en los frutos, que van a inducir en el posterior proceso de fermentación sustanciales cambios, que pueden ser significativos con respecto a la transformación de pigmentos y color del producto final.

A los cuatro días de la colocación de los frutos en salmuera, en la variedad Manzanilla, el pH interno y externo del fruto difieren en 0.16 unidades, mientras que en la Gordal la diferencia se sitúa en 2.41. Parece evidente que en el caso de la aceituna Gordal el resto de NaOH que permanece en los frutos como consecuencia del tratamiento alcalino, tiene dificultad, posiblemente por selectividad en la permeabilidad de la piel, para ser eliminado, lo que se traduce en una velocidad más lenta para alcanzar el equilibrio entre el pH del jugo del fruto y de la salmuera. Durante este tiempo los pigmentos clorofílicos soportan el efecto que sobre ellos ejercen los restos de NaOH presentes en los frutos, intensificado por la necesaria recirculación de salmuera para evitar fondos alcalinos en los fermentadores que propiciarían fermentaciones no deseables, dado que dicha recirculación provoca una cierta oxigenación de la salmuera. Esta oxigenación en un medio alcalino ha podido propiciar de forma acusada la desintegración de la estructura celular y provocar la oxidación de la molécula de clorofila con apertura del anillo isocíclico dando origen, por consiguiente, a la formación de los mencionados derivados Mg-clorina e_6 -fitol y Mg-rodina g_7 -fitol.

Cuando el pH del fruto alcanza un valor neutro, a los 5 días del proceso, comienzan a detectarse los derivados clorofílicos libres de ión magnesio procedentes de todos los anteriores compuestos, aunque en concentraciones muy insignificantes. Esta transformación propiciada básicamente por un medio ácido, consiste en el reemplazamiento del ión Mg^{2+} central de la molécula de clorofila por protones. En esta situación, las clorofilas *a* y *b* se degradan a sus correspondientes feofitinas, y los derivados oxidados del tipo clorina e_6 y rodina g_7 , pierden el ión Mg^{2+} . Dada la resistencia de los derivados clorofílicos de la serie *b* a perder el magnesio, la transformación que experimentan es más lenta en el tiempo que la ocurrida en la serie *a*.

Así mismo, en esta misma fase se aprecia la formación de pirofeofitina *a*, lo cual es indicativo de que la molécula de feofitina ha experimentado cierta descarbometoxilación en el C-13₂, reacción que está favorecida por la alta temperatura que reina en los recipientes donde se verifica el proceso, en las primeras fechas de la fermentación. Los fermentadores

se encuentran situados en patios al aire libre y, consecuentemente, están influenciados por la temperatura ambiente que a mediados de Septiembre y principios de Octubre, suele ser relativamente alta en la provincia de Sevilla, y a lo cual hay que añadir la propia elevación de temperatura que se genera en el interior de los fermentadores como consecuencia del inicio del proceso de fermentación. En este momento la fermentación es muy vigorosa, como lo demuestra el hecho de que el pH de la salmuera descienda bruscamente de 8.95 unidades a 5.36. Todos estos factores unidos podrían justificar la presencia de pirofeofitina *a*.

Al término de los 12 días de la colocación de los frutos en salmuera, el pH del medio y del propio fruto es claramente ácido y están próximos a un equilibrio (4.56 unidades en la salmuera y 5.71 en el fruto). En este momento, pasan a tener una considerable entidad los derivados clorofílicos libres de ión Mg^{2+} , correspondientes a la serie *a*, mientras que en la serie *b* no se observa prácticamente transformación. La concentración de clorofila *a* experimenta un gran descenso (alrededor de la mitad), que se traduce en un incremento en feofitina *a*. De manera análoga ocurre con la mayoría del derivado Mg-clorina e_6 -fitol, que da lugar a clorina e_6 -fitol. En paralelo, se detecta otro compuesto con idénticas características espectrales que clorina e_6 -fitol pero con menor polaridad. Al poseer la molécula de clorina grupos carboxílicos en los átomos C-13¹, C-15² y C-17³, ofrece varias opciones de esterificación lo cual conllevaría cambios en su polaridad pero no modificaría su espectro de absorción electrónica. En la bibliografía se describe la formación de numerosos ésteres metílicos de estos compuestos. En este sentido, podría ocurrir que durante el proceso de fermentación láctica de las aceitunas, parte de la clorina e_6 -fitol que se va formando, se esterifique con algún alcohol producido durante dicho proceso. Aunque se ha intentado sintetizar este compuesto en el laboratorio, mediante la preparación de ésteres de clorina con diferentes alcoholes, no se ha tenido éxito y hasta el momento se desconoce el alcohol que lo esterifica, por lo que su identificación se realiza de forma tentativa y se considera que se trata de un ester de clorina e_6 -fitol, que se valora conjuntamente con clorina e_6 -fitol.

La concentración de pirofeofitina *a* aumenta sólo ligeramente, alcanzando un nivel de concentración a los 16 días, que mantiene ya casi constante hasta el final del proceso. El no progreso de su formación, directamente relacionada con temperaturas elevadas, es indicativo de que en los fermentadores se ha producido un descenso de temperatura, conforme avanza el proceso de elaboración, provocando una fermentación más pausada.

Durante esta etapa también se detecta la presencia de feoforbida y pirofeoforbida *a*, cuya pequeña concentración mantienen constante hasta el final de la fermentación. La formación de estos compuestos en este momento del proceso no había ocurrido en otras variedades de aceitunas, por lo que se tratará de explicar su aparición.

En primer lugar, se considera oportuno recordar que la desesterificación de clorofilas, ocurre mediante dos mecanismos, uno de origen enzimático por acción de clorofilasa y otro por hidrólisis química. En el primer caso, la pérdida de ión Mg^{2+} en la molécula del producto de reacción de clorofilasa sobre clorofila, que sería clorofilida, originaría feoforbida. Este compuesto también podría proceder de la desesterificación enzimática directa sobre el sustrato de feofitina. En principio ninguna de estas vías parecen ser, en este caso, las causantes de la formación de feoforbida y pirofeoforbida *a*, puesto que en ningún momento de la fermentación se ha detectado la formación de sus predecesores clorofilidas, ni incluso, cuando las condiciones podrían ser propicias para la activación de clorofilasa (primeros días de la colocación de los frutos en salmuera). Respecto a este punto, conviene enfatizar la importancia que puede tener el momento de recolección de los frutos sobre la presencia activa de la enzima en los mismos. Como se recordará del estudio del fruto durante su crecimiento y maduración en el árbol, en función del estado de madurez de las aceitunas, la actividad medida de clorofilasa variaba considerablemente. En base a esto, pudiera ser que en el momento de la recolección de los frutos para su elaboración como aceitunas de mesa, la enzima se encontrara en un mínimo de actividad y ésta sea la causa de la no detección de sus productos de reacción durante la fase de pH alcalino que pasa por el óptimo de activación de dicha enzima. También ha podido ocurrir, como se comentaba anteriormente, que la enzima se haya desnaturalizado por el elevado valor de pH en el interior del fruto.

El segundo mecanismo de desesterificación que menciona la bibliografía (Hynninen, 1973) consiste en la hidrólisis ácida o alcalina del fitol. El segundo supuesto tampoco es válido ya que cuando en el medio de fermentación el pH era alcalino, no se provocó en ningún momento la desesterificación de clorofilas. Al descartar las anteriores alternativas, sólo queda como posible la hidrólisis ácida, lo cual está en consonancia con las condiciones provocadas por el descenso del valor de pH, tanto en la salmuera como en el fruto. En base a esto la feoforbida encontrada podría provenir de feofitina o directamente de clorofila pero por hidrólisis ácida. Respecto a este punto, también conviene aclarar que en otras variedades

de aceitunas, ante valores análogos de pH, no se ha producido desesterificación propiciada por hidrólisis ácida.

Aunque en la bibliografía se atribuye a clorofilasa una actuación *in vitro* a pH alcalino, nosotros tenemos evidencia de que pudiera existir una isoenzima que lo hiciera a pH ácido (Mínguez et al., 1993b). Por otro lado, Takeda et al., (1989) también han detectado la formación de feoforbida *a* y pirofeoforbida *a* a pH ácido, durante la fermentación en salmuera del vegetal japonés "takana", y atribuyen su origen a la acción de enzimas clorofilasa procedentes de bacterias. Si la hidrólisis fuera de origen químico, la formación de feoforbidas hubiera sido mayor ya que sus predecesores están suficiente tiempo a valor de pH ácido, como para que la reacción hubiera proseguido indefinidamente mientras que las condiciones fueran propicias. Además, con seguridad se habrían encontrado otros derivados desesterificados. La especificidad de la desesterificación encontrada más bien orienta hacia una débil hidrólisis enzimática. En todo caso, dada la pequeña aportación de estos compuestos en el balance total de pigmentos, el origen de su formación no tiene significación en la transformación general de clorofilas pero, no obstante, sí se tendrá en cuenta en las consideraciones finales, por la importancia que en esta variedad pudiera tener la presencia de una flora microbiana anómala.

Pasados 30 días el pH de la salmuera y del fruto están prácticamente equilibrados, alcanzando 4.0 - 4.5 unidades. Clorofila *a* ha experimentado una importante transformación y su concentración es ya muy inferior a la de feofitina *a* quien aumenta, lógicamente, en detrimento de la anterior. Clorofila *b* mucho menos lábil que la *a*, no resiste ya a este valor de pH a perder el magnesio y su concentración desciende notoriamente ocasionando la correspondiente formación de feofitina *b*. Llegados a este punto Mg-clorina e_6 -fitol está ausente y, consecuentemente, clorina e_6 -fitol alcanza su máxima concentración. La mínima concentración de Mg-rodina g_7 -fitol se traduce en un notorio incremento en rodina g_7 -fitol que está próximo a su máximo, detectándose también otro derivado con igual espectro de absorción que este último, pero menos polar. Tras realizarse con este compuesto un estudio análogo al identificado como ester de clorina e_6 -fitol, descrito anteriormente, pero partiendo de rodina g_7 -fitol, se llega a las mismas conclusiones y se identifica tentativamente como ester de rodina g_7 -fitol, el cual se valora de forma conjunta con el anterior. A partir de este momento, el valor de pH en la salmuera disminuye muy poco y las modificaciones

estructurales de pigmentos siguen su curso, aunque de manera más lenta, detectándose también al final trazas de feoforbida *b*.

En la fracción carotenoide se constata que en la primera etapa de la fermentación, los pigmentos iniciales en el fruto fresco permanecen inalterados. Posteriormente, durante el proceso de aderezo, sólo se afectan aquellos componentes que por su estructura molecular son sensibles al medio ácido. Los niveles de β -caroteno y luteína se mantienen a lo largo de toda la fermentación. Violaxanteno, con dos grupos 5,6-epóxidos en su molécula, debido al pH ácido del medio, se transforma inicialmente en luteoxanteno (con un grupo 5,6- y otro 5,8-epóxido) y finalmente en su isómero auroxanteno (con dos grupos 5,8-epóxidos). Anteraxanteno y neoxanteno, ambos con grupos 5,6-epóxidos en su molécula evolucionan, por la misma causa, a los isómeros 5,8-epóxidos, dando lugar a mutatoxanteno y neocromo respectivamente, aunque este último no se detecta hasta muy avanzado el proceso.

Una vez concluída la fase de curado, aproximadamente a los tres meses de iniciarse el proceso de elaboración, los frutos pueden ya comercializarse para su consumo. El color que mostraron distaba mucho del característico verde-amarillento de otras variedades de aceitunas de mesa, ya que habían adquirido una tonalidad verde-plomiza, tal como suele ocurrir con esta variedad.

La transformación estructural de clorofilas ocurrida en los frutos se muestra en la Figura 17, y en la 18, la correspondiente a carotenoides. En el producto final la pigmentación responsable del color se debe a la mezcla de los siguientes compuestos. En la fracción verde, la presencia mayoritaria es de feofitinas, clorina e_6 -fitol y rodina g_7 -fitol, parte de estos dos últimos esterificados, y una mínima aportación de pirofeofitina *a*, pirofeoforbida *a* y feoforbidas. En la fracción amarilla, luteína es el pigmento mayoritario, seguido de β -caroteno. Neocromo, auroxanteno y mutatoxanteno, tienen una mínima aportación.

3.- Mecanismo de la degradación.

El balance total de materia pigmentaria evidencia que durante el proceso de elaboración de aceitunas de mesa, existe un lento pero progresivo descenso, tanto en la concentración de la fracción clorofílica (Tabla XIX), como en la carotenoide (Tabla XXII). Al comparar el

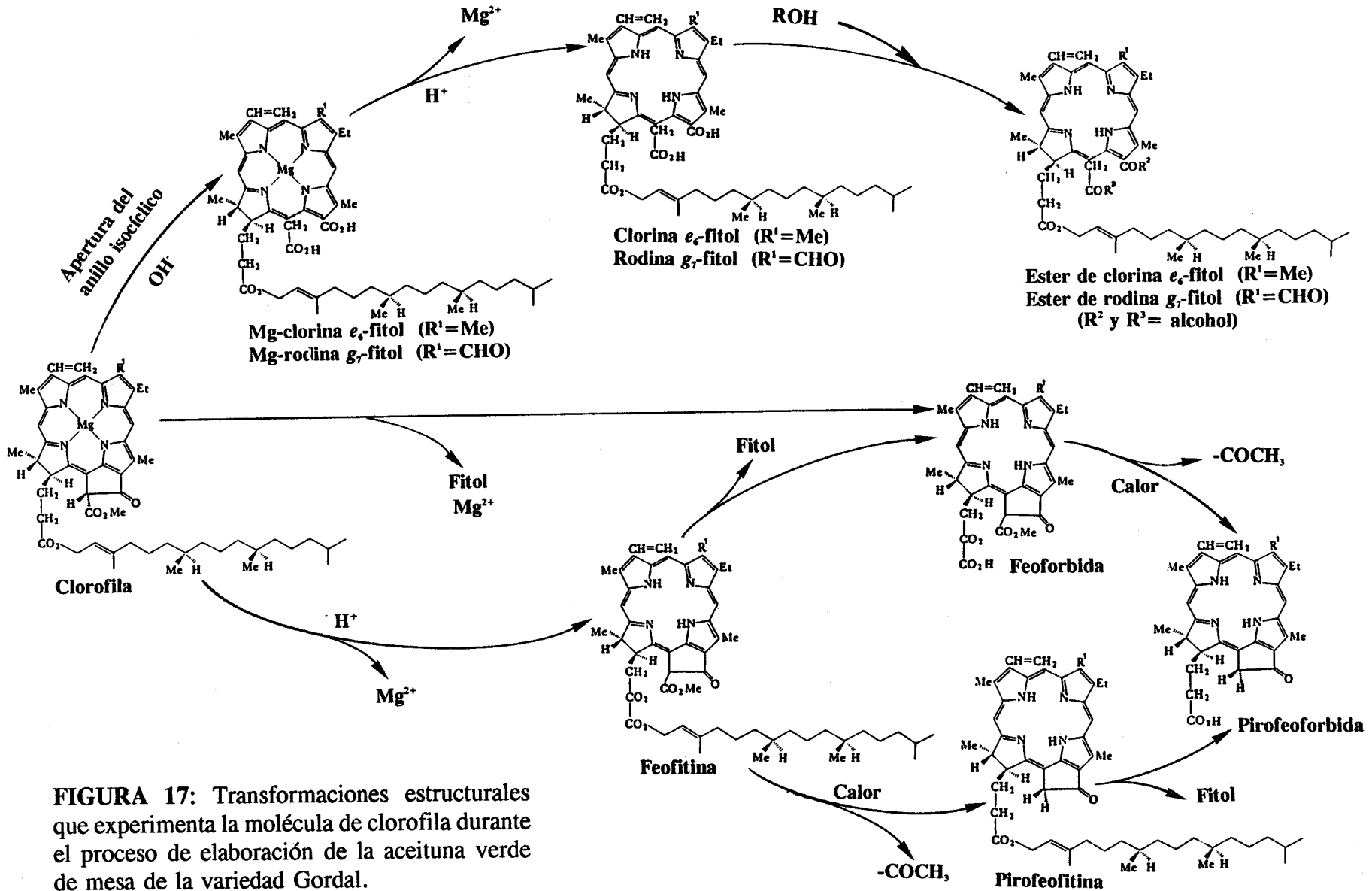


FIGURA 17: Transformaciones estructurales que experimenta la molécula de clorofila durante el proceso de elaboración de la aceituna verde de mesa de la variedad Gordal.

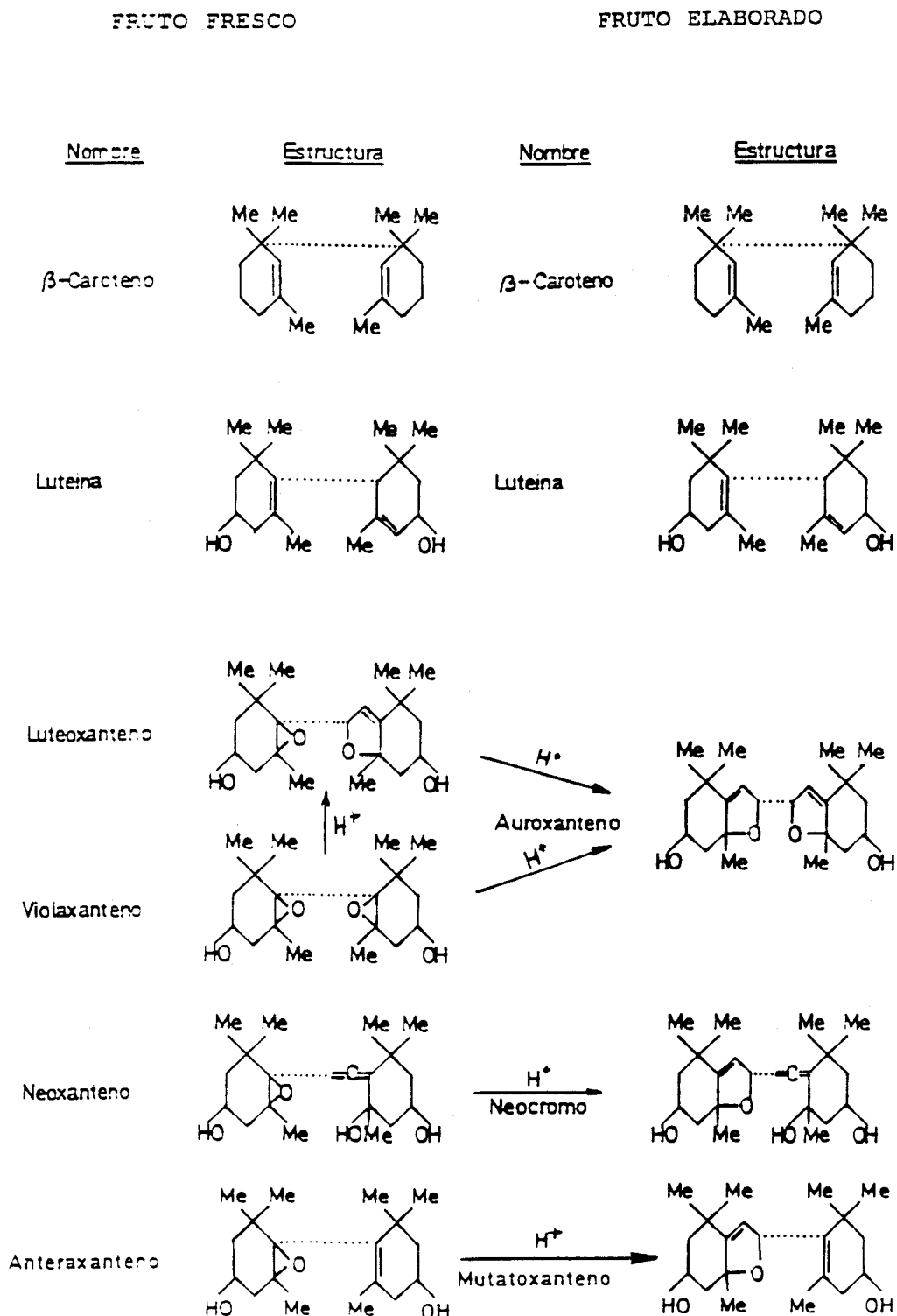


FIGURA 18: Transformaciones estructurales que experimentan los carotenoides durante el proceso de elaboración de la aceituna verde de mesa de la variedad Gordal.

contenido en pigmentos del fruto elaborado respecto al inicial en el fruto fresco, la pérdida es considerable siendo para las clorofilas *a* y *b* de un 27.22% y 46.80% respectivamente. Así mismo, para los carotenoides mayoritarios, el descenso que se mide en su concentración es de un 34.13% para β -caroteno y un 43.38% para luteína, siendo para el resto de los carotenoides de más de un 80%. En el procesado tradicional de otras variedades, el balance total de materia clorofílica y carotenoide se mantiene prácticamente constante a lo largo de todo el proceso. Esto induce a pensar que en esta ocasión se han producido reacciones oxidativas que dan lugar a productos incoloros no detectables, lo cual está en consonancia con la detección de compuestos clorofílicos altamente oxidados.

La evolución de la transformación de los pigmentos clorofílicos mayoritarios en el transcurso del proceso queda reflejado en la Figura 19. Como puede comprobarse, la caída de la concentración de clorofilas *a* y *b* en el primer día de la colocación de los frutos en salmuera, coincide con la aparición de Mg-clorina e_6 -fitol y Mg-rodina g_7 -fitol, respectivamente. A partir de este momento, en cada serie de pigmentos, su concentración se mantiene prácticamente constante hasta llegar al día 12 en el que se aprecia un descenso grande de cada compuesto, a favor de la aparición de los correspondientes derivados libres de ión Mg. Llegados a este punto, dicha transformación continúa hasta el final del proceso, aunque para el caso de feofitinas, su concentración no llega a alcanzar los niveles iniciales de clorofilas, a pesar de su total desaparición.

Como consecuencia de todo el estudio, se puede deducir que el cambio de color que experimentan los frutos de la variedad Gordal durante el proceso de elaboración de aceitunas verdes de mesa, se debe a la modificación estructural de pigmentos originada por el valor de pH en el interior de los frutos: altamente alcalino al inicio del proceso y ácido una vez instaurada la fermentación láctica. El mecanismo de degradación de pigmentos se muestra en la Figura 20. La degradación de la fracción clorofílica dista notoriamente de la encontrada en el fruto sometido a una fermentación espontánea según el proceso tradicional, cuyo mecanismo de degradación se recoge, a título comparativo, en la Figura 21, para la variedad Manzanilla.

Claramente se desprenden las diferentes vías de transformación de la fracción clorofílica. Las diferencias existentes son imputables directamente a los valores de pH que han prevalecido en el interior de los frutos.

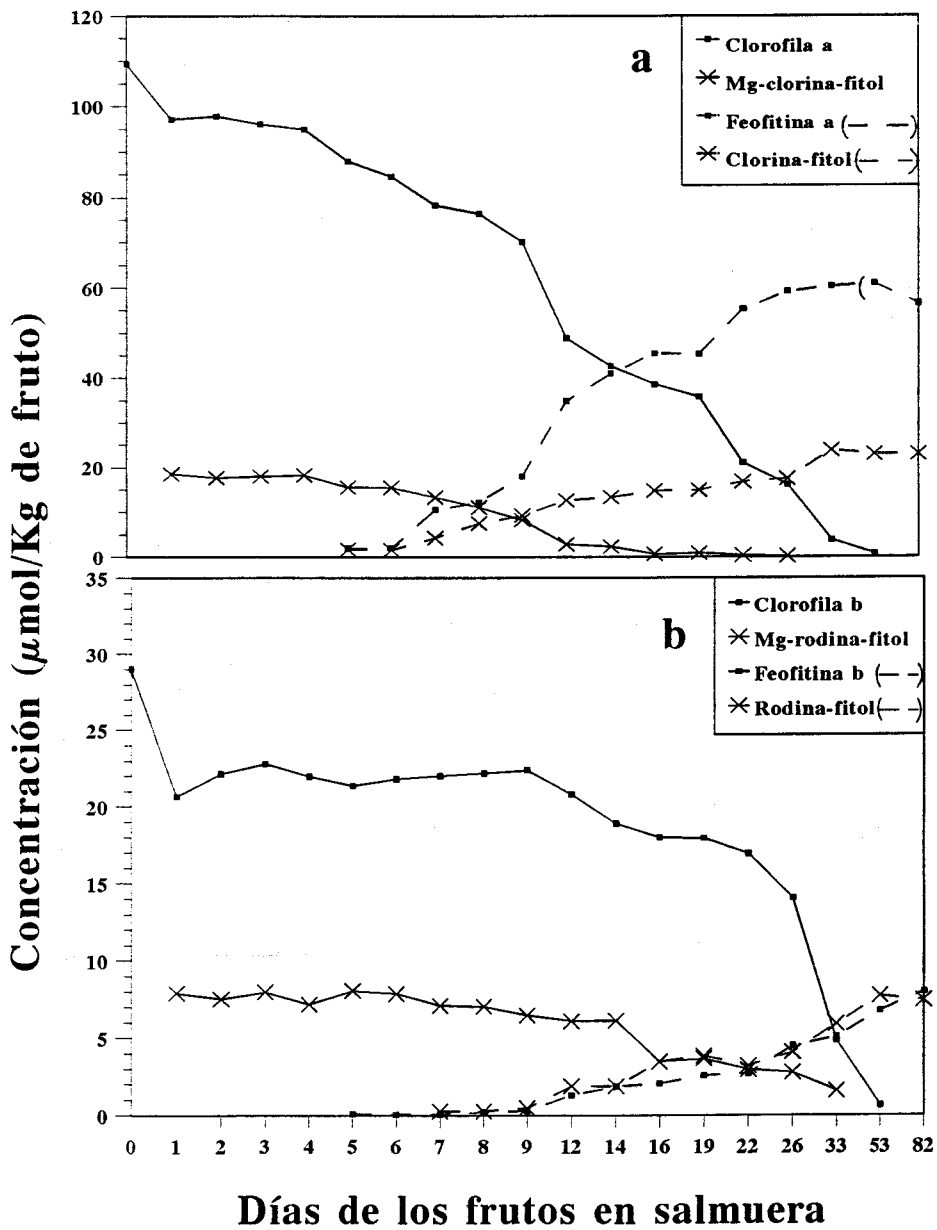


FIGURA 19: Evolución de la concentración de los pigmentos clorofílicos mayoritarios durante el transcurso del proceso de fermentación.

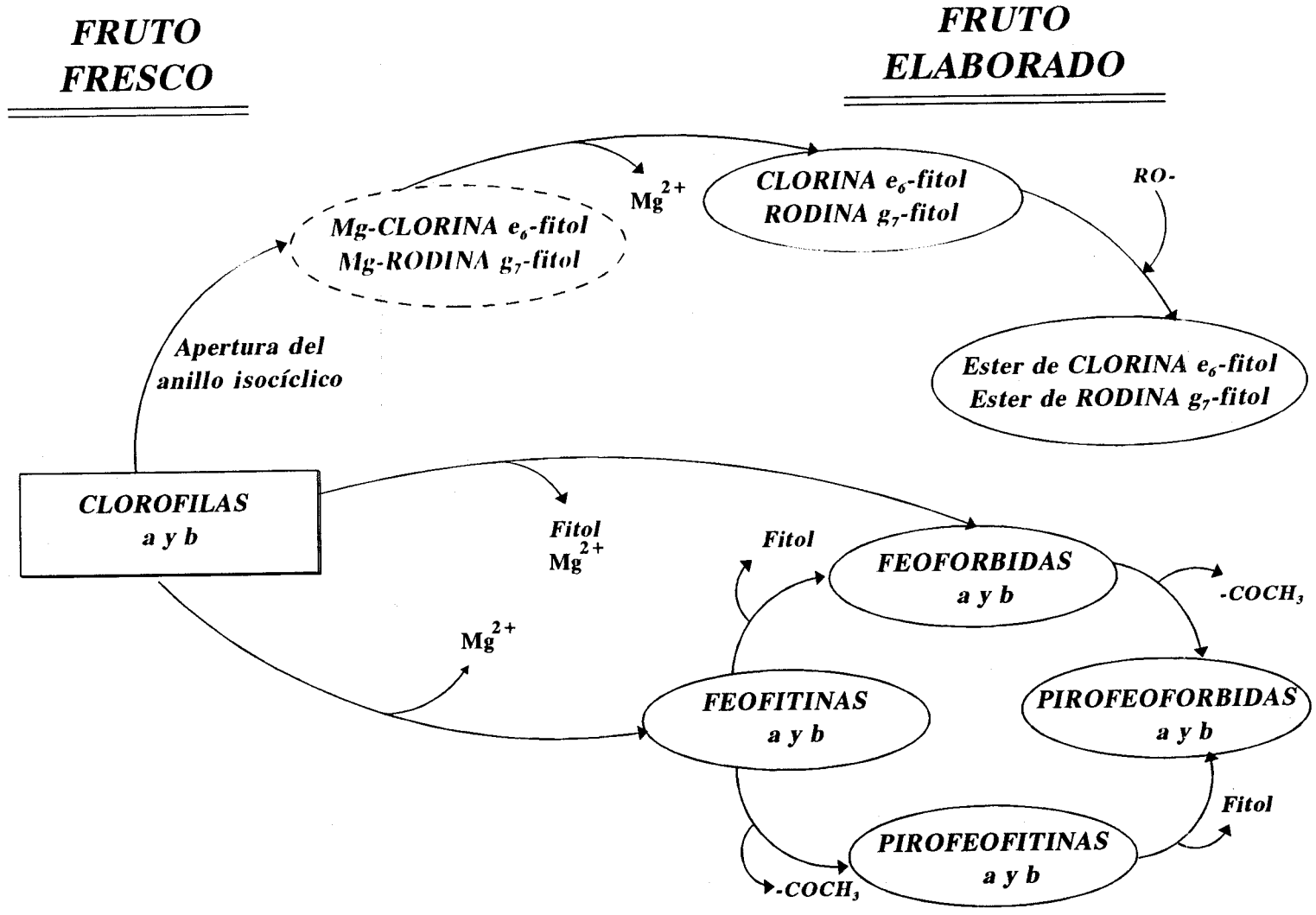


FIGURA 20: Mecanismo de degradación de clorofilas durante el proceso actual de fermentación láctica de aceitunas de la variedad Gordal.

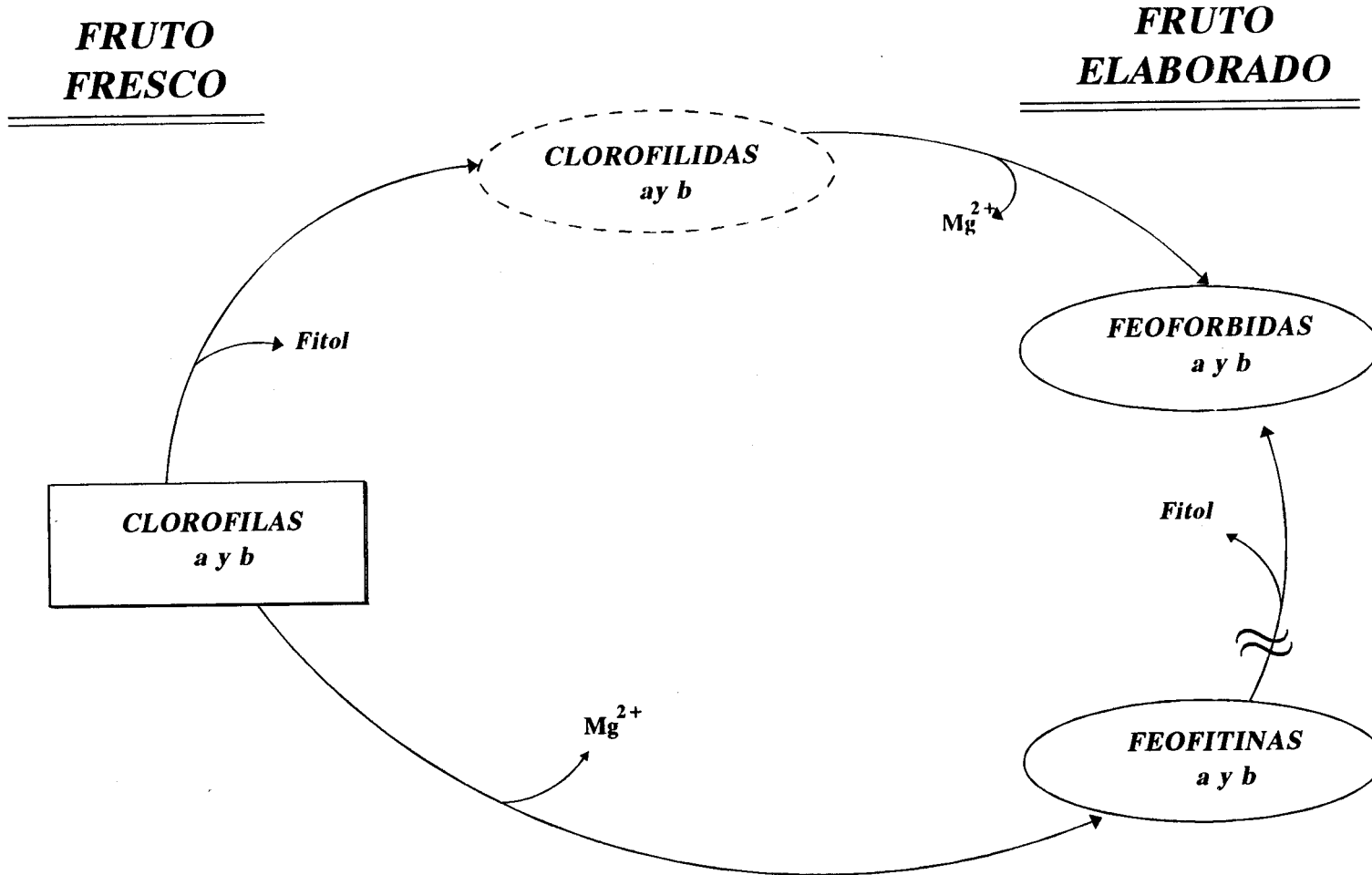


FIGURA 21: Mecanismo de degradación de clorofilas durante el proceso tradicional de fermentación láctica de aceitunas de la variedad Manzanilla.

V. ALTERACION MANCHA VERDE

1. Identificación de pigmentos.

En la bibliografía se encuentra reflejado un tipo de alteración que se conoce como el reverdecimiento de vegetales y que está causado por la formación de compuestos metaloclorofílicos. Este reverdecimiento afecta de forma uniforme al producto en concreto y de hecho se utiliza esta propiedad para el mantenimiento del color verde en vegetales enlatados. En este sentido, los derivados clorofílicos, feofitinas y feoforbidas, en presencia de Cu y Zn forman los respectivos complejos metálicos que son de color verde intenso y muy estables (Schanderl et al., 1965; Segner et al., 1984; Laborde y von Elbe, 1990).

En base a estas premisas y aunque el problema de la mancha verde en aceitunas Gordales, como se comenta en la introducción, aparentemente difiere bastante del caso anterior (Figura 22), no era descartable la posibilidad de intervención de estos complejos en dicha coloración, por lo que uno de los primeros puntos a dilucidar fue la influencia de la adición de estos metales a la salmuera de aceitunas que no presentaban alteración. En pocos días, los frutos a los que se les añadió sal de cobre reverdecieron, pero en ningún caso aparecieron las manchas localizadas y el color, verde brillante, no recordaba en nada al verde azulado de la alteración. Los sometidos a la influencia de sales de zinc, no modificaron su color externo.

Para conocer de qué forma, estos tratamientos podían alterar la composición clorofílica de los frutos, se prepararon los correspondientes extractos de pigmentos a partir de los frutos sometidos a los tratamientos anteriores, y se cromatografiaron en TLC en las condiciones usuales. El cromatograma obtenido, evidenció que los frutos tratados con Cu habían modificado notoriamente las características de su desarrollo pues, bajo luz blanca, las bandas correspondientes a compuestos clorofílicos habían experimentado un cambio drástico de color, reverdeciendo en todos los casos y perdiendo parte de la fluorescencia fresa bajo luz ultravioleta, dando paso a la visualización de zonas oscuras. En las muestras tratadas con sales de Zn, el cromatograma no se modificó ni bajo luz blanca, ni ultravioleta. Estos resultados evidenciaron la necesidad de conocer bajo qué forma se había originado en la molécula de clorofila, la incorporación del Cu o Zn, por lo que se decidió estudiar en detalle

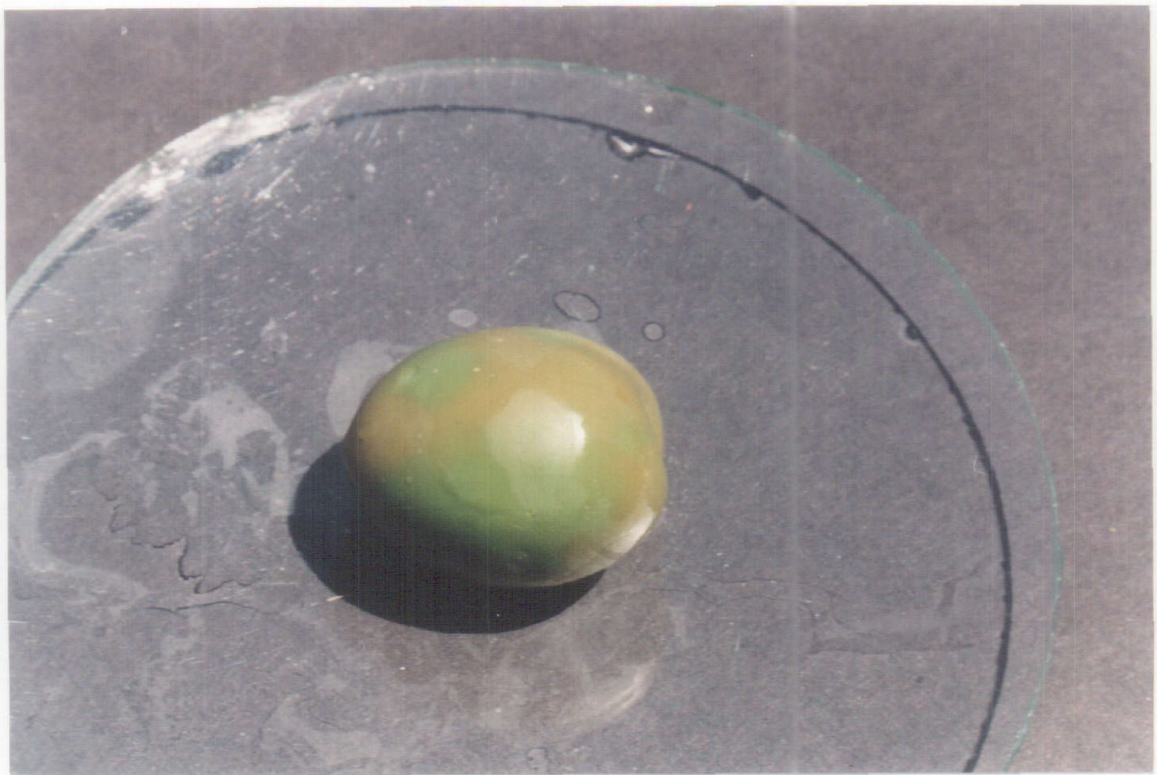


FIGURA 22: Fotografías de aceitunas de la variedad Gordal que presentan la alteración "Mancha verde" en diferente grado de desarrollo.

el comportamiento de estos complejos metaloclorofílicos. Con tal finalidad se preparan en el laboratorio a partir de feofitinas y pirofeofitinas *a* y *b*, patrones de los respectivos complejos con los metales Cu y Zn, y se procede a estudiar de forma individualizada, las características cromatográficas y espectrales que muestran estos compuestos. Así mismo, se comprobó si las condiciones cromatográficas normales de separación de pigmentos en la aceituna, servían para resolver con eficacia la mezcla de patrones. Los resultados encontrados se resumen en la Tabla XXIV. Es de destacar, que los complejos clorofílicos de Cu pierden la fluorescencia fresa bajo luz UV, mientras que los de Zn la mantienen y, con respecto a los espectros de absorción electrónica de los mismos, la forma y localización de los máximos de absorción experimentan cambios muy significativos para los complejos de Cu mientras que para los de Zn, la diferencia estriba únicamente en la localización de los máximos, ya que la forma se mantiene.

Llegados a este punto, se pasó a investigar si en los frutos alterados con "manchas verdes", estos compuestos formaban parte de la anómala coloración. A partir de frutos con y sin mancha verde, se preparan los respectivos extractos de pigmentos libres de materia grasa y se cromatografían en paralelo en TLC usando las condiciones estándar. Las características del cromatograma obtenido se muestra en la Figura 23 y de su simple observación visual se derivan importantes diferencias y deducciones.

En primer lugar, queda patente que los valores de R_f que presentan los derivados metaloclorofílicos (Tabla XXIV), coinciden con los que muestran las feofitinas propias del fruto, lo cual descarta que en las condiciones cromatográficas empleadas se pueda detectar la presencia de aquellos compuestos. En este sentido además, y justo en la zona comprendida entre los valores de R_f 0.49 y 0.63, propia de feofitinas, aparecen un acúmulo de bandas solapadas con fluorescencia fresa bajo luz UV, en el extracto correspondiente a fruto alterado y que están ausentes en la muestra de fruto sano. Este hecho puso de manifiesto que en el fruto alterado se habían originado un mayor número de productos de degradación, que en las condiciones ensayadas distorsionan el cromatograma. Se procedió pues, a raspar y eluir con acetona la pigmentación comprendida en el mencionado intervalo de R_f y, una vez concentrado su volumen en rotavapor, se volvió a cromatografiar la solución en TLC modificando la polaridad del eluyente, al objeto de conseguir movilidad entre los componentes problema. Con la mezcla hexano/piridina/dietilamina (7:1:0.5) se separan dos nuevas bandas

TABLA XXIV. Características espectroscópicas y cromatográficas en TLC de los patrones metaloclorofílicos de Cu y Zn obtenidos en el laboratorio.

Pigmento	R _f ^{a)}	Color en placa		Máximos de absorción en éter etílico
		luz blanca	luz UV	
Pirofeofitina <i>a</i> -Cu	0.63	Verde azulado	Mancha oscura	398,422,504,548,606,650
Pirofeofitina <i>a</i> -Zn	0.63	Verde	Fluorescencia fresa	376,406,425,522,564,606,656
Feofitina <i>a</i> -Cu	0.57	Verde azulado	Mancha oscura	398,422,504,548,606,650
Feofitina <i>a</i> -Zn	0.57	Verde	Fluorescencia fresa	376,406,425,522,564,606,656
Pirofeofitina <i>b</i> -Cu	0.55	Verde	Mancha oscura	438,520,584,628
Pirofeofitina <i>b</i> -Zn	0.55	Verde	Fluorescencia fresa	445,637
Feofitina <i>b</i> -Cu	0.53	Verde	Mancha oscura	438,520,584,628
Feofitina <i>b</i> -Zn	0.53	Verde	Fluorescencia fresa	445,637

a) Soporte cromatográfico: Silicagel GF₂₅₄; Líquido de desarrollo: Eter de petróleo (65-95°C)/acetona/dietilamina.

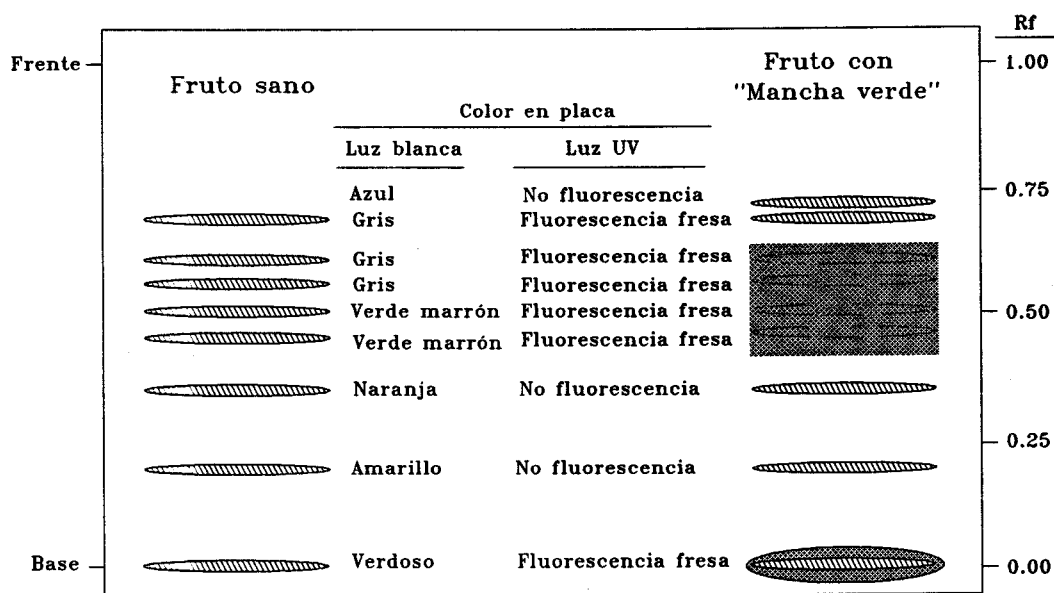


FIGURA 23: Esquema del cromatograma de TLC del extracto de pigmentos de: frutos sanos y frutos con "Mancha verde". Soporte: Silicagel 60GF₂₅₄. Líquido de desarrollo: éter de petróleo (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1).

(R_f 0.44 y 0.36) con coloración verde y sin fluorescencia fresa bajo luz UV (Tabla VI, apartado de Identificación). Es de destacar otra vez respecto a este último punto, que una de las propiedades más llamativas que poseen los complejos clorofílicos de Cu, es la ausencia de fluorescencia fresa bajo luz UV, mientras que los de Zn la mantienen. Al comparar las características cromatográficas y espectroscópicas de estos compuestos con las mostradas por los complejos metaloclorofílicos (Tabla XXIV), la primera banda verde del fruto alterado se corresponde con el complejo cúprico de pirofeofitina *a* y la segunda con el de feofitina *a*. Así mismo, la forma y máximos de los espectros de absorción coinciden con los de tales compuestos.

En segundo lugar, y volviendo al desarrollo de TLC de la Figura 23, destaca una banda de color azulado bajo luz blanca (BA-1), con valor de R_f 0.72 en el fruto alterado, ausente en el fruto testigo y que no muestra fluorescencia fresa bajo luz ultravioleta. En la Figura 24 se facilita su espectro de absorción electrónica.

Finalmente, y como última diferencia visual, hay que mencionar que en la base del cromatograma aparece una zona verdosa y difusa en el fruto alterado, ausente en el correspondiente sano. Tras ser raspada y eluída de la placa, y vuelta a cromatografiar en TLC de fase reversa con la mezcla solvente metanol/acetona/agua (20:4:3), su desarrollo revela como única diferencia respecto a un fruto sano, la presencia de otra nueva banda de color azul bajo luz blanca (BA-2) y sin fluorescencia fresa bajo luz UV, con valor de R_f 0.12. Este compuesto muestra exactamente el mismo espectro de absorción electrónica que el de la otra banda azul comentada anteriormente, BA-1, de la que únicamente difiere en su polaridad.

Las pruebas de identificación realizadas sobre ambos compuestos, evidencian que en los dos casos, y al margen de poseer análogo espectro de absorción, está presente el alcohol fitol. Puesto que la única diferencia encontrada entre ellos radica en su distinta polaridad, es probable que en la molécula de estos compuestos estén presentes grupos carboxílicos que propicien formas más o menos esterificadas.

Su coloración azul bajo luz blanca y la ausencia en ambos casos de fluorescencia fresa bajo luz UV, orientó su identificación hacia posibles complejos de derivados clorofílicos de cobre, pero sus características en ningún caso se asemejaban con las mostradas por los distintos patrones de complejos metaloclorofílicos obtenidos en el laboratorio, ni se

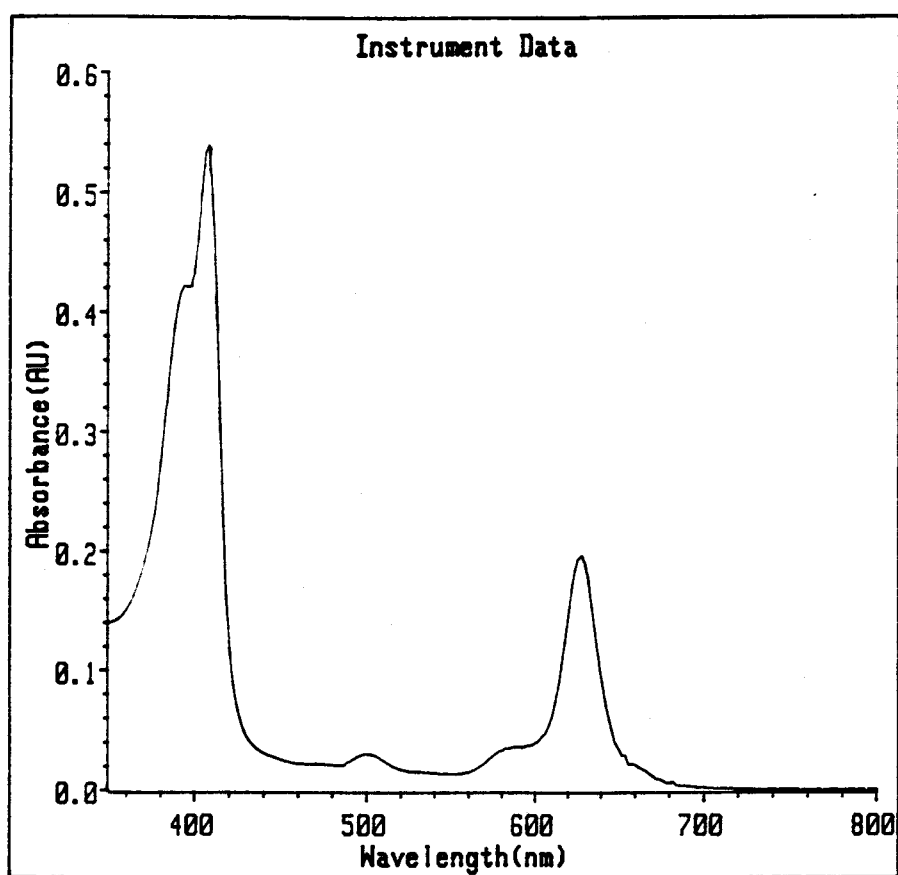


FIGURA 24: Espectro de absorción electrónica en éter etílico de la banda BA-2.

encontraban descritas en la bibliografía. Como consecuencia, estaba claro que en el caso de ser un complejo de cobre, su identificación había que dirigirla hacia otros derivados clorofílicos de mayor degradación. No obstante, los resultados obtenidos habían ayudado a centrar bastante el problema, ya que permitían descartar determinadas estructuras para estos compuestos acotando, en cierta medida, las posibilidades existentes.

Llegados a este punto, y ante la carencia de datos bibliográficos, se decidió dirigir el estudio hacia la formación de nuevos complejos de Cu a partir de los restantes derivados clorofílicos presentes en los frutos. Dado que la formación de clorina e_6 -fitol en aceitunas elaboradas de la variedad Gordal fue una novedad desde el primer momento, se pensó en la posibilidad de su acomplejación con Cu. Para ello, se puso en contacto una solución de dicho pigmento en acetona, con otra acuosa de CuCl_2 de manera análoga a como se prepararon los derivados de feofitinas con Cu. Transcurrida 1 hora se añadió éter etílico a la mezcla separándose dos fases, la etérea de color azulado, y la acuosa que quedaba incolora. Tras el tratamiento se comprueba directamente la transformación del pigmento por el cambio de color experimentado en la solución, que inicialmente era gris-marrón, y tras la reacción, pasa a ser azulada lo cual confirmaba la formación del complejo metálico.

Al inyectar una alícuota de la solución obtenida, en el cromatógrafo de HPLC, el resultado fue la aparición de un pico que presentaba idéntico espectro de absorción electrónica que el mostrado por ambas bandas azules. El nuevo compuesto formado eluye a un tiempo de retención (13-14 min), que coincide con el correspondiente a la banda BA-2 que queda retenida en la base del cromatograma de TLC en el sistema de desarrollo descrito en la Figura 23, y que se conseguía separar por cromatografía en capa fina de fase reversa. La co-cromatografía de este complejo de Cu con la banda BA-2, confirma, de forma tentativa, su identificación como clorina e_6 -fitol de Cu.

A su vez, la similitud encontrada en las características mostradas por los dos compuestos azules, excepto en la polaridad, orientó hacia la posibilidad de que la banda BA-1 se formara por acomplejación de Cu con el compuesto encontrado en la aceituna Gordal elaborada, e identificado tentativamente como ester de clorina e_6 -fitol. Para comprobar este punto, a partir del extracto de pigmentos de un fruto elaborado testigo, se separó por TLC el anterior compuesto y se eluyó con acetona, verificándose su pureza mediante la inyección de una alícuota en HPLC, para posteriormente tratarlo con una solución acuosa de CuCl_2 .

Transcurrido el tiempo de reacción, se observa el cambio de color experimentado por la solución. Las características del nuevo compuesto formado, espectro de absorción electrónica, color y valor de R_f en TLC y tiempo de retención (entre 23 y 24 minutos) en HPLC, coinciden en su totalidad con las mostradas por la banda BA-1, lo que permite identificarla tentativamente, como ester de clorina e_6 -fitol de Cu.

Aunque casi se tenía la seguridad de que las diferencias encontradas en el cromatograma de TLC de la Figura 23, se habían ya esclarecido, había que comprobar si los pigmentos identificados eran los únicos complejos metaloclorofílicos presentes en la mancha, o si existía algún otro de Zn, que había pasado inadvertido. Para ello se acudió al estudio de las distintas soluciones de pigmentos por HPLC. En la Figura 25 se muestran los cromatogramas de HPLC obtenidos a partir de: a) extracto de pigmentos libre de materia grasa, de aceitunas Gordales sanas de buen color; b) extracto análogo de aceitunas que presentan la alteración "Mancha verde" y c) mezcla de complejos metaloclorofílicos patrones de Cu y Zn. Para estos últimos, en la Tabla XXV se recogen las características cromatográficas y espectroscópicas obtenidas a partir del cromatograma de HPLC.

Como puede observarse claramente en la Figura 25b, correspondiente al cromatograma del fruto afectado, el aspecto más significativo a destacar radica en el estudio de los picos 10 y 15, y los marcados como F y H. Al comparar las características cromatográficas y espectroscópicas de estos componentes con los distintos patrones, se identifican los picos F y H como feofitina a de cobre y pirofeofitina a de cobre, respectivamente y, así mismo, los picos 10 y 15 corresponden a los identificados de forma tentativa, como clorina e_6 -fitol de Cu y ester de clorina e_6 -fitol de Cu. No se detecta ningún complejo metaloclorofílico de cinc.

En consecuencia, y como resultado del estudio de identificación, se puede concluir que en las aceitunas que muestran la alteración "Mancha verde" están presentes complejos metaloclorofílicos de cobre que contribuyen por tanto, a la coloración localizada de la citada alteración.

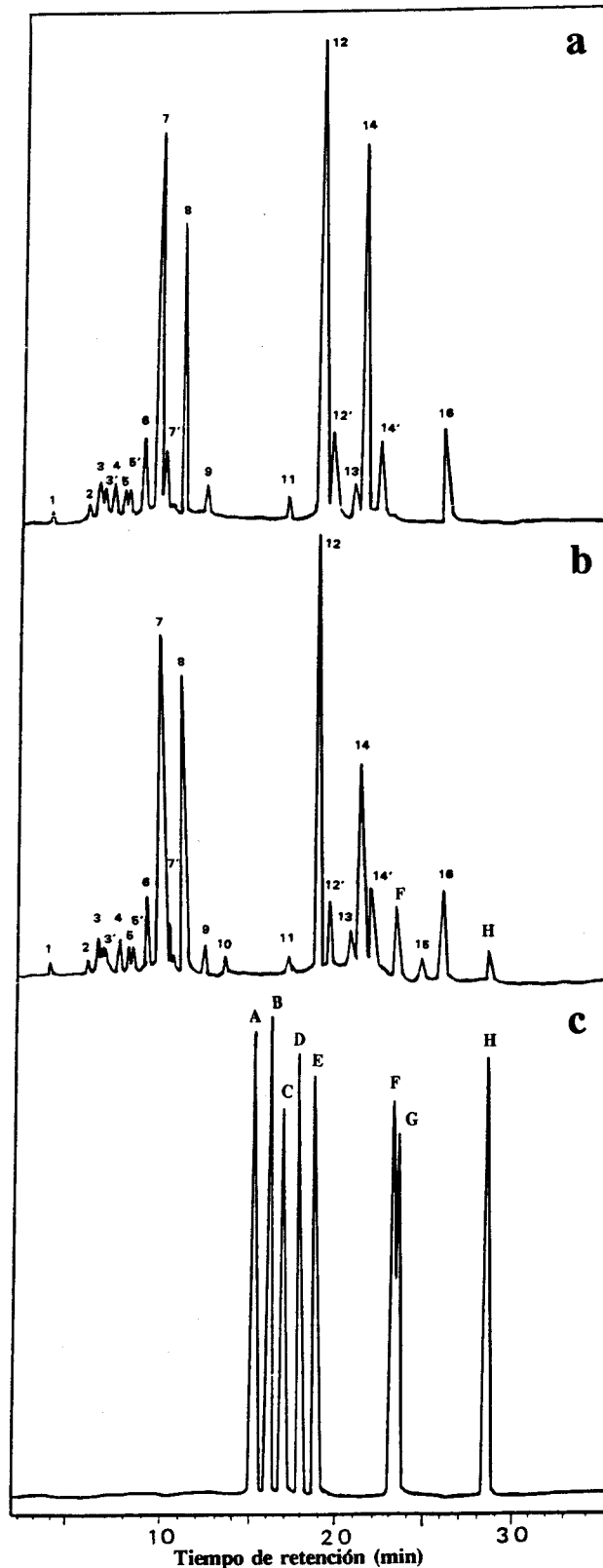


FIGURA 25: Cromatogramas de HPLC obtenidos a partir de: a) extracto de pigmentos libre de materia grasa de aceitunas Gordales sanas de buen color; b) extracto análogo de aceitunas que presentan la alteración "Mancha verde" y c) mezcla de patrones de complejos metaloclorofílicos de Cu y Zn. Identificación de picos: 1) feoforbida *b*, 2) feoforbida *a*, 3) neocromo, 3') isómero de neocromo, 4) pirofeoforbida *a*, 5) auroxanteno, 5') isómero de auroxanteno, 6) Mutatoxanteno, 7) luteína, 7') isómero de luteína, 8) rodina-*g*₇-fitol, 9) clorina-*e*₆-fitol, 10) clorina-*e*₆-fitol-Cu, 11) ester de rodina-*g*₇-fitol, 12) feofitina *b*, 12') feofitina *b*' , 13) ester de clorina-*e*₆-fitol, 14) feofitina *a*, 14') feofitina *a*' , 15) ester de clorina-*e*₆-fitol-Cu, 16) pirofeofitina *a*. A) feofitina *b*-Zn, B) pirofeofitina *b*-Zn, C) feofitina *a*-Zn, D) pirofeofitina *a*-Zn, E) feofitina *b*-Cu, F) feofitina *a*-Cu, G) pirofeofitina *b*-Cu, H) pirofeofitina *a*-Cu.

TABLA XXV. Características cromatográficas y espectroscópicas en el eluente de HPLC de los patrones metaloclorofílicos de Cu y Zn obtenidos en el laboratorio.

Pigmento	k ^{a)}	Máximos de absorción (nm)						Relación de máximos
		I	II	III	IV	V	VI	
Feofitina <i>b</i> -Zn	8.89	456	590	640				3.1 I/III
Pirofeofitina <i>b</i> -Zn	9.84	456	590	640				3.2 I/III
Feofitina <i>a</i> -Zn	9.93	(376)	(410)	428	(560)	610	656	1.2 III/VI
Pirofeofitina <i>a</i> -Zn	10.58	(376)	(410)	428	(560)	610	656	1.2 III/VI
Feofitina <i>b</i> -Cu	11.10	442	(564)	634				2.8 I/III
Feofitina <i>a</i> -Cu	14.17	402	424	548	604	655		1.1 II/IV
Pirofeofitina <i>b</i> -Cu	14.41	442	(564)	634				2.8 I/III
Pirofeofitina <i>a</i> -Cu	17.75	402	424	548	604	655		1.3 II/IV

a) k: Factor de capacidad = $(t_r - t_m)/t_m$.

2.- Intervención del cobre y zinc externo aportado por fungicidas.

- *Frutos procedentes de la experiencia de campo.*

Se siguió el control periódico de pigmentos y observación visual de los frutos sometidos al proceso de elaboración de aceitunas de mesa procedentes de árboles tratados con fungicidas y de los no tratados. Después de tres años de realizar estas experiencias no se ha observado anomalía alguna en la composición de pigmentos de los frutos ni se ha detectado aparición de manchas verdes, lo cual evidencia que los tratamientos fungicidas, por sí solos, no son los causantes del desarrollo de la mencionada alteración.

En la Tabla XXVI se ofrecen los valores de concentración de cobre y zinc encontrados en la pulpa de frutos con y sin tratamiento fungicida antes y después de ser elaborados. Como puede observarse no se aprecia tendencia alguna en ningún sentido. Incluso en el fruto elaborado no se mantiene el orden de concentración que se tenía en el fruto fresco.

TABLA XXVI. Análisis de cobre y zinc en frutos frescos y procesados de olivos fumigados.

Tratamiento	Concentración (mg/kg)			
	Fruto fresco		Fruto procesado	
	Cobre	Zinc	Cobre	Zinc
Ninguno	4.89	5.86	4.23	4.53
Fungicida A	4.25	5.62	4.37	5.07
Fungicida B	5.18	5.42	4.87	4.76

- Frutos alterados y suministrados por la industria.

En la Tabla XXVII se ofrecen los resultados encontrados tanto para los frutos que poseen la mancha verde como para los que aún estando en el mismo fermentador no se han alterado. Así mismo, como muestras testigo, se ofrecen los valores encontrados en frutos procedentes de fermentadores que no han presentado alteración. Cada uno de los datos recogidos representa la media de tres replicados. El estudio se realiza durante tres años consecutivos. En los dos primeros años los resultados muestran una tendencia a encontrar valores de cobre superiores en los frutos alterados mientras que en el tercer año la secuencia se invierte, hasta el punto de ser la zona con mancha verde la que muestra el valor más bajo.

Sin embargo, entre los frutos procedentes de distintas campañas la oscilación entre los niveles de cobre encontrados, tanto si existe alteración como si no, es muy acusada, alcanzando en algunos casos diferencias del 100%. Así, se da la circunstancia de que en frutos sanos se encuentran valores extremos en pulpa de 2.07 y 4.98 mg/kg y en frutos con manchas verdes de 2.55 y 4.95 mg/kg, que representan intervalos muy amplios y al mismo tiempo muy solapados.

Por tanto, los resultados obtenidos hasta la fecha no clarifican la hipótesis de que la formación de manchas verdes sea consecuencia del cobre aportado por los fungicidas. Se dan variaciones sustanciales en la presencia de cobre de unas muestras a otras, especialmente al comparar campañas, no siendo suficiente una determinada cantidad de cobre por sí sola para explicar la presencia de manchas verdes. De hecho, las muestras m-2,3,4,5 y 6 que presentan el problema tienen menor cantidad de cobre que los frutos sin mancha y que los sanos de las muestras m-1 y m-7.

3.- Evolución de la composición de pigmentos en frutos durante el progreso de la "Mancha verde".

En la Tabla XXVIII se muestran los valores de concentración encontrados para los distintos pigmentos clorofílicos presentes en diferentes muestras de aceitunas con alteración de mancha verde, distinguiendo para un mismo fruto la zona afectada (ZMV), de la que no lo está (ZSMV). Al objeto de acentuar diferencias, la toma de muestras se realizó recogiendo

TABLA XXVII. Concentración (ppm) de Cu y Zn en aceitunas verdes de mesa de la variedad Gordal con y sin alteración de "Mancha verde".

Campaña	Controles	Testigo	Fermentador			
			Alterado			
			Frutos		Zonas del fruto	
			sin MV	con MV	con MV	sin MV
1991						
	n° 1	3.47	3.45	4.38		
	n° 2	2.07		3.22		
	n° 3			2.55	2.93	
1992						
	n° 4	2.46	2.54	3.36		
	n° 5		1.91	3.11		
	n° 6			3.21	3.90	
1993						
	n° 7	4.98	4.64	4.95	4.42	4.63

TABLA XXVIII. Composición (μ moles/kg fruto) de los pigmentos clorofílicos presentes en distintas muestras de aceitunas con alteración de "Mancha verde", distinguiendo para un mismo fruto la zona afectada (ZMV), de la que no lo está (ZSMV).

Muestra	Serie a					Total	Serie b				Pigmentos totales
	Ff ^(a)	Fb ^(a)	C-f ^(b)	Ff-Cu ^(a)	C-f-Cu ^(b)		Ff ^(a)	Fb	R-f ^(b)	Total	
ZMV-1	64.21	2.73	10.34	6.38	9.78	93.41	13.04	0.18	4.61	17.83	111.24
ZMV-2	88.24	2.35	17.50	1.56	1.33	110.98	5.68	—	15.72	21.40	132.38
ZMV-3	68.52	3.29	13.31	6.78	8.17	100.07	14.00	0.20	5.01	19.21	119.28
ZMV-4	164.00	5.25	38.80	3.92	5.57	217.54	34.91	—	14.95	49.86	267.40
ZMV-5	146.60	6.29	20.01	5.69	6.08	187.67	37.51	0.56	9.34	47.41	235.08
ZMV-6	70.43	2.53	12.62	3.29	6.10	94.97	13.87	—	5.38	19.25	114.22
ZSMV-1	93.46	3.48	17.25	1.18	5.01	120.38	18.14	0.15	6.52	24.81	145.19
ZSMV-2	92.54	1.34	16.36	—	—	110.28	7.94	—	12.43	20.37	130.65
ZSMV-3	63.92	2.07	14.95	2.01	4.15	87.10	11.21	0.08	3.76	15.05	102.15
ZSMV-4	148.41	4.01	41.95	—	1.55	195.92	23.59	—	14.59	38.18	234.10
ZSMV-5	169.93	5.80	29.29	1.55	2.46	209.03	31.89	0.20	10.86	42.95	251.95
ZSMV-6	61.44	1.45	16.64	0.30	1.77	81.60	11.67	—	4.25	15.92	97.52

En los valores se incluye la aportación de: a) los respectivos piroderivados y b) los respectivos ésteres.

Ff: Feofitina; Fb: Feoforbida; C-f: Clorina e_6 -fitol; Ff-Cu: Feofitina de cobre; C-f-Cu: Clorina e_6 -fitol de Cu; R-f: Rodina g_7 -fitol.

únicamente la parte superficial del fruto, por ser la zona donde los pigmentos se encuentran acumulados. El porcentaje que representa cada familia de pigmentos respecto al contenido global de compuestos clorofílicos, se muestra en la Tabla XXIX.

Destaca la formación de complejos de Cu única y exclusivamente, con derivados clorofílicos de la serie *a*. En ningún momento se ha constatado la acomplejación metálica con los de la serie *b*. Es curioso también la detección de complejos de Cu en zonas del fruto sin mancha verde, aunque lógicamente su entidad es despreciable frente a la concentración que muestra la zona afectada, causa posiblemente por la cual no se visualiza su presencia como "mancha verde" en el fruto.

La composición porcentual evidencia que los derivados clorofílicos de la serie *a* están en distinta proporción en las dos zonas consideradas del fruto. Sin embargo, al diferenciar dentro del conjunto de compuestos clorofílicos, entre los que mantienen el anillo de porfirina intacto, feofitina *a*, feoforbida *a* y feofitina *a* de Cu y aquellos que han experimentado oxidación, clorina e_6 -fitol y clorina e_6 -fitol de Cu, y realizar los sumatorios correspondientes (Tabla XXX), se observa que los porcentajes globales sí se mantienen en unos valores muy aproximados en ambas zonas del fruto. Por otro lado, la presencia de feofitina *a* y clorina e_6 -fitol tiende siempre a ser algo inferior en la zona de mancha verde, mientras que feoforbida *a* se mantiene prácticamente constante en ambas partes distinguidas en el fruto. De ambas premisas puede claramente deducirse que la formación del complejo feofitina *a* de Cu va en detrimento de la concentración de feofitina *a* presente en dicha zona, lo que conlleva una disminución en la concentración del último pigmento a favor de la formación del primero, en la zona con mancha verde. De igual modo, la formación de clorina e_6 -fitol de Cu, a partir de clorina e_6 -fitol, es la causa de que éste se encuentre en menor proporción en la misma zona. Como consecuencia, queda explicado que el porcentaje de pigmentos que incluye feofitina, feoforbida y feofitina de Cu de la serie *a*, mantiene una relación prácticamente constante con los derivados oxidados clorina e_6 -fitol y su complejo de Cu.

Para los compuestos clorofílicos de la serie *b*, las proporciones que se miden en todas las muestras, excepto en la n^o 2, fluctúan dentro de unos límites muy estrechos, siendo unas veces ligeramente superior en la zona con mancha verde y otras ligeramente inferior. Por otro lado, la escasa presencia de feoforbida *b* en estos frutos, incluso no detectado en algunas muestras, evita comentario alguno sobre el mencionado pigmento. Los anteriores resultados,

TABLA XXIX. Composición porcentual de los pigmentos clorofílicos presentes en distintas muestras de aceitunas con alteración de "Mancha verde", distinguiendo para un mismo fruto la zona afectada (ZMV), de la que no lo está (ZSMV).

Muestra	Serie a						Serie b			
	Ff ^(a)	Fb ^(a)	C-f ^(b)	Ff-Cu ^(a)	C-f-Cu ^(b)	Total	Ff ^(a)	Fb	R-f ^(b)	Total
ZMV-1	57.72	2.45	9.29	5.74	8.79	83.97	11.72	0.16	4.14	16.03
ZMV-2	66.66	1.78	13.22	1.18	1.00	83.83	4.29	—	11.87	16.17
ZMV-3	57.44	2.76	11.16	5.68	6.85	83.90	11.74	0.17	4.20	16.10
ZMV-4	61.33	1.96	14.51	1.47	2.08	81.35	13.06	—	5.59	18.65
ZMV-5	63.64	2.68	8.51	2.42	2.59	79.83	15.96	0.24	3.97	20.17
ZMV-6	61.66	2.22	11.05	2.88	5.34	83.15	12.14	—	4.71	16.85
ZSMV-1	64.37	2.40	11.88	0.81	3.45	82.91	12.49	0.10	4.49	17.09
ZSMV-2	70.86	1.03	12.52	—	—	84.41	6.08	—	9.51	15.59
ZSMV-3	62.57	2.02	14.64	1.97	4.06	85.27	10.97	0.08	3.68	14.73
ZSMV-4	63.40	1.71	17.92	—	0.66	83.69	10.08	—	6.23	16.31
ZSMV-5	67.44	2.30	11.62	0.62	0.98	82.96	12.66	0.08	4.31	17.04
ZSMV-6	63.00	1.49	17.06	0.31	1.82	83.68	11.97	—	4.36	16.32

En los valores se incluye la aportación de: a) los respectivos piroderivados y b) los respectivos ésteres.

Ff: Feofitina; Fb: Feoforbida; C-f: Clorina e_6 -fitol; Ff-Cu: Feofitina de cobre; C-f-Cu: Clorina e_6 -fitol de Cu; R-f: Rodina g_7 -fitol.

TABLA XXX. Balance del porcentaje que representa sobre el total de pigmentos clorofílicos, los derivados de la serie *a* agrupados según tengan o no en su estructura el anillo isocíclico abierto.

Muestra	Tipo de anillo isocíclico				Relación (A/B)	
	Cerrado (A) ^{a)}		Abierto (B) ^{b)}		ZMV	ZSMV
	ZMV	ZSMV	ZMV	ZSMV		
1	65.91	67.58	18.08	15.33	3.65	4.41
2	69.62	71.89	14.22	12.52	4.90	5.74
3	65.88	66.56	18.01	18.70	3.66	3.56
4	64.76	65.11	16.59	18.58	3.90	3.49
5	68.74	70.36	11.01	12.60	6.19	5.58
6	66.76	64.80	16.39	18.88	4.07	3.43

a) A = Feofitina *a* + Feoforbida *a* + Feofitina *a* de cobre. (Incluye los respectivos piroderivados).

b) B = Clorina *e*₆-fitol + Clorina *e*₆-fitol de Cu. (Incluye los respectivos ésteres)

unidos a la no presencia en ninguna de las muestras de complejos de Cu con derivados clorofílicos de la serie *b*, conducen hacia la conclusión de que los pigmentos de la serie *b*, no contribuyen en la alteración "Mancha verde".

Análogas conclusiones se deducen al estudiar el fruto entero que presenta manchas verdes. En la Tabla XXXI se muestra la composición clorofílica de las mencionadas aceitunas clasificadas según el desarrollo de la alteración, así como la de los frutos testigos, entendiéndose como tales, tanto aquellos que proceden de fermentadores en los que no se ha producido anomalía alguna (fruto sano), como los que provienen de los que sí la han manifestado. Cada valor es el resultado medio de 10 replicados por muestra. La distinción realizada, en frutos que proceden de fermentadores afectados, según el grado de alteración, se describe a continuación:

- Grado 0: se engloba en este grupo a los frutos testigos en los cuales no se observa formación de mancha verde alguna, aunque proceden de fermentadores que también contienen aceitunas que sí han desarrollado la alteración.
- Grado 1: aceitunas con inicio de alteración, reflejada en la aparición de puntos verdes del tamaño de una cabeza de alfiler, y de muy difícil visualización.
- Grado 2: frutos en los que el desarrollo de la mancha verde alcanza aproximadamente el 10% de su superficie.
- Grado 3: se refiere a aceitunas con el 30-40% de su superficie cubierta de manchas verdes.
- Grado 4: frutos con gran extensión de mancha verde, alrededor del 70-80%.

Como puede observarse, las proporciones encontradas de feofitina *a* de Cu y de clorina e_6 -fitol de Cu, aumentan a medida que progresa la alteración en la superficie de la aceituna, en detrimento de sus predecesores feofitina *a* y clorina e_6 -fitol. Así mismo, en frutos en los que no se observan manchas verdes pero proceden de fermentadores en donde se ha producido la alteración, también se detectan los anteriores compuestos. Esto parece más bien orientar que, aunque en estos frutos no se haya advertido alteración, están en fase de inicio pero las cantidades formadas de pigmentos con cobre es aún tan ínfimo, que no llega a visualizarse su efecto.

TABLA XXXI. Composición de pigmentos clorofílicos en (μ moles/kg de fruto) y (%) en aceitunas con distinto grado de alteración de "Mancha verde", así como de frutos testigos procedentes de fermentadores en los que no se ha producido anomalía alguna, y de otros en los que sí se ha desarrollado la alteración.

Muestra	Serie a					Serie b				Pigmentos totales	
	Ff ^{a)}	Fb ^{a)}	C-f ^{b)}	Ff-Cu ^{a)}	C-f-Cu ^{b)}	Total	Ff ^{a)}	Fb	R-f ^{b)}		Total
Composición en μmol/Kg de fruto											
Fruto sano	47.34	2.34	15.33	—	—	65.01	8.47	0.03	5.03	13.53	78.54
MV-Grado 0	45.92	1.32	14.79	0.23	0.22	62.48	7.65	0.03	5.00	12.68	75.16
MV-Grado 1	43.93	1.44	13.30	0.40	0.75	59.82	9.02	0.07	4.10	13.19	73.01
MV-Grado 2	42.17	2.44	11.73	0.82	1.67	58.83	9.33	0.08	4.06	13.47	72.30
MV-Grado 3	42.94	3.50	11.26	1.23	3.08	62.01	8.03	0.12	4.19	12.34	74.35
MV-Grado 4	35.35	3.20	10.25	2.23	3.49	54.52	6.80	0.13	4.18	11.11	65.63
Composición porcentual											
Fruto sano	60.28	2.98	19.52	—	—	82.77	10.78	0.04	6.40	17.23	
MV-Grado 0	61.10	1.76	19.68	0.31	0.29	83.18	10.18	0.04	6.65	16.87	
MV-Grado 1	60.17	1.97	18.22	0.55	1.03	81.93	12.35	0.10	5.62	18.07	
MV-Grado 2	58.33	3.37	16.22	1.13	2.31	81.37	12.90	0.11	5.62	18.63	
MV-Grado 3	57.75	4.71	15.14	1.65	4.14	83.40	10.80	0.02	5.64	16.60	
MV-Grado 4	53.86	4.88	15.62	3.40	5.32	83.07	10.36	0.20	6.37	16.93	

En los valores se incluye la aportación de: a) los respectivos piroderivados y b) los respectivos ésteres.

Ff: Feofitina; Fb: Feoforbida; C-f: Clorina e_6 -fitol ; Ff-Cu: Feofitina de cobre; C-f-Cu: Clorina e_6 -fitol de Cu; R-f: Rodina g_7 -fitol

En cambio, en los frutos testigos, procedentes de fermentadores en los que no ha existido indicio alguno de formación de manchas verdes en las aceitunas, no se encuentra en ninguna de las muestras analizadas, la presencia de los complejos metaloclorofílicos de nueva formación.

En las Tablas XXXII, XXXIII y XXXIV se recogen los resultados obtenidos para la fracción carotenoide en cada una de las correspondientes muestras analizadas. En algunas de ellas la presencia de los carotenoides minoritarios es despreciable o incluso no llega a detectarse, lo que provoca ligeras fluctuaciones en las proporciones halladas para cada uno de los pigmentos frente al conjunto total de compuestos amarillos. En la Tabla XXXV se muestran los porcentajes que representan los compuestos clorofílicos y carotenoides frente al total de pigmentos. La relación que mantienen entre sí ambas familias de pigmentos no difiere considerablemente en las distintas muestras. Cuantitativamente, los niveles de concentración de la fracción carotenoide no se modifican significativamente en aceitunas afectadas por mancha verde, permaneciendo al margen de lo que es la propia alteración.

TABLA XXXII. Composición (μ moles/kg fruto) carotenoide en distintas muestras de aceitunas con alteración de "Mancha verde", distinguiendo para un mismo fruto la zona afectada (ZMV), de la que no lo está (ZSMV).

Muestra	β -c	Lut	Ncr	Mut	Aurox	Total
ZMV-1	5.79	8.45	0.25	0.17	0.80	15.46
ZMV-2	10.78	14.39	—	—	0.18	25.35
ZMV-3	6.93	9.16	—	—	0.08	16.17
ZMV-4	11.14	30.35	0.85	0.56	1.66	44.56
ZMV-5	11.39	23.44	2.83	1.01	1.21	39.88
ZMV-6	13.63	12.06	1.23	0.55	—	27.47
ZSMV-1	8.23	13.01	1.35	0.41	1.25	24.25
ZSMV-2	9.22	12.62	—	0.09	0.32	22.25
ZSMV-3	7.02	8.59	0.07	0.10	0.25	16.03
ZSMV-4	10.91	28.05	0.93	0.70	0.95	41.54
ZSMV-5	9.66	28.93	2.66	1.23	1.96	44.44
ZSMV-6	8.14	8.68	0.27	0.26	—	17.35

β -c: β -caroteno; Lut: Luteina; Ncr: Neocromo; Mut: Mutatoxanteno;
Aurox: Auroxanteno.

TABLA XXXIII. Composición (%) carotenoides en distintas muestras de aceitunas con alteración de "Mancha verde", distinguiendo para un mismo fruto la zona afectada (ZMV), de la que no lo está (ZSMV).

Muestra	β -c	Lut	Ncr	Mut	Aurox
ZMV-1	37.45	54.66	1.62	1.10	5.18
ZMV-2	42.52	56.76	—	—	3.14
ZMV-3	42.86	56.65	—	—	0.49
ZMV-4	25.00	68.11	1.91	1.26	3.73
ZMV-5	28.56	58.78	7.10	2.53	3.03
ZMV-6	49.62	43.90	4.48	2.00	—
ZSMV-1	33.94	53.65	5.57	1.69	5.16
ZSMV-2	41.44	56.72	—	0.40	1.44
ZSMV-3	43.79	53.59	0.44	0.62	1.56
ZSMV-4	26.26	67.53	2.24	1.69	2.29
ZSMV-5	21.74	65.10	5.99	2.77	4.41
ZSMV-6	46.92	50.03	1.56	1.50	—

β -c: β -caroteno; Lut: Luteína; Ncr: Neocromo;
Mut: Mutatoxanteno; Aurox: Auroxanteno.

TABLA XXXIV. Composición carotenoides en (μ moles/kg fruto) y (%) en aceitunas con distinto grado de alteración de "Mancha verde" y en frutos testigos.

<u>Muestra</u>	<u>B-C</u>	<u>Lut</u>	<u>Nc</u>	<u>Mut</u>	<u>Aurox</u>	<u>Total</u>
Composición en μmol/Kg de fruto						
Fruto sano	5.62	7.64	1.10	0.48	0.70	15.54
MV Grado 0	5.38	8.08	1.03	0.44	0.73	15.66
MV Grado 1	5.62	7.42	1.08	0.39	0.65	15.16
MV Grado 2	4.75	5.69	0.08	0.41	0.80	11.73
MV Grado 3	5.10	6.01	0.32	0.34	1.43	13.20
MV Grado 4	5.62	4.67	0.07	0.19	0.98	11.53
Composición porcentual						
Fruto sano	36.16	49.16	7.08	3.09	4.50	
MV Grado 0	34.36	51.60	6.58	2.81	4.66	
MV Grado 1	37.07	48.94	7.12	2.57	4.29	
MV Grado 2	40.49	48.51	0.68	3.50	6.82	
MV Grado 3	38.64	45.53	2.42	2.58	10.83	
MV Grado 4	48.74	40.50	0.61	1.65	8.50	

TABLA XXXV. Composición porcentual de pigmentos cloroplásticos en aceitunas con distinto grado de alteración de "Mancha verde", y en frutos testigos.

Muestra	Clorofilas									Carotenoides						Cl/Car ^{a)}	
	Serie a					Serie b				Total	β-C	Lut	Ncr	Mut	Aurox		Total
	Ff	Fb	C-f	Ff-Cu	C-f-Cu	Ff	Fb	R-f	Total								
<i>Fruto entero</i>																	
Fruto sano	50.32	2.49	16.29	—	—	9.00	0.03	5.35	83.48	5.97	8.12	1.17	0.51	0.74	16.52	5.05	
MV Grado 0	50.56	1.45	16.28	0.25	0.24	8.42	0.03	5.51	82.76	5.92	8.90	1.13	0.48	0.80	17.24	4.80	
MV Grado 1	49.82	1.63	15.08	0.45	0.85	10.23	0.08	4.65	82.81	6.37	8.42	1.22	0.44	0.74	17.19	4.82	
MV Grado 2	50.18	2.90	13.96	0.98	1.99	11.10	0.10	4.83	86.04	5.65	6.77	0.10	0.49	0.95	13.96	6.16	
MV Grado 3	49.05	4.00	12.86	1.40	3.52	9.17	0.14	4.79	84.92	5.83	6.86	0.37	0.39	1.63	15.08	5.63	
MV Grado 4	45.81	4.15	13.28	2.89	4.52	8.81	0.17	5.42	85.06	7.28	6.05	0.09	0.25	1.27	14.94	5.69	
<i>Zona del fruto</i>																	
ZMV-1	50.68	2.15	8.16	5.04	7.72	10.29	0.14	3.64	87.80	4.57	6.67	0.20	0.13	0.63	12.20	7.20	
ZMV-2	55.94	1.49	11.09	0.99	0.84	3.60	—	9.97	83.93	6.83	9.12	—	—	0.11	16.07	5.22	
ZMV-3	50.59	2.43	9.83	5.01	6.03	10.34	0.15	3.70	88.06	5.12	6.76	—	—	0.06	11.94	7.38	
ZMV-4	52.57	1.68	12.44	1.26	1.79	11.19	—	4.79	85.72	3.57	9.73	0.27	0.18	0.53	14.28	6.00	
ZMV-5	54.41	2.29	7.28	2.07	2.21	13.64	0.20	3.40	85.50	4.14	8.52	1.03	0.37	0.44	14.50	5.90	
ZMV-6	49.71	1.79	8.91	2.32	4.31	9.79	—	3.80	80.61	9.62	8.51	0.86	0.39	—	19.39	4.16	
ZSMV-1	55.16	2.05	10.18	0.70	2.96	10.71	0.09	3.85	85.69	4.86	7.68	0.80	0.24	0.74	14.31	5.99	
ZSMV-2	60.55	0.88	10.70	—	—	5.19	—	8.13	85.45	6.03	8.25	—	0.06	0.21	14.55	5.87	
ZSMV-3	54.09	1.75	12.65	1.70	3.51	8.49	0.07	3.18	86.44	5.94	7.27	0.06	0.08	0.22	13.56	6.37	
ZSMV-4	53.85	1.45	15.22	—	0.56	8.56	—	5.29	84.94	3.96	10.18	0.34	0.25	0.34	15.07	5.64	
ZSMV-5	57.33	1.96	9.88	0.52	0.83	10.76	0.07	3.66	85.01	3.26	9.76	0.90	0.41	0.66	14.99	5.67	
ZSMV-6	53.49	1.26	14.49	0.26	1.54	10.16	—	3.70	84.90	7.09	7.48	0.06	0.09	0.22	13.95	6.09	

a) Relación entre clorofilas totales y carotenoides totales.

CONCLUSIONES

1.- Factores intrínsecos:

- a.- Durante el proceso de crecimiento, desarrollo y maduración de la aceituna de la variedad Gordal, la composición en clorofilas y carotenoides es la propia del cloroplasto. No se han detectado acúmulos anormales de intermediarios biosintéticos, ni formación colateral de pigmentos no usuales. En consecuencia, tanto la fase biosintética como degradativa de pigmentos cloroplásticos en la aceituna Gordal, sigue el patrón evolutivo característico de tejidos verdes cuya coloración final es debida a pigmentos de otra naturaleza.
- b.- La enzima clorofilasa se encuentra presente en el fruto durante todo su ciclo vital, mostrando dos máximos de actividad biosintética que coinciden en el tiempo con el inicio y final de la fase de crecimiento vegetativo. El nivel de actividad clorofilasa del fruto en el momento de su recolección para su procesamiento como aceitunas verdes de mesa, condiciona irreversiblemente la posterior instauración de distintos procesos degradativos de la molécula de clorofila.

2.- Factores de procesado:

- a.- En la variedad Gordal, la degradación de clorofilas se conduce de forma muy distinta a la mostrada en otras variedades. Las características propias de este fruto promueven que al inicio del proceso fermentativo se implanten unas condiciones drásticas de pH alcalino, que provocan la formación de compuestos clorofílicos altamente oxidados. El balance de materia pigmentaria durante todo el proceso, evidencia un descenso notorio en la concentración de clorofilas y carotenoides, indicativo de que las condiciones que imperan en el medio fermentativo han propiciado la oxidación hacia productos incoloros de parte de los pigmentos inicialmente presentes en los frutos
- b.- Dado que la actividad de clorofilasa no es homogénea durante el crecimiento, desarrollo y maduración de los frutos, la ausencia de derivados desesterificados puede atribuirse a que los frutos han sido recolectados en una etapa de bajo contenido enzimático o a que la enzima se ha desnaturalizado por una excesiva concentración residual de NaOH en los frutos.

- c.- Descartada la actividad clorofilasa propia de los frutos y la hidrólisis alcalina y/o ácida, la atípica aparición de feoforbidas, una vez instaurado el proceso fermentativo, parece indicar la existencia de una flora microbiana con actividad hidrolítica tipo clorofilasa.
- d.- El mecanismo de degradación de la molécula de clorofila durante el proceso de elaboración de aceitunas verdes de mesa, está mediatizado únicamente por el valor de pH en el interior de los frutos: altamente alcalino al inicio del proceso y ácido una vez instaurada la fermentación láctica. La fracción carotenoide sólo se afecta en aquellos compuestos, con grupos 5,6-epóxido en su molécula, sensibles al medio ácido.

3.- Estudio de la alteración "Mancha verde":

- a.- En las aceitunas que muestran la alteración "Mancha verde" están presentes complejos metaloclorofílicos de cobre, cuya acumulación localizada es la responsable de dicha alteración. La fracción carotenoide no se modifica significativamente en las mismas aceitunas, permaneciendo al margen de lo que es la propia alteración.
- b.- La falta de correspondencia entre los niveles de cobre encontrado en los frutos y la presencia o ausencia de alteración, permite eliminar la posibilidad de que la procedencia del cobre que se inserta en la molécula de clorofila, sea de naturaleza exógena.
- c.- El inicio puntual y localizado de la alteración en varios frentes del fruto, unido a la progresiva expansión de la misma, orienta hacia la posible actuación de una flora microbiana y que se manifiesta casi de forma exclusiva en esta variedad. La especial morfología de este fruto, así como su peculiar composición, modifican las características de permeabilidad y difusión respecto a las otras variedades, pudiendo propiciar una distinta respuesta frente a los procesos osmóticos. En esta situación, la flora usual puede exhibir un comportamiento atípico o bien puede implantarse microorganismos ajenos al propio proceso.

BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Baki, A.A., "Changes in chlorophyll and carotene contents of green and bleached lima bean seeds during development and maturation". *J.A. Soc. Hort. Sci.*, 96 (1971) 576.
- Akcél, A., "Data on the color of green peas". *Lebensm. Wiss. Technol.*, 4 (1971) 167.
- Aczél, A., "The color change of green peas during technological operations". *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 2 (1973) 23.
- Amir-Shapira, K.; Goldschmidt, E., y Altman, A., "Chlorophyll catabolism in senescing plant tissues: *in vivo* breakdown intermediates suggest different degradative pathways for citrus fruit and parsley leaves". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84 (1987) 1901.
- Anderson, A.F.H. y Calvin, M., "An improved method for the separation and purification of chlorophyll *a*". *Nature*, 194 (1962) 285.
- AOAC *Official Methods of Analysis*, "Chlorophyll in Plants". Method 3,135 (1984) 59.
- Arkcoll, D.B. y Holden, M., "Changes in chloroplast pigments during the preparation of leaf protein". *J. Sci. Food Agric.*, 24 (1973) 1217.
- Baardseth, P. y Von Elbe, J.H., "Effect of ethylene, free fatty acid, and some enzyme systems on chlorophyll degradation". *J. Food Sci.*, 54 (1989) 1361.
- Bacon, M.F., "Separation of chlorophylls *a* and *b* related compounds by thin-layer chromatography on cellulose". *J. Chromatogr.* 17 (1965) 322.
- Bacon, M.F., "Artifacts from chromatography of chlorophylls". *Biochim. J.*, 101 (1966) 34c.
- Bacon, M.F. y Holden, M., "Changes in chlorophylls resulting from various chemical and physical treatments of leaves and leaf extracts". *Phytochemistry*, 6 (1967) 193.
- Bauernfeind, J.C.; Brubacher, G.B.; Kläui, H.M. y Marusich, W.L., "Use of carotenoids". En *Carotenoids*. O. Isler (Ed.), Birkhäuser Verlag Basel, Stuttgart (1971) 743.
- Bazzaz, M.B. y Rebeiz, C.A., "Chloroplast structure. V. Spectrofluorometric determination of chlorophyll(ide) *a* and *b* and pheophytin (or pheophorbide) *a* and *b* in unsegregated pigment mixtures". *Photochem. Photobiol.*, 30 (1979) 209.
- Berset, C. y Caniaux, P., "Relationship between color evaluation and chlorophyllian pigment content in dried parsley leaves". *J. Food Sci.*, 48 (1983) 1854.

-
- Bendix, G.H.; Henry, R.E. y Strodz, N.H., "Preservation of green color in canned vegetables". U.S. Patent 2.589.037 (1952).
 - Blair, J.S., "Color stabilization of green vegetables", U.S. Patent No. 2,186,003, January 9, (1940).
 - Boardman, N.K. y Thorne, S.W., "Sensitive fluorescence method for the determination of chlorophyll *a*/chlorophyll *b* ratios". *Biochim. Biophys. Acta*, 253 (1971) 222.
 - Brown, L.M., Hargrave, B.T., y MacKinnon, M.D., "Analysis of chlorophyll *a* in sediments by high-pressure liquid chromatography". *Can. J. Fish. Aquat.*, 38 (1981) 205.
 - Brunisma, J., "The quantitative analysis of chlorophylls *a* and *b* in plant extracts". *Photochem. Photobiol.*, 2 (1963) 241.
 - Braumann, T. y Grimme, L.H., "Single-step separation and identification of photosynthetic pigments by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 170 (1979) 264.
 - Buckle, K.A. y Edwards, R.A., "Chlorophyll degradation and lipid oxidation in frozen unblanched peas". *J. Sci. Food Agric.*, 21 (1970a) 307.
 - Buckle, K.A. y Edwards, R.A., "Chlorophyll color and pH changes in H.T.S.T. processed green pea puree". *J. Food Technol.*, 5 (1970b) 173.
 - Buckle, K.A. y Rahman, F.M.M., "Separation of chlorophyll and carotenoid pigments of capsicum cultivars". *J. Chromatogr.*, 171 (1979) 385.
 - 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.
 - Burke, S. y Aronoff, S. "Semiquantitative paper chromatography of chlorophylls *a* and *b*". *Anal. Biochem.*, 101 (1980) 103.
 - 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.
 - Campbell, H., "Undesirable color change in frozen peas stored at insufficiently low temperature". *Food Res.*, 2 (1937) 55.
 - Chan, A.S.K., Ellsworth, R.K., Perkins, H.J. y Snow, S.E., "Purification of dihydroporphyrins for specific activity determination by thin-layer chromatography". *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 395.
 - Chandler, A.L. y Schwartz, S.J., "HPLC separation of Cis-Trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables". *J. Food Sci.* 52 (1987) 669.

-
- Clydesdale, F.M., Fleischman, D.L., y Francis, F.J., "Maintenance of color in processed green vegetables". *J. Food Prod. Dev.*, 4 (1970) 127.
 - Clydesdale, F.M. y Francis, F.J., "Chlorophyll changes in thermally processed spinach as influenced by enzyme conversion and pH adjustment". *Food Technol.*, 22 (1968) 793.
 - Clydesdale, F.M. y Francis, F.J., "Chlorophylls". En *Principles of Food Science*, Vol. 1. O.R. Fennema, (Ed.), Marcel Dekker, New York (1976) 386.
 - Clydesdale, F.M., Fleischman, D.L., y Francis, F.J., "Maintenance of color in processed green vegetables". *J. Food Prod. Dev.*, 4 (1970) 127.
 - Clydesdale, F.M. y Francis, F.J., "Pigmentos". En *Introducción a la Ciencia de los Alimentos*. O.R. Fennema (Ed.) Reverté S.A. Barcelona (1982) 449.
 - Comar, C.L. y Zscheile, F.P., "Analysis of plant extracts for chlorophylls *a* and *b* by a photoelectric spectrophotometric method". *Plant Physiol.*, 17 (1942) 198.
 - Coultate, T.P., "Pigmentos". En *Alimentos: química de sus componentes*. Acribia, S.A. Zaragoza (1984) 101.
 - Craft, N.E., Wise, S.A. y Soares, J.H. "Optimization of an isocratic high-performance liquid chromatographic separation of carotenoids" *J. Chromatogr.*, 589 (1992) 171.
 - Davies, B.H., Matthews, S. y Kirk, J.T.O., "The nature and biosynthesis of the carotenoids of different colour varieties of *capsicum annum*". *Phytochemistry* 9 (1970) 797.
 - Davies, B.H., "Carotenoids". En *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Vol. 2, Goodwin T.W. (Ed) Academic Press. London, New York, San Francisco (1976) 38.
 - Davies, B.H. y Köst, H.P., "Carotenoids", En *Handbook of Chromatography*. Vol. 1, Köst, H.P. (Ed.) CRC Press, Boca Raton, FL (1988).
 - Davies, D. y Holdsworth, E.S., "The use of high pressure liquid chromatography for the identification and preparation of pigments concerned in photosynthesis". *J. Liq. Chromatogr.* 3 (1980) 123.
 - De Jong, D.W. y Woodlief, W.C., "High speed, low pressure liquid chromatography of chloroplast pigments from tobacco mutants". *J. Agric. Food Chem.* 26 (1978) 1281.
 - De la Mar, R.R. y Francis, F.J., "Carotenoids degradation in bleached paprika". *J. Food Sci.* 34 (1969) 287.
 - Deulin, R.M., *Fisiología vegetal*. Ed., Omega. Barcelona (1975).

-
- Diehl, H.C. y Berry, J.A., "Relation of scalding practice and storage temperature to quality retention in frozen-pack peas". *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 30 (1933) 496.
 - Dietrich, W.C.; Lindquist, F.E.; Miers, J.C.; Bohart, G.S.; Neumann, H.J. y Talburt, W.F., "Objectiva tests to measure adverse changes in frozen vegetables". *Food Technol.*, 11 (1957) 109.
 - Dietrich, W.C y Neumann, H.J., "Blanching Brussels sprouts". *Food Technol.*, 19 (1965) 150.
 - Drake, S.R.; Spayd, S.E. y Thompson, J.B., "The influence of blanch and freezing method on the quality of selected vegetables". *J. Food Quality*, 4 (1981) 271.
 - Drake, S.R. y Carmichael, D.M., "Frozen vegetable quality as influenced by high temperature short time (HTST) steam blanching". *J. Food Sci.* 51 (1986) 1378.
 - Dutton, H.J., Bailey, G.F., and Kohake, E., "Dehydrated spinach changes in and pigments during processing and storage". *Ind. Eng. Chem.*, 35 (1943) 1173.
 - Eilati, S.K.; Budowsky, P. y Monselise, S.P., "Carotenoid changes in the 'Shamouti' orange peel during chloroplast-chromoplast transformation on and off the tree". *J. exp. Bot.*, 26 (1975) 624.
 - Ellsworth, R.K., "Chlorophyll biosynthesis", En *The Chemistry of Plant Pigments*, Chichester, C.O., Ed., Academic Press, New York, (1972) 85.
 - Eskins, K., Scholfield, C.R. y Dutton, H.J., "High-performance liquid chromatography of plant pigments". *J. Chromatogr.*, 135 (1977) 217.
 - Eskins, K. y Dutton, H.J., "Sample preparation for high-performance liquid chromatography of higher plant pigments". *Anal. Chem.*, 51 (1979) 1885.
 - Eskins, K. y Harris, L., "High-performance liquid chromatography of etioplast pigments in red kidney bean leaves". *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 131.
 - Evans, N., Games, D.E., Jacson, A.H. y Matlin, S.A., "Applications of high-pressure liquid chromatography and fiels desoprtnion mass spectrometry in studies of natural porphyrins and chlorophyll derivatives", *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 325.
 - Falk, J.E., *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier, Amsterdam, (1964).
 - Falkowski, P.G. y Sucher, J., "Rapid quantitative separation of chlorophylls and their degradation products by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 213 (1981) 349.
 - Fenna, R.E. y Matthews, B.W., "Chlorophyll arrangement in a bacteriochlorophyll protein from *Chlorobium limicola*". *Nature*, 258 (1975) 573.

-
- Fernández Díez, M.J. et al., *Biotechnología de la Aceituna de Mesa*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (1985).
 - Fischbach, H. "Microdeterminations for organically combined metals in pigment of okra". *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 26 (1943) 139.
 - Fischbach, H. y Newburger, S.H. "Spectrophotometric study of the green color in okra". *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 26 (1943) 134.
 - Foppen, F.H., "Tables for identification of carotenoid pigments". *Chromatographic Reviews*, 14 (1971) 133
 - Forni, E.; Ghezzi, M. y Polesello, A., "HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophithins in fresh and frozen peas". *Chromatographia*, 26 (1988) 120.
 - Giesecker, L. E., "Art of processing and maintaining color of green vegetables". U.S. Patent 2.437.747 (1949).
 - Goedheer, J.C., "Visible absorption and fluorescence of chlorophyll and its aggregates in solution". En *The Chlorophylls*, L.P. Vernon y G.R. Seeley (Eds.), Academic Press, New York (1966) 21.
 - Gold, H.J. y Weckel, K.G., "Degradation of chlorophyll to pheophytin during sterilization of canned peas by heat". *Food Technol.*, 13 (1959) 281.
 - Gupte, S.M. y Francis, F.J., "Effect of pH adjustment and high-temperature short-time processing on color and pigment retention in spinach puree". *Food Technol.*, (1964) 141.
 - Goodwin, R.H., Fluorometric method for estimating small amounts of chlorophyll *a*". *Anal. Chem.*, 19 (1947) 789.
 - Goodwin, T. W., *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Vol,1. T.W. Goodwin (Ed.), Academic Press, London, New York, San Francisco (1976).
 - Goodwin, T.W., "Carotenoides", En *Modern Methods of Plant Analysis*. R. Paech y M.V. Tracey (ed.) Vol. III Springer-Verlag, Berlin (1980).
 - Goodwin, T.W. y Goad, L.J., "Carotenoids and triterpenoids". En *The Biochemistry of fruits and their products*. Vol. 1 Hulme A.C. (Ed) Academic Press, London, New York y San Francisco (1970) 305.
 - Gross, J., "Pigment changes in the flavedo of Dancy tangerine (*Citrus reticulata*) during ripening". *Z. Pflanzenphysiol.* 103 (1981) 451.
 - Gross, J., *Pigments in Fruits*. B.S. Schweigert (Ed.), Academic Press, London (1987).

-
- Gross, J., *Pigments in Vegetables. Chlorophylls and Carotenoids*. Van Nostrand Reinhold (Ed.), New York (1991).
 - Gross, J.; Timberg, R. y Graef, M., "Pigment and ultrastructural changes in the developing pummelo (*Citrus grandis*). 'Goliath'". *Bot. Gaz.*, 144 (1983) 401.
 - Gupte, S.M., El-bisi, H.M., y Francis, F.J., "Kinetics of thermal degradation of chlorophyll in spinach puree". *J. Food Sci.* 29 (1964) 379.
 - Haard, N.F., "Características de los tejidos de plantas comestibles". En *Introducción a la Ciencia de los Alimentos*. O.R. Fennema (Ed.), Reverté S.A., Barcelona (1982).
 - Heinonen, M.I.; Ollilainen, V., Linkola, E.K., Varo, P.T. y Koivistoinen, P.E., "Carotenoids in Finnish Foods: Vegetables, Fruits, and Berries"., *J. Agric, Food Chem.* 37 (1989) 655.
 - Holden, M., "The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase". *Biochem. J.*, 78 (1961) 359.
 - Holden, M., "Analytical methods - chlorophylls". En *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Vol. 2, T.W. Goodwin, (Ed.), Academy Press. New York, San Francisco (1976) 1.
 - Humphrey, A.M. "Chlorophyll". *Food Chem.*, 5 (1980) 57.
 - Hynninen, P.H., "Chlorophylls. IV. Preparation and purification of some derivatives of chlorophylls *a* and *b*". *Acta Chem. Scand.*, 27 (1973) 1771.
 - Iriyama, K., Yoshiura, M., y Shiraki, M., "Micro-method for the qualitative and quantitative analysis of photosynthetic pigments using high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 154 (1978) 302.
 - Iriyama, K., Shiraki, M., y Yoshiura, M., "An improved method for extraction, partial purification, separation and isolation of chlorophyll from spinach leaves". *J. Liq. Chromatogr.*, 2 (1979) 225.
 - Jackson, A.H., "Structure, properties and distribution of chlorophylls". En *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Vol, 1. T.W. Goodwin (Ed.), Academic Press, London, New York, San Francisco (1976) 1.
 - Jahn, O.L., "Comparison of instrumental methods for measuring ripening changes of intact tomato fruit". *J. Am. Soc. hort. Sci.*, 100 (1975) 688.
 - Janson, T.R. y Katz, J.J., "NMR spectra of diamagnetic porphyrins". En *The Porphyrins*, Vol. 4, D. Dolphin (Ed.), Academic Press, New York (1978) 1.

-
- Jacobsen, T.R., "A quantitative method for the separation of chlorophylls a and b from phytoplankton pigments by high pressure liquid chromatography". *Mar. Sci. Commun.*, 4 (1978) 33.
 - Jeffrey, S.W., "Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae". *Biochim, Biophys. Acta* 162 (1968) 271.
 - Jeffrey, S.W. y Hallegraeff, G.M.; "Chlorophyllase distribution in ten classes of phytoplankton: a problem for chlorophyll analysis". *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 35 (1987) 293.
 - Jones, I.D., White, R.C. y Gibbs, E., "The formation of pheoforbides during brine preservation of cucumbers". *Food Technol.* 15 (1961) 172.
 - Jones, I.D., White, R.C. y Gibbs, E., "Some pigment changes in cucumbers during brining and brine storage". *Food Technol.* 16 (1962) 96.
 - Jones, I.D., White, R.C. y Gibbs, E., "Influence of blanching or brining treatments on the formation of chlorophyllides, pheophytins and pheophorbides in green plant tissue". *J. Food Sci.* 28 (1963) 437.
 - Jones, O.T.G., "The inhibition of bacteriochlorophyll biosynthesis in rhodospseudomonas spheroides by 8-hydroxyquinoline". *Biochim. J.*, 85 (1963) 335.
 - Jones, I.D.; White, R.C.; Gibbs, E. y Denard, C.D., "Absorption spectra of copper and zinc complexes pheophytins and pheoforbides." *J. Agric. Food Chem.*, 16 (1968) 80.
 - Jones, I.D., Butler, L.S., Gibbs, E. y White, R.C., "An evaluation of reversed phase partition for thin-layer chromatographic identification of chlorophylls and derivatives". *J. Chromatogr.*, 70 (1972) 87.
 - Jones, I.D.; White, R.C.; Gibbs, E.; Butler, L.S. y Nelson, L.A., "Experimental formation of zinc and copper complexes of chlorophyll derivatives in vegetable tissue by thermal processing". *J. Agrc. Food Chem.*, 25 (1977) 1.
 - Jungalwala, F.B. y Cama, H.R., "Carotenoids in *Delonix regia* (gul mohr) flowers". *Biochem. J.*, 85 (1962) 1.
 - Kan, K., Tamura, Y., Maki, T., Koseki, M. y Naoi, Y. "Studies on the analysis of degradation products of chlorophyll and chlorophyllase activity". *Food Sci. Tech. Abs.* 5G28 (1985).
 - Katz, J.J.; Dougherty, R.C. y Boucher, L.J., "Infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy of chlorophyll". En *The Chlorophylls*, L.P. Vernon y G.R. Seely (Eds.), Academic Press, New York (1966) 186.

-
- Katz, J.J.; Norman, G.D.; Svec, W.A. y Strain, H.H., "Chlorophyll diastereoisomers. The nature of chlorophylls *a'* and *b'* and evidence for bacteriochlorophyll epimers from proton magnetic resonance studies". *J. Am. Chem. Soc.*, 90, (1968) 6841.
 - Khachik, F., Beecher, G.R. y Whittaker, N.F., "Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography". *J. Agric. Food Chem.* 334 (1986) 603.
 - Kirk, J.T.O. y Tilney-Basset, R.A.E., *The Plastids*. 2nd ed., Elsevier, Amsterdam (1978), Cap. 4.
 - Klein, A.O. and Vishiac, W., "Activity and partial purification of chlorophyllase in aqueous systems"., *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 2544.
 - Knee, M., "Anthocyanin, carotenoid and chlorophyll changes in the peel of Cox's Orange Pippin apples during ripening on and off the tree". *J. exp. Bot.*, 23 (1972) 184.
 - Kramer, A.; Haut, I.C.; Scott, L.E. y Ide, L.E., "Objective methods for measuring quality factors of raw, canned and frozen asparagus". *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 53 (1949) 411.
 - Kukori, M., Shioi, Y. y Sasa, T., "Purification and properties of soluble chlorophyllase from tea leaf sprouts". *Plant. Cell. Physiol.* 22 (1981) 717.
 - Laborde, L.F. y von Elbe, J.H., "Zinc complex formation in heated vegetable purees". *J. Agric. Food Chem.*, 38 (1990) 484.
 - Lajollo, F.M., Tannenbaum, S.R. y Labuza, T.P., "Reaction at limited water concentration. 2. Chlorophyll degradation". *J. Food Sci.*, 36 (1971) 850.
 - Lajollo, F.M. y Lanfer Marquez, U.M., "Chlorophyll degradation in a spinach system at low and intermedaite water activities". *J. Food Sci.*, 47 (1982) 1995.
 - Lambers, J.W.J., Terpstra, W. y Levine, Y.K., "Studies on the action mechanism of the membrane enzyme chlorophyllase". *Biochim. Biophys. Acta* 789 (1984) 188.
 - Lambers J.W.J., Velthuis, H.W. y Terpstra, W. "Molecular mass estimation of chlorophyllase in situ by radiation inactivation analysis. Studies on the composition of the isolated ezyme". *Biochim. et Biophys. Acta* 831 (1985) 213.
 - Lessertois, D. y Monèger, R., "Evolution des pigments pendant la croissance et la maturation du fruit de *Prunus persica*". *Phytochemistry*, 17 (1978) 411.
 - Levadoux, W.L., Kalmokoff, M.L., Pickard, M.D. y Grootwassink, J.W.D., "Pigment removal from canola oil using chlorophyllase". *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 64 (1987) 139.

-
- Liaaen-Jensen, S., "Isolation, reactions". En *Carotenoids*, O. Isler (Ed), Birkhäuser Verlag: Basel (1971).
 - Lichtenthaler, H.K., "Verbreitung und relative Konzentration der lipophilen Plastidenchinone in grünen Pflanzen". *Planta*, 81 (1968) 140.
 - Lichtenthaler, H.K., "Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes". *Methods Enzymol.*, 148 (1987) 350.
 - Lichtenthaler, H.K. y Wellburn, A.R., "Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents". *Biochim. Soc. Trans.*, 603 (1983) 591.
 - Livingston, R.; Watson, W.F. y McArdle, J., "Activation of the fluorescence of chlorophyll solutions". *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 1542.
 - Livingston, A.L.; Knowles, R.E.; Nelson, J.W. y Kohler, G.O., "Xanthophyll and carotene loss during pilot and industrial scale alfalfa processing". *J. Agric. Food Chem.* 16 (1968) 84.
 - Lord, C.E.C. y Tirimanna, A.S.L., "A qualitative study of the carotenoid pigments of sri lanka chillies (*Capsicum annum*)". *Mikrochim. Acta* 1 (1976) 469.
 - Lyons, J.M. y Rappaport, L., "Effect of temperature on respiration and quality of Brussels sprouts during storage". *Proc. Am. Hortic. Sci.*, 73 (1959) 361.
 - Mackinney, G., "Coloring matters". En *The Orange*. W.B. Sinclair (Ed.), University of California, Division of Agricultural Science (1961) 302.
 - Mackinney, G. y Weast, C.A., "Color changes in green vegetables, frozen-pack peas and string beans". *Ind. Eng. Chem.*, 33 (1940) 392.
 - Mantoura, R.F.C. y Llewellyn, C.A., "The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography". *Anal. Chim. Acta* 151 (1983) 297.
 - Mathews-Roth, M.M. "Carotenoids and cancer prevention- experimental and epidemiological studies". *Pure Appl. Chem.* 57 (1985) 717.
 - Maunders, M.J.; Stanley, B.B. y Harold, W.W., "The appearance of chlorophyll derivatives in senescing tissue". *Phytochemistry*, 22 (1983) 2443.
 - McFeeters, R.F.; Chichester, C.O. y Whitaker, J.R., "Purification and properties of chlorophyllase from *Ailanthus altissima*". *Plant. Physiol.*, 47 (1971) 609.

- Minamide, T. y Ogata, K., "Lipids of fruits and their physiological and qualitative role III change in lipid contents and in ultrastructure of chloroplasts during colouring of tomato fruits". *J. Food Sci. and Technol.*, 19 (1972) 453.
- Mínguez Mosquera, M.I. y Garrido Fernández, J., "Eliminación de compuestos lipídicos durante la fase de extracción de pigmentos cloroplásticos en aceitunas. *Olea europaea*". *Grasas y Aceites* 36 (1985) 376.
- Mínguez Mosquera, M.I. y Garrido Fernández, J. "Identificación de pigmentos carotenoides en frutos de distintas variedades de olivo *Olea europaea* L.". *Grasas y Aceites*, 37 (1986) 272.
- Mínguez Mosquera, M.I. y Garrido Fernández, J., "Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*, L.)". *J. Agric Food Chem.*, 37 (1989) 1.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Garrido Fernández, J. y Gandul Rojas, B., "Pigment changes in olives during fermentation and brine storage". *J. Agric. Food Chem.*, 37 (1989) 8.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Gandul Rojas, B.; Garrido Fernández, J. y Gallardo Guerrero, L., "Pigments present in virgin olive oil". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67 (1990) 192.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Rejano Navarro, L.; Gandul Rojas, B.; Sánchez Gómez, A.H. y Garrido Fernández, J., "Color-pigment correlation in virgin olive oil". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68 (1991a) 332.
- Mínguez Mosquera, M.I., Jarén Galán, M., Hornero Méndez, D., Garrido Fernández, J., Gallardo Guerrero, M.L. y Gandul Rojas, B., "Decoloration of vegetable oils and oleoresins with recovery of unaltered pigments". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68 (1991b) 809.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Gandul Rojas, B.; Montaña Asquerino, A. y Garrido Fernández, J., "Determination of chlorophylls and carotenoides by HPLC during olive lactic fermentation". *J. Chromatogr.*, 585 (1991c) 259.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Gallardo Guerrero, L. y Gandul Rojas, B., "Characterization and separation of oxidized derivatives of pheophorbides *a* and *b* by TLC and HPLC". *J. Chromatogr.*, 633 (1993a) 295.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Gandul Rojas, B. y Gallardo Guerrero, L., "De-esterification of chlorophylls in olives by action of chlorophyllase". *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993b) 2254.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Gandul Rojas, B. y Mínguez Mosquera, J., "Mechanism and kinetics of the degradation of chlorophylls during the processing of green table olives". *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) 1089.

- Mínguez Mosquera, M.I.; Gandul Rojas, B. y Gallardo Guerrero, L., "Chlorophyllase presence in olive fruit (*Olea europaea*). Measurement of activity". *J. Biochem.*, (1994)(en prensa).
- Mínguez Mosquera, M.I.; Garrido Fernández, J.; Gallardo Guerrero, L. y Hornero Méndez, D., "Involvement of copper and zinc ions in 'Green Staining' of table olives of the Gordal variety". *J. Food Prot.*, (en revisión).
- Moran, R. y Porath, D., "Chlorophyll determination in intact tissues using N,N-dimethylformamide". *Plant. Physiol.* 65 (1980) 478.
- Moss, G.P. y Weedon, B.C.L., "Chemistry of the carotenoids". En *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Vol. 1.T.W. Goodwin (Ed). Academic Press. London, New York y San Francisco (1976) 149.
- Muftugil, N., "Effect of different types of blanching on the color and the ascorbic acid and chlorophylls content of green beans". *J. Food Proc. Preserv.*, 10 (1986) 69.
- Ogura, N.; Ueno, M.; Matsunaga, M.; Sato, T. y Nakagawa, H., "Chlorophyllase activities and color changes of fresh green leaves on blanching". *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 61 (1987) 451.
- Oquist, G. y Samuelsson, G., "Sequential extraction of chlorophyll from chlorophyll-protein complexes in lyophilized pe thylakoids with solvents of different polarity". *Physiol. Plant.*, 50 (1980) 57.
- Okombi, G.; Billot, J. y Hartmann, C., "Les caroténoïdes de la cerise (*Prunus avium*). cv. Bigarreau Napoléon. Evolution au cours de la croissance et de la maturation". *Fruits*, 35 (1980) 313.
- Pennington, F.C.; Strain, H.H.; Svec, W.A. y Katz, J., "Preparation and properties of pyrochlorophyll *a*, methyl pyrochlorophyllide *a*, pyropheophytin *a*, and methyl pyropheophorbide *a* derived from chlorophyll by decarbomethoxylation". *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 1418.
- Pennington, F.C.; Strain, H.H.; Svec, W.A. y Katz, J.J., "Preparation of properties of 10-hydroxychlorophylls *a* and *b*". *J. Am. Chem. Soc.*, 89 (1967) 3875.
- Perkins, H.J. y Roberts, D.W.A., "Purification of chlorophylls, pheophytins and pheophorbides for specific activity determinations". *Biochim. Biophys. Acta* 58 (1962) 486.
- Petterson, A. y Jonsson, L., "Separation of *cis/trans* isomers of α - and β -carotene by adsorption HPLC and identification with diode array detection". Servicio de Publicaciones "Swedish Institute for Food Research", SIK, n° 833 (1989) Goteborg, Sweden.

-
- Pitt, G.A.J., "Vitamin A". En *Carotenoids*, O. Isler (Ed.). Birkhäuser Verlag Basel. Stuttgart (1971) 717.
 - Platenius, H. "Effect of oxygen concentration on the respiration of some vegetables". *Plant Physiol.* 18 (1943) 671.
 - Purvis, A.C., "Sequence of chloroplast degreening in calamondin fruit as influence by ethylene and AgNO₃". *Plant Physiol.*, 66 (1980) 624.
 - Purvis, A.C. y Barmore, C.R., "Involvement of ethylene in chlorophyll degradation in peel of citrus fruits". *Plant Physiol.*, 68 (1981) 854.
 - Rebeiz, C.A., Bazzaz, M.B., y Belanger, F., "The separation of chlorophyll and pheophytins by reversed phase HPLC". *Chromatogr. Rev.* 4 (1978) 2.
 - Rodríguez de la Borbolla y Alcalá, J.M.; Fernández Díez, M.J. y González Pellisó, F., "Cambios en la composición de la aceituna durante su desarrollo. I.". *Grasas y Aceites*, 6 (1955) 5.
 - Rodríguez de la Borbolla y Alcalá, J.M. et al., "El aderezo de aceitunas verdes". Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (1956).
 - Rodríguez de la Borbolla y Alcalá, J.M. y Rejano navarro, L., "Sobre la preparación de la aceituna estilo sevillano. El lavado de los frutos tratados con lejía". *Grasas y Aceites*, 29 (1978) 281.
 - Rodríguez, M.T.; González, M.P. y Linares, J.M., "Degradation of chlorophyll and chlorophyllase activity in senescing barley leaves". *J. Plant Physiol.*, 129 (1987) 369.
 - Rodríguez, D.B.; Simpson, R.L. y Chichester, C.O., "The biosynthesis of astaxanthin. XVII. Intermediates in the conversion of β -carotene". *Int. J. Biochem.*, 4 (1973) 213.
 - Sahlberg, I. y Hynninen, P.H., "Thin-layer chromatography of chlorophylls and their derivatives on sucrose layers". *J. Chromatogr.* 291 (1984) 331.
 - Sanger, J.E. "Quantitative investigations of leaf pigments from their inception in buds through autumn coloration to decomposition in falling leaves". *Ecology* 52 (1971) 1075.
 - Schaber, P.M.; Hunt, J.E.; Fries, R y Katz, J.J., "High-performance liquid chromatographic study of the chlorophyll allomerization reaction". *J. Chromatogr.*, 316 (1984) 25.
 - Schanderl, S.H., Marsh, G.L. y Chichester, C.O., "Color reversion in processed vegetables. I. Studies on regreened pea puree". *J. Food Sci.*, 30 (1965) 312.

-
- Scheer, H. y Katz, J.J., "Nuclear magnetic resonance spectroscopy of porphyrins and metalloporphyrins". En *Porphyrins and Metalloporphyrins*, 2nd ed., K.M. Smith (Ed.), Elsevier, New York (1975) 399.
 - Schick, G.A. y Bocian, D.F., "Resonance Raman studies of hydroporphyrins and chlorophylls". *Biochim. Biophys. Acta*, 895 (1987) 127.
 - Schoch, S., Lempert, U., Wieschhoff, H., y Scheer, H., "High-performance liquid chromatography of tetrapyrrole pigments". *J. Chromatogr.* 157 (1978) 3567.
 - Schoch S. y Brown, J., "The action of chlorophyllase on chlorophyll-protein complexes". *J. Plant. Physiol.* 126 (1987) 483.
 - Schwartz, S.J.; Woo, S.L. y von Elbe, J.H., "High performance liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives in fresh and processed spinach". *J. Agric. Food Chem.*, 29 (1981) 533.
 - Schwartz, S.J. y von Elbe, J.H., "Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables". *J. Food Sci.*, 48 (1983) 1303.
 - Schwartz, S.J., von Elbe, J.H. y Lindsay, R.C., "Influence of processing on the pigmentation of wild rice grain". *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 349.
 - Schwartz, S.J., "High performance liquid chromatography of zinc and copper pheophytins". *J. Liq. Chromatogr.*, 7 (1984) 1673.
 - Segner, W.P., Ragusa, T.J., Nank, W.K., y Hoyle, W.C., "Process for the preservation of green color in canned vegetables". U.S. Patent No. 4,473,591, September 25, (1984).
 - Shioi, Y., Michio, D., y Sasa, T., "Separation of non-esterified chlorophylls by ion-suppression high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 298 (1984) 141.
 - Shoaf, W.T., "Rapid method for the separation of chlorophylls a and b by high-pressure liquid chromatography". *J. Chromatogr.* 152 (1978) 247.
 - Sêsták, Z. "Paperchromatography of chloroplast pigments (chlorophylls and carotenoids). Part. 3". *Photosynthetica.* 14 (1980) 239.
 - Shklar, G. y Schwartz, J. "Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with alpha-tocopherol, beta-carotene, cantaxanthin and algae extract". *Eur. J. Cancer Clin Oncol.* 24 (1988) 839.
 - Shewfelt, R.L.; Batal, A.M. y Heaton, E.K., "Broccoli storage: Effect of N⁶-benzyladenine, packaging and icing on color of fresh broccoli". *J. Food Sci.*, 48 (1983) 1594.
 - Shimada, S. y Shimokawa, K., "Ethylene-activated chlorophyllase in *Satsuma mandarin* fruits". *J. Agric. Chem. Soc. Jap.*, 52 (1978) 489.

-
- Shimokawa, K., "Preferential degradation of chlorophyll *b* in ethylene-treated fruits of 'Satsumas' mandarin". *Sci. Hortic.*, 11 (1979) 253.
 - Shimokawa, K.; Shimada, S. y Yaeo, K., "Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during degreening of *Citrus Unshiu* marc". *Sci. Hort.*, 8 (1978) 129.
 - Shioi, Y.; Fukae, R. y Sasa, T., "Chlorophyll analysis by high-performance liquid chromatography". *Biochim. Biophys. Acta.*, and 722 (1983) 72.
 - Shoko, M. y Ssumi, K., "The degradation products of chlorophyll in the salted seisai". *Yamagata-ken Eisei Kenkyushoho*, 16 (1983) 31.
 - Sian, N.K. y Soleha, I., "Carotenoid and anthocyanin contents of papaya and pineapple: influence of blanching and predrying treatments". *Food Chem.* 39 (1991) 175.
 - Siefertmann-Harms, D.; Hertzberg, S.; Borch, G. y Liaaen-Jensen, S. "Lactucaxanthin, an ϵ, ϵ -3,3'-diol from *Lactuca Sativa*". *Phytochem.* 20 (1981) 85.
 - Sievers, G. y Hynninen, P.H., "Thin-layer chromatography of chlorophylls and their derivatives on cellulose layers". *J. Chromatogr.*, 134 (1977) 359.
 - 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 I. T.W. Goddwin (Ed.), Academic Press, London, New York, San Francisco, (1976) 779.
 - Sistrunk, W.A., Mahon, M.K. y Freeman, D.W., "Relationship of processing methodology to quality attributes and nutritional value of canned spinach". *Hort. Science*, 12 (1977) 59.
 - Smith, J.H.C. y Benítez, A., "Chlorophylls: analysis in plant materials". En *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 4, Paech, K. y Tracey, M.V. (Eds.), Springer-Verlag, New York, (1955) 142.
 - Stainer, R.Y.; Duodoroff, M. y Alderberg, E.A., *El Mundo de los Microbios*. Aguilar, S.A. Madrid (1965).
 - Stancher, Bruno y Zonta, F., "High-PLC determination of carotene and vitamin A and its geometric isomers in foods". *J. Chromatogr.*, 238 (1982) 217.
 - Stewart, J.K. y Uota, M. "Carbon dioxide injury and market quality of lettuce held in controlled atmosphere". *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 96 (1971) 27.
 - Stobart, A.K., McLaren, I. y Thomas, D.R., "Chlorophylls and carotenoids of colourless callus, green callus and leaves of *Kalanchoe crenata*". *Phytochemistry*, 6 (1967) 1467.

-
- Stone, M.B.; Toure, D.; Greig, J.K. y Naewbanij, J.O., "Effects of pretreatment and dehydration temperature on color, nutrient retention and sensory characteristics of okra". *J. Food Sci.*, 51 (1986) 1201.
 - Strain, H.H., "Oxidation and isomerization reactions of the chlorophylls in killed leaves". *J. Agric. Food Chem.*, 2 (1954) 1122.
 - Strain, H.H. y Svec, W.A., "Extraction, separation, estimation and isolation of the chlorophylls". En *The Chlorophylls*, L.P. Vernon, y G.R. Seely, (Eds.), Academic Press, New York (1966) 21.
 - Strain, H.H. y Svec, W.A., "Some procedures for the chromatography of the fat-soluble chloroplast pigments". *Adv. Chromatogr.*, 8 (1969) 118.
 - Strain, H.H., Sherma, J. y Grandolfo, M., "Alteration of chloroplast pigments by chromatography with siliceous adsorbents". *Anal. Chem.*, 39 (1967) 926.
 - Strain, H.H., Cope, B.T., y Svec, W.A., "Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls". *Methods Enzymol.* 23 (1971) 452.
 - Strain y Sherma, 1972)
 - Strasburger, E. et al., *Tratado de Botánica*. Manuel Marín y Cía (Ed.) 5ª edición española, Barcelona (1970).
 - Suzuki, N., Saitoh, K., y Adachi, K., "Reversed-phase high-performance thin-layer chromatography and column liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives". *J. Chromatogr.* 408 (1987) 181.
 - Svec, W.A., "The isolation, preparation, characterization, and estimation of the chlorophylls and the bacteriochlorophylls", in *The Porphyrins*, Vol. 5, Physical Chemistry, Part C, Dolphin, D., Ed., Academic Press, New York (1978) 341.
 - Sweeney, J.P. y Martín, M.E., "Determination of chlorophyll and pheophytin in broccoli heated by various procedures". *Food Res.*, 23 (1958) 635.
 - Sweeney, J.P. y Marsh, A.C. Tomado de Chandler, L.A. y Schwartz, S.J., "HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables". *J. Food Sci.* 52 (1987) 669.
 - Swirski, M.A., Allouf, R., Guimard, A., y Cheftel, H., "A water-soluble, stable green pigment, originating during processing of canned Brussels sprouts picked before the first autumn frosts". *J. Agric. Food Chem.*, 17 (1969) 799.
 - Tan, C.T. y Francis, F.J., "Effect of processing temperature on pigments and color of spinach". *J. Food Sci.*, 27 (1962) 232.

- Takeda, Y. Konuma, H. Uchiyama, S., y Saito, Y. "Microbial formation of pheophorbide a and pyropheophorbide a in "Takana" during brining and fermentation". *J. Food Hyg. Soc. Jap.* 30 (1990) 228.
- Terpstra, W. y Lambers, J.W.J., "Incorporation of chlorophyll and chlorophyllase into artificial membranes". *Photobiochim. Photobiophys.* 6 (1983a) 93.
- Terpstra, W. and Lambers, J.W.J., "Interactions between chlorophyllase, chlorophyll a, plants lipids and Mg²⁺". *Biochim. Biophys. Acta* 746 (1983b) 23.
- Torsi, G., Chiavari, G. y Lippolis, M.T., "Quantitation without calibration curves using HPLC with nondestructive detectors". *LC-GC INTL* 5 (1992) 37.
- Tswett, M., "Adsorptionsanalyse and chromatographische Methoden, Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls". *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 24 (1906) 384.
- Tsukida, K., Saiki, K., Takii, T. y Koyama, Y., "Separation and determination of cis/trans β -carotenes by HPLC". *J. Chromatogr.*, 245 (1982) 359.
- Van Buren, J.P., "Extraction of chlorophylls a and b from different binding sites on thylakoid chlorophyll-proteins". *J. Agric. Food Chem.*, 33 (1985) 204.
- Vázquez Roncero, A., "Química del olivo I. Los componentes orgánicos". *Grasas y Aceites*, 14 (1963) 262.
- Vázquez Roncero, A., "Química del olivo III. Los componentes orgánicos". *Grasas y Aceites*, 16 (1965) 292.
- Vázquez Roncero, A.; Vioque, E. y Mancha Perelló, M., "Componentes químicos de la aceituna. III. Variaciones de los componentes liposolubles durante la maduración". *Grasas y Aceites*, 16 (1965) 17.
- Vecchi, M., Englert, G., Maurer, R. y Meduna, V., "Separation and characterization of the cis-isomers of β - β -carotene". *Helvetica Chim. Acta*, 64 (1981) 2746.
- Vernon, L.P. y Seely, G.R., (Eds.), *The Chlorophylls*. Academic Press, New York, (1966) 679.
- Virgin, H.I., "Protochlorophyll formation and greening in etiolated barley leaves". *Physiol. Plant.*, 8 (1955) 630.
- Virgin, H.I., "Action spectrum for the elimination of the lag phase in chlorophyll formation in previously dark grown leaves of wheat". *Physiol Plant.*, 14 (1961) 439.
- von Elbe, J.H.; Huang, A.S.; Attoe, E.L. y Nank, W.K., "Pigment composition and color of conventional and Veri-Green[®] canned beans". *J. Agric. Food Chem.*, 34 (1986) 52.

-
- Wagenknecht, A.C.; Lee, F.A. y Boyle, F.P., "The loss of chlorophyll in green peas during frozen storage and analysis". *Food Res.*, 17 (1952) 343.
 - Wagenknecht, A.C. y Lee, F.A., "The action of lipoxidase in frozen raw peas". *Food Res.*, 21 (1956) 605.
 - Wagenknecht, A.C. y Lee, F.A., "Enzyme action and off-flavor in frozen peas". *Food Res.*, 23 (1958) 25.
 - Walker, G.C., "Color deterioration in frozen French beans (*Phaseolus vulgaris*)". *J. Food Sci.*, 29 (1964a) 383.
 - Walker, G.C., "Color deterioration in frozen French beans (*Phaseolus vulgaris*). 2. The effect of blanching.". *J. Food Sci.*, 29 (1964b) 389.
 - Wang, C., "Physiology of ripening in pears". *Food Sci. Tech. Abs.*, 7J722 (1970).
 - Wang, S.S., Haard, N.F. y Dimarco, G.R. "Chlorophyll degradation during controlled atmosphere storage of asparagus". *J. Food Sci.*, 36 (1971) 657.
 - Wang, C.Y. "Effect of CO₂ treatment on storage and shelf life of sweet pepers". *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 102 (1977) 808.
 - Wang, C.Y. " Effect of short-term high CO₂ treatment on the market quality of stored broccoli ". *J. Food Sci.* 44 (1979) 1478.
 - Wang, C.Y. "Postharvest responses of Chinese cabbage to high CO₂ or low O₂ storage". *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 108 (1983) 125.
 - Watanabe, T., Hongu, A., Honda, K., Nakazato, M., Konno, M., y Saithoh, S., "Preparation of chlorophylls and pheophytins by isocratic liquid chromatography". *Anal. Chem.* 56 (1984) 251.
 - Westcott, D.; Livingston, G.; Esselen, W y Fellers, C., "Nonenzymatic discoloration of green bean puree". *Food Res.*, 20 (1955) 149.
 - 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.
 - White, R.C.; Jones, I.D.; Gibbs, E. y Butler, L.S., "Fluorometric estimation of chlorophylls, chlorophyllides, pheophytins, and pheophorbides in mixtures". *J. Agric. Food Chem.*, 20 (1972) 773.
 - Willstatter, R. y Stoll, A., *Investigations on Chlorophyll*, (transl. by Schertz, F.M. and Merz, R.A.). The Science Press Printing, Lancaster, PA (1928) 385.

- Wintermans, J.F.G.M. y de Mots, A., "Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their pheophytins in ethanol". *Biochim. Biophys. Acta*, 109 (1965) 448.
- Wright, S.W. y Shearer, J.D., "Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton". *J. Chromatogr.*, 294 (1984) 281.
- Yamauchi, N.; Hamaguchi, S. y Ogata, K., "Physiological and chemical studies on ascorbic acid of fruits and vegetables. VII. Mechanism of chlorophyll degradation and action of ascorbic acid in the inhibition of yellowing in harvested parsley leaves". *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 49 (1980) 414.
- Yamauchi, N. y Minamide, T., "Chlorophyll degradation by peroxidase in parsley leaves". *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 54 (1985) 265.
- Yamauchi, N.; Iida, S.; Minamide, T. y Iwata, T., "Foliage yellowing by peroxides in stored spinach (mechanism of chlorophyll degradation in harvested leaf vegetables, Part II)". *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 32 (1985) 814.
- Yamauchi, N.; Iida, S.; Minamide, T. y Iwata, T., "Polar lipids content and their fatty acid composition with reference to yellowing of stored spinach leaves". *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 55 (1986) 355.
- Yamauchi, N.; Iida, S.; Minamide, T. y Iwata, T., "Localization of lipolytic acyl hydrolase in chloroplast of stored spinach leaves". *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 55 (1987) 510.
- Yang, Y.J. y Henze, J. "Influence of CA-storage on external and internal quality features in broccoli (*Brassica oleracea* var. *ital.*) II. Changes in chlorophyll and carotenoid contents". *Gartenbauwiss.* 53 (1988a) 41.
- Yoshimune, N.; Hitoshi, H.; Kazuki, F. y Hidenari, I., "Preparation and determination of cobalt (II) chlorophylls by high-performance liquid chromatography". *Anal. Sci.*, 10 (1994) 117.
- Yoshiura, M., Iriyama, K., y Shiraki, M., "High-performance liquid chromatography of chlorophylls and some of their derivatives". *Chem. Lett.* (1978) 281.
- Zonneveld, H.; Klop, W. y Gorin, N., "Analysis of unboiled and boiled beans for chlorophylls and pheophytins by thin-layer chromatography and fluorimetry comparison with spectrometry". *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 178 (1984) 20.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Consejo de Facultad de Farmacia y Ciencias Químicas el día de [illegible] de [illegible] de 1944, con el Presidente D.^o LOURDES GALLARDO GUERRERO, titulado CLOROFILAS Y CAROTENOIDES EN ACEITUNAS DE LA VARIEDAD GORDAL. FACTORES ASOCIADOS CON LA ALTERACIÓN "MANCHA VERDE".

acordó otorgarle el título de

apto cum laude.

Se celebró el día once de octubre de 1944

El Vocal

[Signature]

El Presidente

[Signature]

El Vocal

[Signature]

El Doctorado

[Signature]