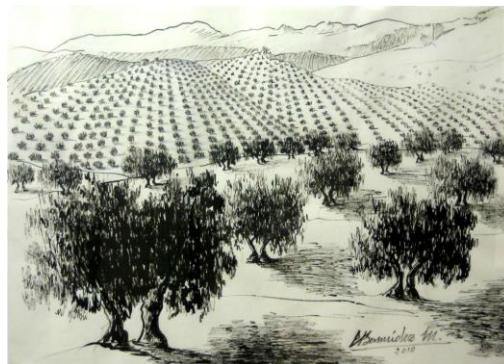




# PAPEL DE LAS PIROFEOFITINAS COMO MARCADORES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Departamento de Química Analítica  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla



**Laura Morcillo Bravo**  
Septiembre 2017

Universidad de Sevilla  
Facultad de Farmacia  
Trabajo Fin de Grado  
Grado en Farmacia

# **PAPEL DE LAS PIROFEOFITINAS COMO MARCADORES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN**

Memoria presentada por **Laura Morcillo Bravo** para  
optar al Grado en Farmacia por la Universidad de Sevilla

Trabajo Fin de Grado dirigido por:  
**Maria Teresa Morales Millán e  
Inmaculada Romero del Rio**

Departamento de Química Analítica  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla



Sevilla, Septiembre 2017

## **Resumen**

El aceite de oliva virgen es un producto muy apreciado por sus propiedades sensoriales y biológicas, que forma parte de la dieta mediterránea. Estas características le dan al aceite un alto valor añadido que es el responsable de que sea susceptible de sufrir adulteraciones por lo que se hace necesario establecer marcadores que permitan evaluar su calidad y autenticidad. Dentro de sus componentes contiene pigmentos clorofílicos y carotenoides que son los responsables de su color. El objetivo de este trabajo es evaluar el papel de las pirofeofitinas como marcadores del aceite de oliva virgen. Las clorofilas son compuestos estables que bajo determinadas condiciones pueden sufrir alteraciones originando compuestos derivados entre los que se encuentran las pirofeofitinas. Las pirofeofitinas aumentan con el tiempo de almacenamiento del aceite, por acción de la temperatura y/o la hidrólisis por lo que han sido propuestos como marcadores para detectar la presencia de aceites desodorizados a baja temperatura en aceite de oliva virgen y como marcadores de calidad entrando a formar parte de algunas regulaciones. En este trabajo se ha llevado a cabo una revisión y actualización de diferentes aspectos relacionados con la calidad del aceite de oliva virgen, se han estudiado las modificaciones de los pigmentos clorofílicos y sus derivados y como se ven afectados a lo largo de la obtención y almacenamiento del aceite de oliva, se ha realizado una revisión de los métodos de análisis de pigmentos clorofílicos y en particular de los empleados en el análisis de pirofeofitinas y, por último, se ha evaluado el posible papel de la pirofeofitina a como indicador de calidad/frescura, encontrándose que el contenido de pirofeofitinas no está relacionado con la calidad organoléptica de los aceites de oliva vírgenes pero sí es un buen indicador de la frescura del aceite.

**Palabras clave:** aceite de oliva virgen, pigmentos, pirofeofitinas, análisis, frescura.

## **Abstract**

Virgin olive oil is a product highly appreciated for its sensory and biological properties, which is part of the Mediterranean diet. These characteristics give the oil a high benefit value that is responsible for possible adulterations so it is necessary to establish markers allowing evaluate its quality and authenticity. Virgin olive oil contains chlorophyll and carotenoids pigments that are responsible for its colour. The objective of this work is to evaluate the role of pyropheophytins as markers of virgin olive oil. Chlorophylls are stable compounds that, under certain conditions, can undergo alterations resulting in derivative compounds such as pyropheophytins. The content of pyropheophytins increase with the time of storage of the oil, by the action of the temperature and / or the hydrolysis, reason why has been proposed as marker to detect the presence of deodorized at low temperature oils in virgin olive oil and as markers of quality entering to be part of some regulations. This work reviews and updates different aspects related to the quality of virgin olive oil. The modifications of the chlorophyll pigments, and their derivatives, studied taking into account how they affected during the obtaining and storage of the olive oil. The methods of analysis of chlorophylls pigments revised, in particular, those used in the analysis of pyropheophytins. Finally, the possible role of pyropheophytin a as indicator of quality/freshness has been considered, founding that the content of pyropheophytins is not related to the organoleptic quality of virgin olive oils but it is a good indicator of the freshness of the oil.

**Keywords:** virgin olive oil, pigments, pyropheophytins, freshness.

## **Glosario de Abreviaturas**

**AAO** (Agencia para el Aceite de Oliva)

**UPM** (Universidad Politécnica de Madrid)

**TLC** (cromatografía en capa fina)

**HPLC** (cromatografía líquida de alta resolución)

**LLE** (extracción líquido-líquido)

**DMF** (N,N-dimetilformamida)

**SPE** (extracción en fase sólida)

**GC** (cromatografía de gases)

**COI** (Consejo Oleícola Internacional)

**AO** (aceite de oliva)

**AOV** (aceite de oliva virgen)

<b>ÍNDICE</b>		<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b>		3
<b>Abstract</b>		4
<b>Glosario de Abreviaturas</b>		5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>		7
<b>1.1. El olivo</b>		9
<b>1.2. El fruto</b>		11
<b>1.3. El aceite de oliva virgen</b>		12
1.3.1. Obtención del aceite de oliva virgen		14
1.3.2. Composición del aceite de oliva virgen		16
1.3.3. Calidad del aceite de oliva virgen		17
<b>2. OBJETIVOS</b>		20
<b>3. METODOLOGÍA</b>		21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		
<b>4.1. Pigmentos clorofílicos</b>		
4.1.1. Estructura		23
4.1.2. Metabolismo de clorofilas		24
4.1.3. Formación de derivados clorofílicos		26
<b>4.2. Métodos de Análisis de clorofilas y derivados</b>		27
4.2.1. Métodos de extracción y purificación		28
4.2.2. Métodos de separación		29
4.2.3. Métodos de detección y cuantificación		30
<b>4.3. Relación entre los pigmentos y la calidad del aceite de oliva virgen</b>		31
<b>4.4. Pirofeofitinas, calidad y frescura del aceite de oliva virgen</b>		33
<b>5. CONCLUSIONES</b>		35
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>		36

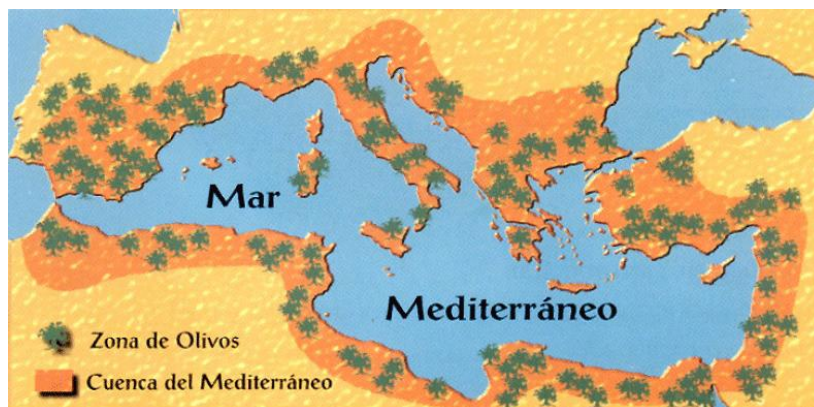


## 1. INTRODUCCIÓN

El legendario árbol del olivo y el aceite obtenido de sus frutos, designado como “*oro líquido*” por Homero, han acompañado al hombre desde sus inicios ya sea en rituales sagrados o en la vida cotidiana. El olivo es uno de los árboles más antiguos que ha cultivado el hombre. Su aparición y su cultivo se remontan a la prehistoria, aunque no se conoce con certeza como fue su expansión.

Es interesante destacar que en la elaboración de los grabados de la gruta de Lascaux, en Francia, llamada “Capilla Sixtina de la Prehistoria”, realizados hace 17000 años, ya se emplearon materias grasas en la preparación de las pinturas y en la iluminación de las grutas (Valenzuela y Morgado, 2005).

El inicio del cultivo del olivo se remonta al 6000 AC aunque sigue existiendo controversia científica sobre su lugar geográfico. Existen diversas hipótesis que lo sitúan en el Bajo Egipto, en Nubia, en Etiopía, en las montañas del Atlas o en determinadas regiones de Europa, pero la teoría más aceptada considera como patria prehistórica del olivo a Siria (Luna, 2003; Aparicio- Ruiz, 2008). Fueron los Fenicios y los Griegos los responsables de la difusión de su cultivo a las regiones del oeste de la cuenca Mediterránea (Figura 1) con las que mantenían un intenso comercio (COI, 1998). Posteriormente numerosas civilizaciones mediterráneas se turnaron a través de la historia en la propagación del cultivo del olivo: focios, hebreos, cartagineses, romanos, árabes, españoles, italianos, franceses, etc. En tiempos más modernos el cultivo del olivo ha continuado su expansión más allá del Mediterráneo, cultivándose actualmente en lugares alejados de su origen tales como la región sudafricana, Australia, Japón ó China (Uceda y Hermoso, 1997).



**Figura 1.** Cuenca del Mediterráneo donde tiene su origen el aceite de oliva.

Hoy día, en el mundo hay más de 11 millones de hectáreas de olivar, con aproximadamente 1500 millones de olivos. Hay cerca de 56 países del mundo que producen actualmente aceite de oliva y el cultivo del olivar se puede encontrar en lugares antaño inimaginables como China, Australia, Letonia o Finlandia (Figura 2). En zonas geográficas que se asemejan a la cuenca mediterránea es donde se concentra más del 97% de la producción, siendo España el principal país productor a nivel mundial (COI, 2017).



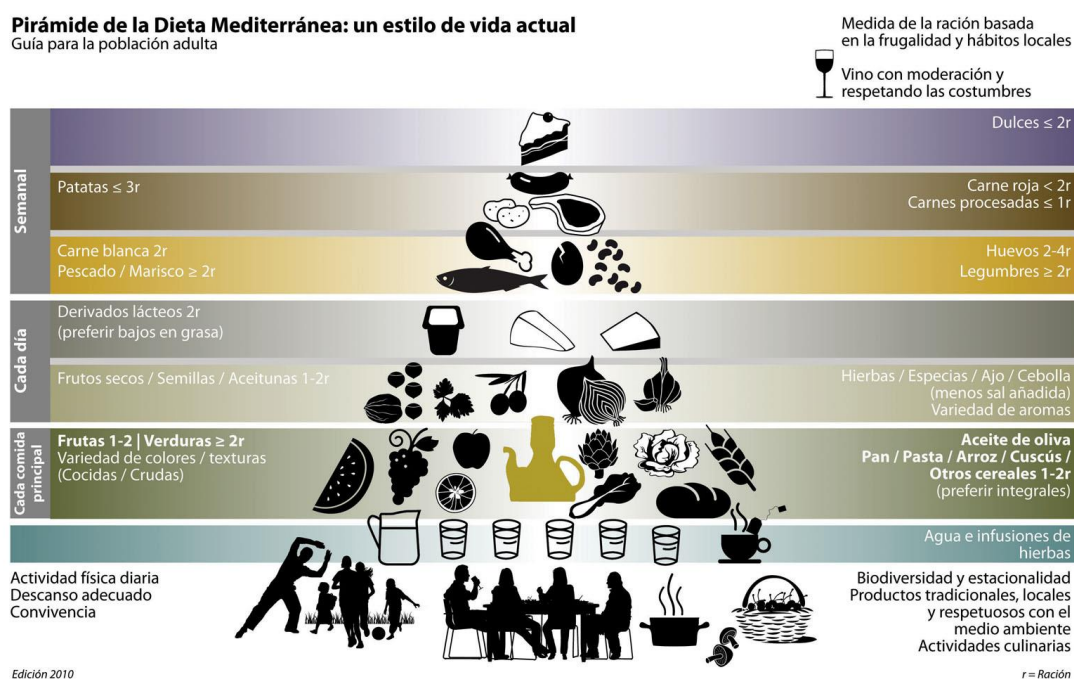
**Figura 2.** Actuales zonas productoras de aceite de oliva en el mundo.

España genera la mitad de la producción total mundial de aceite de oliva, siendo principalmente Andalucía, seguida de Extremadura, las regiones con mayor superficie de olivar de España según la Agencia para el Aceite de Oliva (AAO), convirtiéndose en el mayor productor mundial seguido de Italia y Grecia (COI, 2017). El sector olivarero es uno de los componentes principales del sistema agroalimentario español por su importancia económica, social, territorial, medioambiental y de salud pública (AAO, 2017).



El aceite de oliva es un pilar básico en la Dieta Mediterránea (Figura 3), este aceite vegetal constituye su principal fuente de lípidos, debido a que posee unas extraordinarias características sensoriales y a sus propiedades beneficiosas para la salud, que se deben fundamentalmente a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados y en compuestos antioxidantes (Gómez-Rico Rodríguez-Barbero, 2008). Esta dieta, originaria de los países de la cuenca del mar Mediterráneo, ha conseguido extenderse por todos los rincones del mundo.

Los usos del aceite de oliva se extienden más allá de los procesos culinarios, puede usarse desde para enriquecer alimentos hasta en técnicas de masaje, productos de cosmética o en formulaciones farmacéuticas. En la antigüedad era, además, muy utilizado como combustible.



**Figura 3.** Pirámide Nutricional en la que el AO tiene un papel esencial como principal fuente de grasa alimentaria (Fuente: [www.esenciadeolivo.es](http://www.esenciadeolivo.es)).

### 1.1. El olivo

El olivo es un árbol milenario que comprende alrededor de 30 géneros principales atendiendo al sistema de clasificación (Morettini et al., 1972). Se conocen más de 1275 variedades oleícolas autóctonas (Bartolini et al., 1998) de un único predecesor *Olea*

*europaea*, que pertenece al género *Olea* de la familia *Oleaceae*, en la que también está incluido el acebuche aunque este último, junto con los olivos silvestres, pertenece a la subespecie *oleaster* mientras que las variedades indicadas pertenecen a la subespecie *sativa*.

El olivo cultivado es un árbol de copa ancha y hoja perenne. Dependiendo de la variedad y de las condiciones climáticas su altura puede variar de 4-8 metros, siendo 4-5 metros la altura más apreciada por los agricultores ya que facilita su cultivo y recolección aunque los cultivos intensivos han alterado la fisonomía de los olivares (Aparicio-Ruiz, 2008).

El árbol se caracteriza por un crecimiento muy lento y por la producción de aceitunas durante toda su vida. Sus hojas se caracterizan por presentar forma lanceolada siendo verde la parte superior y grisácea o blanquecina la inferior debido a la densa pubescencia que las cubre, cuyo objetivo es proteger del frío en invierno y del calor en verano. Mide en torno a 6 centímetros y se renueva cada 3 años.

Las raíces de este árbol milenario se extienden horizontalmente hasta 2-3 veces la altura de la planta y su penetración en el suelo varía en función de la fertilidad de los mismos. Cabe destacar su gran importancia por desarrollar la mayor parte de la actividad nutritiva.

El tronco presenta un importante cambio a los 10 años, pasando de gris-verdoso liso a rugoso y de color oscuro, lleno de protuberancias y fisuras a medida que se hace mayor puesto que de joven destaca una corteza lisa.

Las flores son muy pequeñas y están reunidas en inflorescencias presentando cuatro pétalos de color blanquecino y una fuerte fragancia.

Los olivos son árboles de una gran longevidad, gracias entre otras cosas a la capacidad que tienen para emitir brotes y raíces a partir de yemas temporales, muy abundantes en la parte inferior del tronco. Pueden ser varias veces centenarios, y cuando parte del tronco va perdiendo vida, se generan en la base los renuevos que desarrollan un nuevo vástago, asegurándole así la reputación de árbol inmortal. Un estudio de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) ha determinado que el olivo conocido como “La Farga de Arion”, en Ulldecona tiene una edad estimada de 1.701 años, que habría sido plantado en el 314, en el mandato del emperador Constantino I (306-337 d.c.) y es el olivo más antiguo de España.

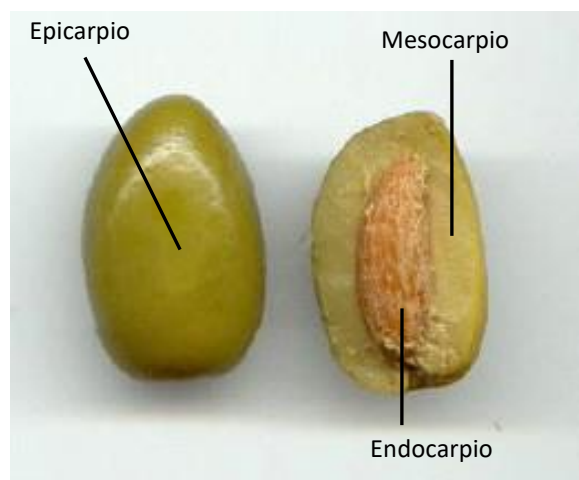
## 1.2. El fruto

El fruto del olivo también conocido como oliva o aceituna, es una drupa de forma elipsoidal o globosa que mide de 1 a 4 cm de longitud y de 0,6 a 2 cm de diámetro encerrando en su interior un solo hueso.

Presentan tamaños diferentes según la variedad, aunque suele oscilar ente 1,5-3 cm.

En los frutos se pueden distinguir tres partes bien diferenciadas (Figura 4) (Casanovas Castro, 2012):

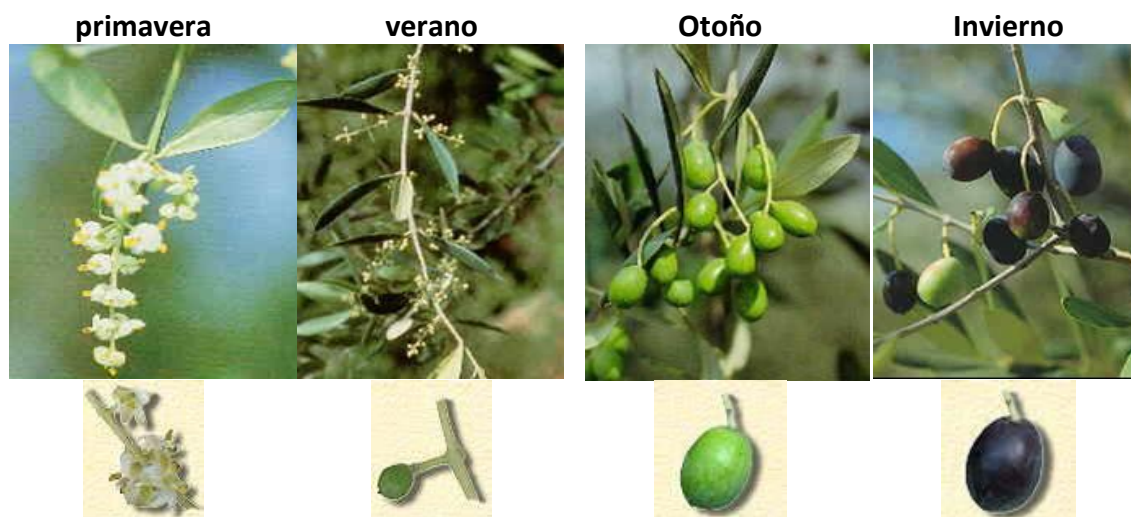
- El epicarpio (o piel exterior) (1-2%), que está revestido por una capa de cera, contiene productos aromáticos y los pigmentos naturales (clorofilas, carotenoides y antocionaninas).
- El mesocarpio (o pulpa) es la parte blanda y esponjosa que contiene el aceite.
- El endocarpio (o hueso) contiene la semilla, también encierra sustancias nutritivas y aceite en proporciones inferiores al mesocarpio.



**Figura 4.** Partes de la aceituna: epicarpio(1-2%), mesocarpio (68-86%) y endocarpio (20-30%).

La piel de la aceituna va variando su color a medida que madura, desde un intenso y brillante verde hasta un color negro azulado cuando se encuentran completamente maduras. El proceso de maduración de la aceituna se manifiesta por el cambio gradual de coloración del verde al violáceo, y finalmente del morado oscuro al negro (envero). Durante este proceso de maduración tiene lugar la síntesis del aceite mediante un proceso denominado lipogénesis. Este aceite se forma y se concentra en la drupa, comenzando el periodo de acumulación a finales de julio y principios de agosto.

Durante el otoño y el invierno el color de la aceituna se oscurece y el contenido en aceite alcanza su máximo (Figura 5). El grado de maduración de la aceituna condiciona su sabor e influye en su contenido de aceite (Luna, 2003).



*Figura 5. Proceso de maduración de la aceituna (Fuente: Luna, 2003).*

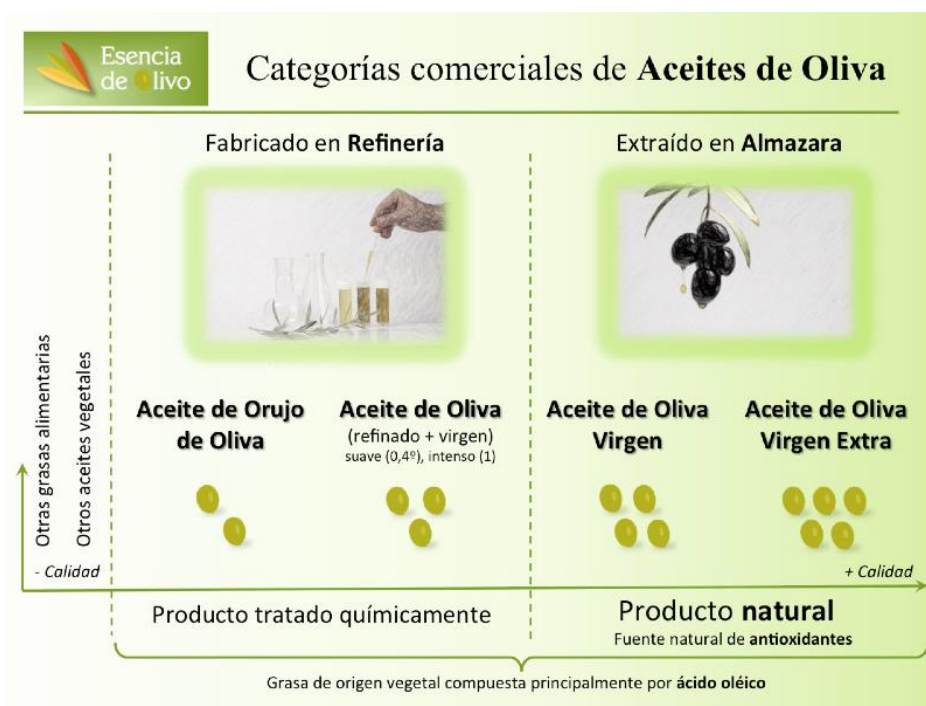
Las aceitunas pueden tener dos destinos, la elaboración de aceite o su consumo como aceitunas de mesa. Cuando se utilizan para ambos fines se dice que tienen una doble aptitud.

De la prensada de la carne de las aceitunas se obtiene el aceite de oliva, con un elevado contenido de ácidos grasos monoinsaturados.

### **1.3. El aceite de oliva virgen**

Según el Reglamento CEE 136/ de 1966 sobre la organización común de mercados de las materias grasas (CE, 1966), se considera aceite de oliva virgen al obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros medios físicos, en condiciones, especialmente térmicas, que no ocasionen la alteración del aceite, y que no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, el centrifugado y el filtrado, con exclusión expresa de los aceites obtenidos con disolventes, con procedimientos de reesterificación o por cualquier mezcla de aceites de otra naturaleza. En aquella redacción del reglamento ya constaba la categorización comercial de aceites de oliva y sus especificaciones, que a lo largo de los años ha ido teniendo sucesivas modificaciones (Casanovas Castro, 2012).

Según la normativa de la Unión Europea más reciente (CE, 2013), el aceite de oliva se clasifica en cuatro categorías comerciales (Figura 6).



**Figura 6.** Clasificación comercial del Aceite de Oliva (Fuente: [www.esenciadeolivo.es](http://www.esenciadeolivo.es)).

La cualidad a destacar del aceite de oliva virgen es que conserva de forma inalterable todos los componentes y propiedades de las aceitunas como zumo natural del fruto del olivo, resaltando su valor nutritivo y alto poder vitamínico. Es auténtico zumo de aceitunas sanas, completamente natural, sin aditivos ni conservantes, que no ha sido sometido a ningún proceso de refinado, sus propiedades beneficiosas para la salud y para la alimentación respaldan el precio de este producto regalo de la naturaleza.

Según los Reglamentos del Consejo Oleícola Internacional (COI, 2015a) y la Unión Europea (CE, 2013) existen distintos tipos de aceites de oliva vírgenes:

- *Aceite de oliva virgen extra:* es el aceite de olor y sabor absolutamente irreprochable, cuya valoración organoléptica tenga como mediana de los defectos cero y mediana del atributo frutado mayor que cero. Acidez máxima 0,8 g, expresada en ácido oleico, por 100 g de aceite.
- *Aceite de oliva virgen:* es el aceite de buen sabor y olor cuya puntuación organoléptica establece una mediana de defectos mayor que cero y menor o igual a 3,5 y una mediana de frutado mayor que 0. La acidez debe ser menor o igual a 2 g,

expresadas en ácido oleico, por 100 g de aceite. Es el aceite que presenta pequeñas alteraciones prácticamente imperceptibles, pero reducen la calidad en relación al virgen extra.

- *Aceite de oliva virgen corriente*: categoría distinguida sólo por el COI. Es el aceite de oliva virgen cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, es como máximo de 3,3 g por 100 g de aceite.

- *Aceite de oliva virgen lampante*: aceite de oliva de sabor y olor defectuoso, su valoración organoléptica presenta la mediana de defectos mayor a 3,5 o puede presentar una mediana de los defectos menor o igual a 3,5 y su mediana de frutado igual a 0. El aceite de oliva virgen lampante, presenta una acidez libre, expresada en ácido oleico, superior a 3,3 g por 100 g de aceite. Este aceite no se puede consumir sin sufrir un proceso de refinación previamente. No se comercializa como aceite refinado sino que se mezcla con aceite virgen para obtener el aceite de oliva.

### 1.3.1. Obtención del aceite de oliva virgen

El proceso de obtención del aceite de oliva virgen consta de distintas etapas, de las cuales las tres fundamentales son la molienda, el batido y la separación de fases (Di Giovacchino, 2013):

-1ª etapa.- *Recepción y selección de las aceitunas.*

La almazara recibe las aceitunas y la primera tarea es comprobar que las aceitunas defectuosas (enfermas, suelo, rotas, etc.) vengán separadas de las aceitunas sanas y recogidas directamente del árbol (vuelo), para proceder a su control de entrada por líneas diferentes.

-2º etapa.- *Limpieza y lavado de las aceitunas.*

La segunda etapa, por la que pasa la aceituna, es su limpieza con objeto de eliminar las hojas, pequeños tallos, polvo, etc. que puedan traer.

Limpia ya la aceituna se procede a su pesada y a la toma de muestras para los análisis pertinentes.

A continuación se lavan las aceitunas. Solo se emplea agua potable con el fin de eliminar el barro o posibles piedras. Si la aceituna se recoge directamente del árbol no es preciso lavarlas.

-3° etapa.- *La molienda de las aceitunas.*

La aceituna, limpia y lavada, no debe permanecer más de 48 horas sin moler porque podría fermentar y afectaría a la calidad del aceite. La molienda consiste en triturar y romper la aceituna entera para facilitar la salida del aceite que contiene.

Hoy en día se emplean dos métodos:

\*empiedro ó molino de muelas de piedra en forma de conos (en desuso por su baja rentabilidad)

\*molinos ó trituradores metálicos que pueden ser de martillos, de discos dentados o de cilindros estriados.

-4° etapa.- *El batido de la masa o pasta de aceituna.*

La masa o pasta de aceituna obtenida en el molino se bate con objeto de favorecer la salida del aceite. Las gotas de aceite se van aglutinando para formar una fase oleosa más grande y más fácilmente separable de la fase acuosa (agua de la aceituna) y de la fase sólida u orujo (piel + pulpa + huesos rotos).

La temperatura de batido no debe sobrepasar los 30°C para evitar que se pierdan los compuestos aromáticos y no se aceleren los procesos de oxidación.

Durante el batido de la masa o pasta de aceituna y usando sistemas filtrantes adaptados a las batidoras, del tipo de cuchillas o mallas a modo de coladores, se puede separar una pequeña porción de aceite que sería aceite o yema, equivalente al mosto flor o yema en los vinos. Por resultar más costosa esta separación parcial es poco utilizada.

- 5°etapa.- *Separación de las fases.*

Para separar las distintas fases se pueden utilizar dos sistemas distintos principalmente:

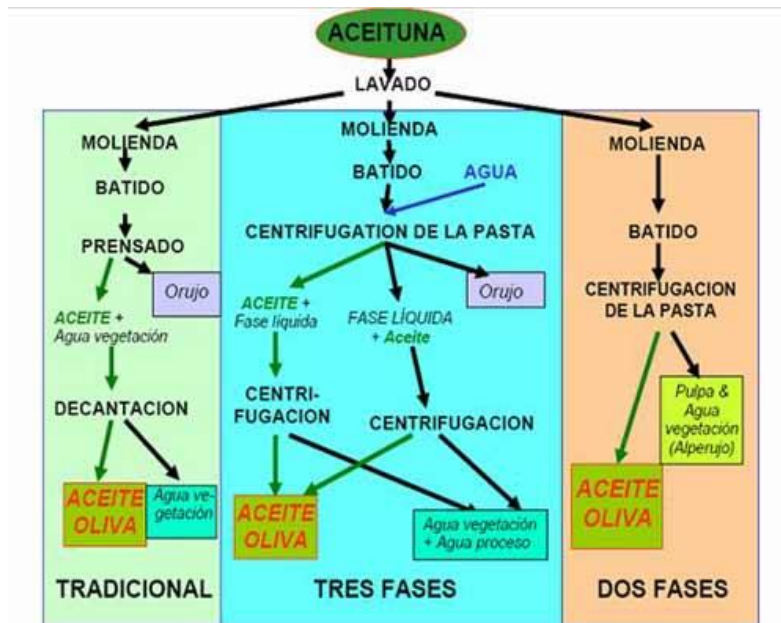
- Por presión ó método clásico o sistema de prensas.
- Por centrifugación o sistema continuo. Dentro del cual existen dos procedimientos: sistema continuo de tres fases, en el que se separa el aceite (fase oleosa) del resto de componentes de la aceituna: alpechín (fase acuosa) y orujo (fase sólida) y sistema continuo de dos fases, en el que se separa el aceite (fase oleosa) del alperujo (mezcla de fases líquida y sólida).

6ª etapa.- *Conservación del aceite de oliva virgen extra.*

Ya obtenido el aceite, es fundamental la conservación en condiciones óptimas, para que llegue al consumidor con todas sus cualidades (Cano Marchal et al., 2011).

Estas etapas se muestran resumidas en la Figura 7.





**Figura 7.** Diagrama de flujo de las distintas operaciones que se realizan en cada uno de los tres procesos de extracción de aceite de oliva (Fuente: TDCOLIVE).

### 1.3.2. Composición del aceite de oliva virgen

La composición del aceite de oliva, como la de cualquier otro aceite vegetal, se divide en una fracción mayoritaria o saponificable que la conforman triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres ocupando el 98%, destacando entre ellos el ácido oleico por ser el mayoritario y los ácidos linoleico y linolénico al ser esenciales para el organismo y siendo necesario adquirirlos a través de la dieta, y una fracción minoritaria e insaponificable responsable del 2% restante, conformada por esteroides, hidrocarburos, alcoholes, pigmentos, compuestos volátiles, compuestos fenolicos, tocoferoles, etc.

La composición del aceite de oliva se ve afectada de forma cualitativa y cuantitativa debido a diversos factores como variedad de aceituna, grado de maduración, condiciones agronómicas, y características tecnológicas de producción (Morales y León-Camacho, 2000; Lozano Sánchez et al., 2009)

Los compuestos del aceite que contribuyen a sus propiedades sensoriales son los compuestos volátiles, responsables de su aroma, los compuestos fenólicos, responsables de su sabor, y los pigmentos, responsables de su color (Morales y León-Camacho, 2000).



Los compuestos volátiles son los responsables de los atributos sensoriales relacionados con el olor, participan activamente en el aroma que caracteriza a los aceites de buena calidad, produciendo sensaciones frutadas y notas verdes, y originando aromas desagradables cuando los aceites no son de buena calidad (Morales et al., 2005).

Los compuestos fenólicos constituyen una fracción muy compleja, y de diferente tipología, cuya proporción es inferior en el aceite que en la aceituna, dada la pérdida que se produce durante la molienda y el batido. Estos compuestos tienen propiedades antioxidantes y son en parte responsables del alto valor biológico del aceite de oliva virgen. Su contenido varía siendo menor cuando el aceite procede de frutos muy maduros u oxidados (Casanovas Castro, 2012).

El aceite de oliva virgen contiene pigmentos clorofílicos y carotenoides que son los responsables de su color que va desde verde (oscuro a claro) al dorado o amarillo según el contenido en pigmentos en el aceite de oliva, éste puede verse modificado por la variedad y grado de maduración del fruto. Los pigmentos están involucrados en los mecanismos de auto-oxidación y en la foto-oxidación del aceite.

Los pigmentos clorofílicos responsables del color verde en plantas superiores transforman la energía captada por los fotones en poder reductor actuando como fotorreceptores. Dichos pigmentos son bastante estables, salvo cuando se produce una pérdida de las condiciones fisiológicas tal y como ocurre durante la molienda.

Los pigmentos carotenoides son los responsables de la mayoría de los colores amarillos anaranjados y rojos de frutas y hortalizas. Captan la energía lumínica que luego transfieren a las clorofilas. Además, algunos de estos pigmentos de estructura terpenoide poseen actividad provitamina A, por ejemplo el beta-caroteno al dar lugar al retinol (Gandul Rojas et al., 2013).

### 1.3.3. Calidad del aceite de oliva virgen

Los avances logrados en el estudio de los alimentos han permitido definir la calidad de un alimento haciendo que el consumidor no solo se interese por la composición nutricional sino que considere sus propiedades saludables y características organolépticas de aroma y sabor agradables (Quizacán et al., 2011).

En el caso del aceite de oliva la obtención de calidad es una cadena que comienza en el olivo y termina cuando la botella llega al consumidor, la rotura de un solo eslabón supone la pérdida irreversible de la calidad. El fruto es el primer eslabón para obtener aceite de calidad.

La calidad de un aceite virgen se determina fundamentalmente a través de dos criterios, sus parámetros físico-químicos y sus características organolépticas (aroma, sabor) definidas por los expertos a través de un análisis sensorial o cata (COI, 2015b; CE 2013).

Los principales parámetros de calidad que se aplican actualmente son los siguientes (Román, 2012):

- *Grado de acidez*: determina la cantidad de ácidos grasos libres expresados en ácido oleico (%). Es apto para el consumo hasta 2°.
- *Índice de peróxidos*: determina el estado de oxidación primario, antes de que se aprecie el olor y el sabor a rancio. Sus límites para el consumo son de 20 meq O<sub>2</sub>/Kg.
- *Absorbancia al ultravioleta* (K232 y K270): determina compuestos de oxidación primaria y secundaria.
- *Evaluación organoléptica*: utiliza un análisis sensorial o cata para evaluar el conjunto de sensaciones que son detectadas por los sentidos.
- *Ésteres alquílicos*: se producen por el uso de prácticas inadecuadas en la cosecha y/o en el almacenamiento de las aceitunas antes de la obtención del aceite de oliva.

Además de estos parámetros de calidad existen otros que aún no están incluidos en el Reglamento de la Unión Europea, pero sí en otras regulaciones, generalmente de países tradicionalmente no productores de aceite de oliva, entre ellos se encuentran:

- *Pirofeofitinas*: son productos generados por la degradación de las feofitinas, que a su vez son compuestos de degradación de las clorofilas. Las pirofeofitinas aumentan con el tiempo de almacenamiento el aceite, por acción de la temperatura y/o la hidrólisis.
- *Diglicéridos*: son compuestos liposolubles derivados de los triglicéridos que tienen dos radicales de ácidos grasos. Están presentes en el aceite de oliva en un intervalo de 1 a 3% y son encontrados como 1,2- y 1,3-isómeros, según la posición de los radicales de ácidos grasos. Los 1,2-isómeros deben su presencia a la biosíntesis

incompleta de triglicéridos. Los 1,3-isómeros se atribuyen a la hidrólisis enzimática o química de triglicéridos que ocurre antes o durante el proceso de extracción del aceite. Además los 1,3-isómeros han sido atribuidos a la isomerización de los 1,2-isómeros durante el almacenamiento (Romero del Río, 2015).

La información aquí descrita en el apartado de calidad se encuentra resumida en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Información sobre los aceites de oliva comerciales atendiendo a los criterios de calidad descritos en la Norma de Comercialización de 5 de Diciembre de 2003 del COI.

		Aceites de Oliva			Aceite de Orujo-Oliva
		Virgen Extra	Virgen	Oliva (refinado)	
Análisis químico	Acidez libre	$\leq 0,8$	$\leq 2$	$\leq 1$	$\leq 1$
	Peróxidos	$\leq 20$	$\leq 20$	$\leq 15$	$\leq 15$
	Absorbancia K270	$\leq 0,22$	$\leq 0,25$	$\leq 0,90$	$\leq 1,70$
	Absorbancia K232	$\leq 2,50$	$\geq 2,60$	no definido	no definido
Análisis sensorial	Mediana de defecto	$= 0$	$> 0$ y $\leq 2,5$	no definido	no definido
	Mediana de frutado	$> 0$	$> 0$	no definido	no definido
	Puntuación panel cata	$\geq 6,5$	$\geq 5,5$	no definido	no definido

Los de parámetros calidad que se utilicen para evaluar el AOV deben ser indicadores robustos que permitan establecer la calidad de los aceites sin ninguna duda y que aporten información que puede ser relevante para otros aspectos tales como la autenticidad y seguridad.

Actualmente los pigmentos no forman parte de los parámetros de calidad del COI o la Unión Europea para el AOV, pero algunos pigmentos clorofílicos han sido propuestos como marcadores para establecer la calidad y la adulteración del aceite de oliva. Es el caso de la pirofeofitina *a*, que será objeto de estudio en este trabajo.



## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta revisión bibliográfica es evaluar el papel de las pirofeofitinas como marcadores del aceite de oliva virgen, abordando para ello diferentes objetivos parciales que se enumeran a continuación:

1. Revisión y actualización de diferentes aspectos relacionados con la calidad del aceite de oliva virgen.
2. Estudio de la formación de los pigmentos clorofílicos y sus derivados y de sus modificaciones a lo largo de la obtención y almacenamiento del aceite de oliva.
3. Revisión de los métodos de análisis de pigmentos clorofílicos y en particular de los empleos en el análisis de pirofeofitinas.
4. Evaluar el posible papel de la pirofeofitina como indicador de calidad/frescura.



### 3. METODOLOGÍA

#### **Búsqueda bibliográfica y fuentes de información**

Para la elaboración de esta revisión bibliográfica, se ha realizado una búsqueda de información en diferentes libros, tesis doctorales, trabajos, publicaciones existentes así como una selección de artículos relevantes seleccionados en bases de datos de interés científico.

El esqueleto de esta revisión bibliográfica consta de cuatro partes, la primera parte describe en rasgos generales las características del olivo, el fruto y el aceite de oliva. Para la elaboración de esta parte introductoria se ha realizado una búsqueda en libros, tesis doctorales y publicaciones existentes como el de María Casanovas Castro llamado “Metabolismo de compuestos fenólicos en olivas y estudio de aceites de oliva singulares de la provincia de Lleida” y el trabajo “Composición del aceite de oliva” de Jesús Lozano Sánchez y colaboradores. También se han realizado consultas a organismos como el Consejo Oleícola Internacional, y se han tomado pinceladas de artículos de interés sacados de páginas de Internet como [aceitedeoliva.com](http://aceitedeoliva.com) y [saborartesano.com](http://saborartesano.com).

La segunda parte trata sobre los pigmentos, dando respuesta a preguntas tales como: ¿Qué son?, ¿Dónde se encuentran los pigmentos clorofílicos?, que se ha elaborado con la ayuda del libro *Handbook of olive oil: analysis and properties*; del trabajo mencionado anteriormente: *Composición del aceite de oliva*, acompañado de búsquedas en Internet usando una serie de palabras o frases clave, siendo algunas: pigmentos, clorofila, feofitina, carotenos, color del aceite de oliva, parámetros de calidad del aceite de oliva, etc. La parte de las reacciones químicas que tienen lugar en el aceite de oliva, es decir, la bioquímica, se ha elaborado combinando información relevante obtenida de

las tesis doctorales sobre Evaluación de indicadores de calidad del aceite de oliva virgen: fortaleza, debilidades y oportunidades de Inmaculada Romero del Rio de Diciembre del 2015 con el trabajo sobre pigmentos en los alimentos de la Dra. Carmen Campos. Además se enlaza con algunas tesis y trabajos del grupo de investigación de la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Mínguez Mosquera del Instituto de la Grasa.

Para la tercera parte, que recoge los métodos de análisis, se ha recurrido al libro Handbook of olive oil: analysis and properties, a libros de Química Analítica y a trabajos de investigación que recogen las metodologías analíticas utilizadas, como el de Gertz y Fiebig de 2006.

La cuarta parte, relacionada con el papel de las pirofeofitinas como marcadores de la calidad y frescura del aceite de oliva virgen está basada en artículos recientes localizados mediante las palabras clave pyropheophytins, freshness, etc. así como en dos de las tesis doctorales mencionadas anteriormente.

Cabe destacar que algunos de los trabajos, tesis doctorales o publicaciones mencionados en la revisión bibliográfica se emplearon con el objetivo de enriquecer el texto, aportando información de gran ayuda debido a la poca diversidad de trabajos que existen sobre el tema en cuestión.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

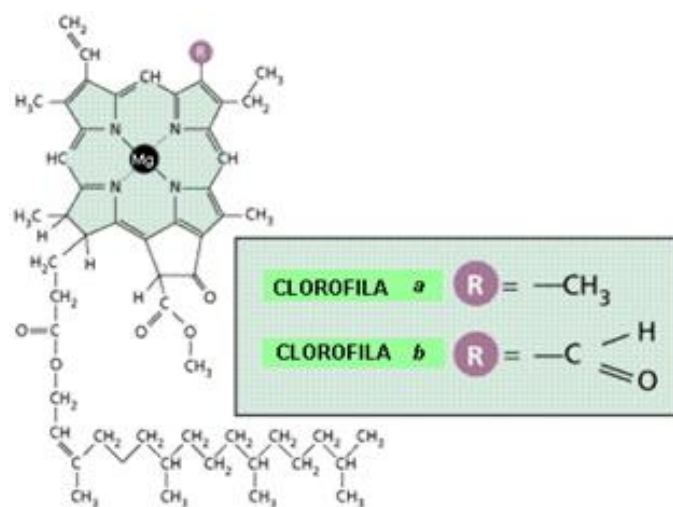
### 4.1. Pigmentos clorofílicos

Los pigmentos fotosintéticos son esenciales al conferir a las plantas la capacidad de realizar la fotosíntesis y sintetizar, por tanto, carbohidratos. Actividad que tiene lugar en los tilacoides definidos como estructuras en forma de sacos apilados que se encuentran en el interior de los plastidios de las células.

Los plastidios que contienen principalmente clorofilas se conocen como cloroplastos en cambio si el componente mayoritario son los carotenoides se denominan cromoplastos (Casanovas Castro, 2012).

#### 4.1.1. Estructura

Las clorofilas (Figura 8) se clasifican desde el punto de vista químico dentro del grupo de las porfirinas cuya estructura básica, común a esta serie de compuestos, está formada por cuatro unidades de pirrol que tienen las posiciones alfa unidas por puentes metálicos formando un nuevo sistema aromático estable. Una de las características más destacables de las porfirinas es la facilidad para la formación de quelatos con iones metálicos, aislando el metal firmemente unido en el espacio que limitan los cuatro átomos de nitrógeno en el sistema plano.



**Figura 8.** Estructura de la clorofila y diferenciación entre sus tipos (Fuente: Hipertextos de Área de la Biología).

En las clorofilas esta estructura está unida a un alcohol de veinte átomos de carbono (fitol). Existen varios tipos de clorofilas; la clorofila “a” tiene un grupo metilo ( $-\text{CH}_3$ ) en el anillo II, mientras que la clorofila “b” tiene un grupo formilo ( $-\text{CHO}$ ) en esa misma posición, tal como se muestra en la Figura 8.

La clorofila puede extraerse fácilmente mediante disolventes orgánicos (etanol, metanol o acetona) y utilizarse como colorante alimentario (Figura 9). En Europa tiene el código E-140.



*Figura 9. Queso tipo Gouda (con albahaca) coloreado con clorofila.*

#### 4.1.2. Metabolismo de clorofilas

Los primeros estudios encaminados a establecer las rutas bioquímicas implicadas en la biosíntesis de clorofilas se realizaron en 1951, a partir de ellos se propuso un esquema biosintético que, en su mayor parte, es aceptado en la actualidad (Gross, 1991).

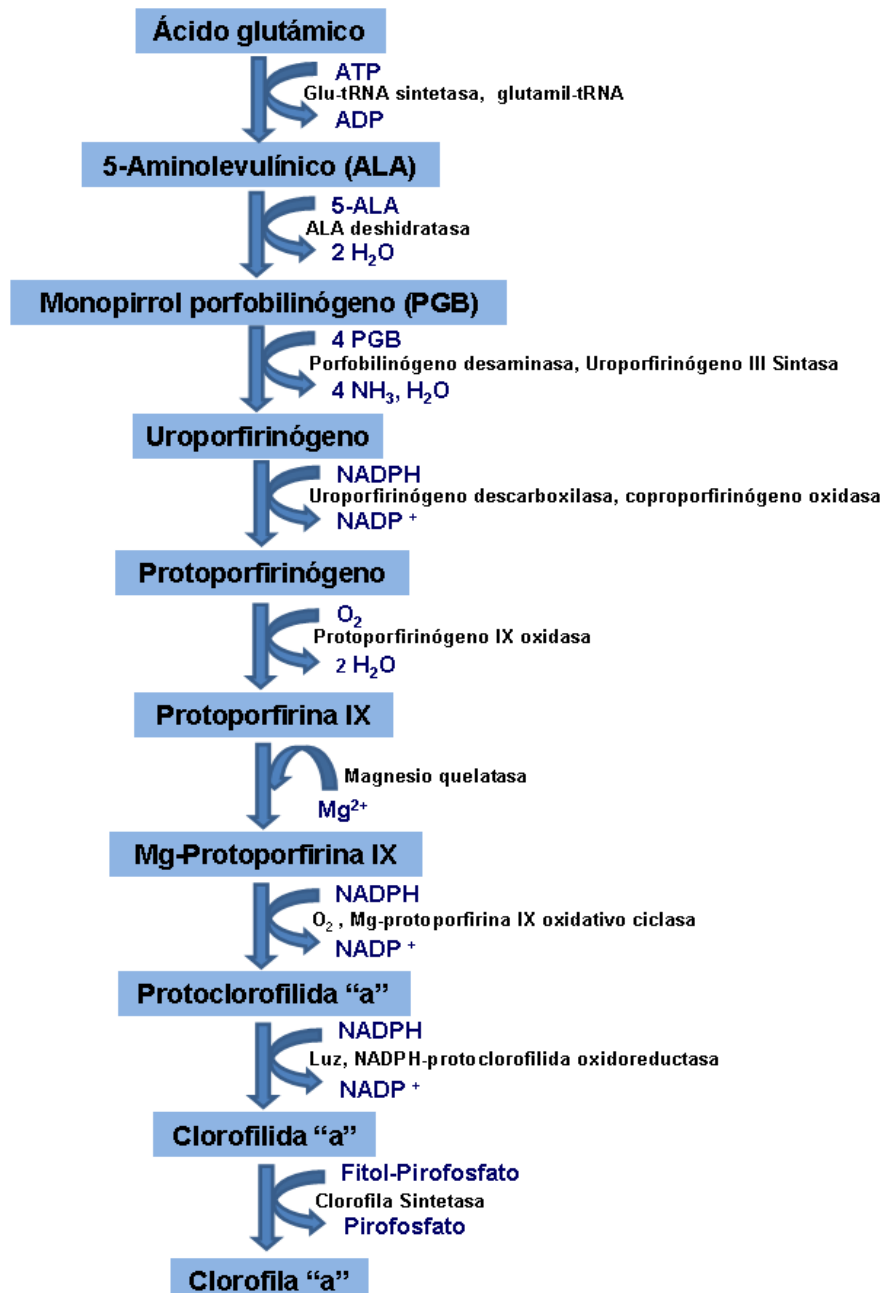
La biosíntesis de la clorofila “a” tiene lugar en diversos pasos (Aparicio-Ruiz, 2008):

1. formación de ácido 5-aminolevulínico.
2. formación del monopirrol porfobilinógeno por condensación de dos moléculas de ácido 5-aminolevulínico.
3. formación de uroporfirinógeno (el primer macrociclo tetrapirrólico, que presenta en cada anillo un grupo acético y propiónico) por condensación de cuatro moléculas de monopirrol porfobilinógeno.
4. formación de protoporfirinógeno, se produce por descarboxilación de las cadenas de acético a grupos metilo y la descarboxilación oxidativa de ácidos propiónicos a grupos vinilo en los anillo I y II.
5. formación de protoporfirina IX por deshidrogenación del macrociclo.
6. inserción de  $\text{Mg}^{2+}$  para dar Mg-protoporfirina IX.
7. formación del anillo isocíclico y de protoclorofilida “a”



8. reducción de protoclorofilida para dar clorofilida que posteriormente experimenta una esterificación del residuo de ácido propiónico del carbono 17 con fitol.
9. formación de clorofila “a”.
10. biosíntesis de clorofila “b”.

La Figura 10 muestra esos pasos de forma esquematizada.

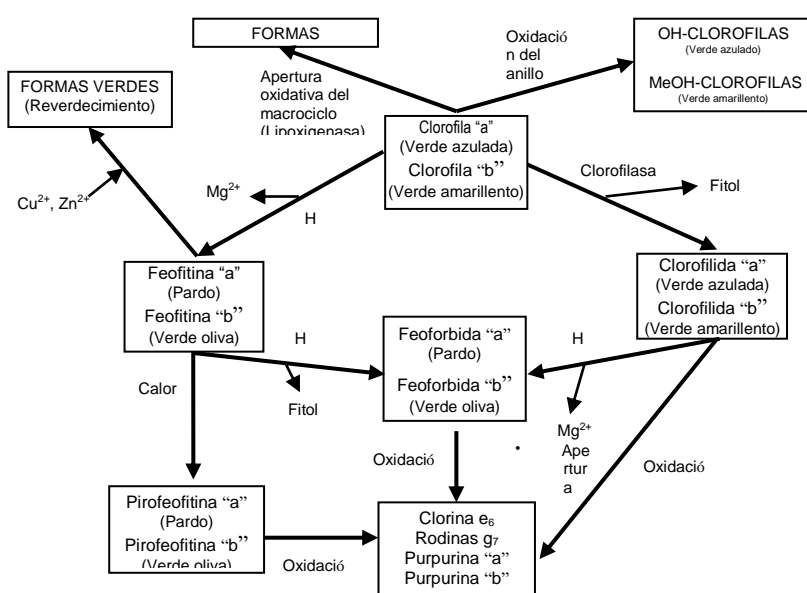


*Figura 10. Esquema de ruta biosintética de clorofilas en plantas superiores (Fuente: Aparicio-Ruiz 2008).*

### 4.1.3. Formación de derivados clorofílicos

Aunque las clorofilas son compuestos estables en su ambiente natural, una pérdida de las condiciones fisiológicas provoca una modificación en la estructura de los pigmentos originarios pasando a ser compuestos lábiles (Aparicio-Ruiz, 2010). La Figura 11 muestra las principales transformaciones estructurales que puede experimentar la molécula de clorofila. La mayor parte de ellas se deben al efecto de la temperatura en medio ácido, a la acción de enzimas como la clorofilasa o lipoxigenasa o a procesos oxidativos.

Las feofitinas se producen como consecuencia de la pérdida del átomo de magnesio de la clorofila, que es sustituido por hidrógeno en condiciones ácidas mediante una reacción irreversible dando lugar a las feofitinas “a” y “b” (siendo la velocidad de formación de la feofitina “a” más rápida que la de feofitina “b”) por un proceso que se conoce como feofitinización (conversión de clorofila a feofitina) (Figura 11). Este proceso aparece durante las fases de batido y centrifugación del aceite, que originan la ruptura de los tejidos del fruto. Es una de las alteraciones más frecuentes que tiene como consecuencia un cambio de color en los alimentos. Las feofitinas son responsables del color verde oliva con tonos marrones en lugar del verde brillante de la clorofila (Campos, 2013). La feofitina puede unir eficazmente iones Zn o Cu en el lugar que ocupaba el Mg originándose un reverdecimiento.



**Figura 11.** Principales transformaciones estructurales que puede experimentar la molécula de clorofila (Fuente: Aparicio-Ruiz, 2008).

Las pirofeofitinas son los derivados de la clorofila formados por la eliminación del grupo carboximetilo de la estructura de las feofitinas en el carbono de la posición 13 por acción de la temperatura, ya que un aumento de la temperatura origina la descarboxilación de ese carbono (Aparicio-Ruiz et al., 2014). Son productos generados por la degradación de las feofitinas, que a su vez son compuestos de degradación de las clorofilas. Las pirofeofitinas aumentan con el tiempo de almacenamiento del aceite, por acción de la temperatura y/o la hidrólisis.

Las clorofilas y feofitinas son las responsables del color verde mientras que los carotenoides son los responsables del color amarillo. La concentración de pigmentos establece el grado de madurez de la aceituna, cuando los frutos son verdes, las clorofilas y los carotenoides están agrupados en el cloroplasto en una relación de 5:1.

#### **4.2. Métodos de análisis de clorofilas y derivados**

La composición clorofílica y carotenoide se modifica por el grado de madurez en el que se recolectan los frutos, tiempo de permanencia en fábrica y condiciones a las que ha sido sometida en el proceso de extracción. Al avanzar la maduración desaparece la fracción clorofílica más rápidamente que la carotenoide, del mismo modo que en el proceso de extracción. Surge la posibilidad de relacionar el color del aceite de oliva con el contenido y clase de pigmentos clorofílicos y carotenoides presentes en el mismo ya que todo esto puede revelar información acerca de la calidad del aceite de oliva (Gandul Rojas et al., 1991) y para ello el análisis de estos pigmentos juega un papel relevante.

Los compuestos clorofílicos en el AOV forman parte de una matriz compleja, por lo que deben ser extraídos y aislados de la matriz como paso previo a su identificación y cuantificación. La cuantificación se lleva a cabo mediante espectroscopia ya que el grupo cromóforo de la estructura de la porfirina es capaz de absorber radiación en el espectro visible.

Se han desarrollado diferentes métodos para la determinación de los pigmentos clorofílicos. El primer método que proporcionó resultados cuantitativos sobre los mismos estaba basado en una cromatografía en capa fina en gel de sílice (TLC). En la actualidad se han desarrollado diferentes técnicas cromatográficas para la separación de pigmentos, destacando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que ha sustituido a la cromatografía en capa fina en la determinación de pigmentos pero

continúa utilizándose como procedimiento preparativo para la purificación de patrones de pigmentos (Gandul-Rojas et al., 2013).

#### 4.2.1. Métodos de extracción y purificación

##### Extracción en líquido-líquido (LLE)

Los métodos LLE permiten la separación de pigmentos de una matriz compleja debido a la diferencia de solubilidad de dos disolventes inmiscibles, siendo éstos la N,N-dimetilformamida (DMF) y el hexano, que se utilizan con éxito en el aceite de oliva (Mínguez-Mosquera et al., 1992).

Mediante este procedimiento clorofilas, derivados clorofílicos y xantofilas se retienen en DMF, a consecuencia de su polaridad, mientras que el resto de pigmentos se extraen en hexano.

Este método de extracción presenta inconvenientes, como necesitar grandes volúmenes de muestra y disolventes, que en la actualidad han sido reducidos con el desarrollo de nuevas propuestas que, sin embargo, mantiene sus ventajas con respecto a la selectividad, repetibilidad, límite de cuantificación, etc. (Romero del Río, 2015).

Si el objetivo del análisis es conseguir información detallada sobre el perfil completo de los pigmentos clorofílicos, entonces se emplea la LLE con DMF (Mínguez-Mosquera et al., 1992).

##### Extracción en fase sólida (SPE)

El método SPE es una técnica simple, económica y versátil que presenta escasos riesgos de sufrir pérdida o contaminación. Esta técnica de purificación del aceite de oliva emplea como agente absorbente entre otros sílica gel, C18, C30, diol, etc.

A grandes rasgos, los niveles de retención de luteína y beta-caroteno son lo suficientemente altos con C18 y C30, mientras que los niveles de retención de luteína con buenos con diol y sílica gel con respecto a los derivados clorofílicos que no permiten la retención en su totalidad con el C18 (Lozano Sánchez et al., 2009).

La bibliografía del aceite de oliva describe la técnica SPE con absorbente de sílica gel como la técnica de purificación más simple, versátil y económica para la extracción de pirofeofitinas (Gertz y Fiebig, 2006). La fracción de

pirofeofitina es eluída con acetona mientras que la parte no polar correspondiente al analito es eluída con éter etílico.

Hay que extremar precauciones en este método en el momento de la recogida de la muestra, seleccionando pequeñas cantidades de acetona, lo que requiere rapidez debido a su elevada volatilidad (Romero del Río, 2015).

#### 4.2.2. Métodos de separación

##### Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En la actualidad el HPLC con detector de matriz de diodos (DAD) es la técnica cromatográfica de elección para el análisis de pigmentos en el aceite de oliva.

Dicha técnica tiene origen en la cromatografía en columna clásica, compartiendo similitudes tanto en fundamento como en desarrollo con la cromatografía de gases (GC), siendo la habilidad con la que los constituyentes de la muestra se reparten entre las dos fases lo que condicionará la separación (Quintanares Piné et al., 2009)

Los métodos basados en HPLC pueden ser clasificados en dos grupos según utilicen fase estacionaria normal o fase estacionaria reversa. Los primeros estudios aplicaban una metodología HPLC en fase normal para la determinación o cuantificación de clorofilas, feofitinas y beta-carotenos en el aceite de oliva usando hexano/2-propanol (98,5:1,5 V/V) en condiciones isocráticas como fase móvil. Sin embargo estas condiciones no bastaban para permitir la elución de la luteína y para resolver este problema Psomiadou y Tuimidou (1998) ofrecen un sistema de elución en gradiente usando n-hexano/2-propanol (99:1, V/V) como fase “a” y 5% 2-propanolol como “b”, consiguiendo la determinación simultánea de alfa-tocoferol, beta-caroteno, clorofilas a y b, feofitinas a y b y luteína en un tiempo estimado de 20 minutos (Gandul-Rojas et al., 2013).

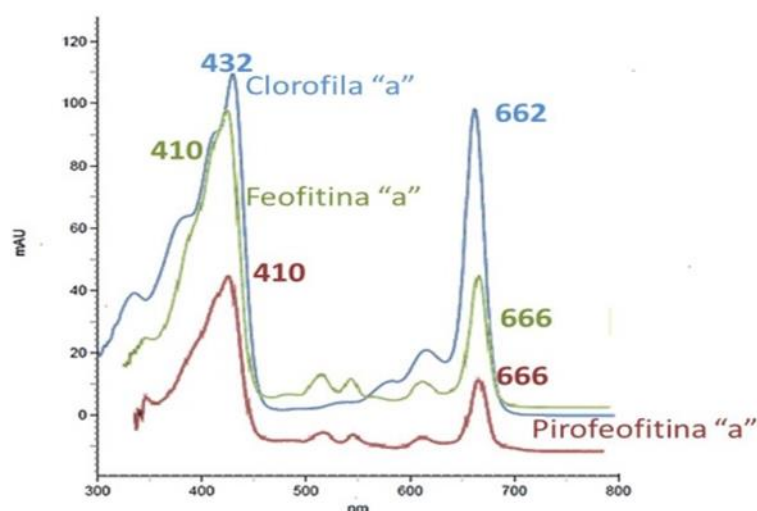
Si el objetivo es la cuantificación de carotenoides, clorofilas y sus derivados, se usa el método basado en la fase estacionaria normal (Mínguez-Mosquera et al., 1992). En el caso en el que solo se desee cuantificar la pirofeofitina y algunos otros pigmentos básicos, se utiliza el sistema de fase estacionaria reversa (Gertz y Fiebig, 2006).

#### 4.2.3. Métodos de detección y cuantificación

##### -Espectrofotometría

En el espectro de clorofila a se observa una banda característica a 432 nm y una segunda de menor importancia a 410 nm, en la región azul-violeta, mientras que en la región del rojo aparece un pico a 662 nm junto a otras bandas más pequeñas entre 500-700 nm.

En el espectro de la feofitina a se produce un desplazamiento hipsocrómico de 432 nm a 410 nm. Sin embargo, el desplazamiento de la segunda banda es batocrómico, de 662 nm a 666 nm (Figura 12). En el caso de la pirofeofitina a el espectro de absorción coincide con el de sus correspondientes precursores (Gandul-Rojas et al., 2013; Romero del Río, 2015).



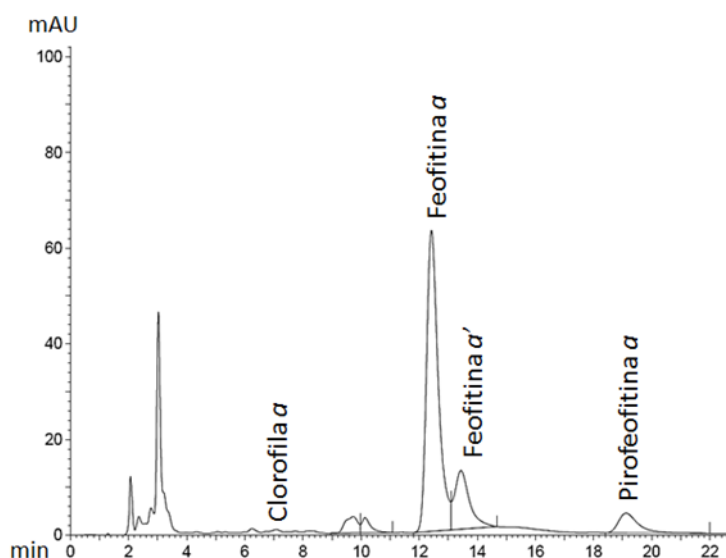
**Figura 12.** Espectros de absorción de clorofila a, feofitina a y pirofeofitina a (Fuente: Romero del Río, 2015).

El reglamento europeo y el COI no recogen el análisis de la clorofila y sus derivados como criterios de calidad del aceite de oliva virgen (CE, 2013; COI, 2015a).

No obstante, se han desarrollado diferentes métodos para la determinación de los pigmentos clorofílicos (Hornero-Méndez *et al.*, 2005; Giuffrida *et al.*, 2007; Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010), incluso centrados sólo en los pigmentos relacionados con procesos afectados por la temperatura (pirofeofitinas). El método descrito por Gertz y Fiebig (2006), que se basa en el aislamiento de los pigmentos mediante SPE y su posterior separación mediante HPLC-DAD, es uno de los más empleados para la cuantificación

de la pirofeofitina  $\alpha$ , y ha sido recogido por la International Standard Organization (ISO, 2009) y la German Society for Fat Science (DGE, 2012), siendo actualmente uno de los métodos más utilizados para la cuantificación de la pirofeofitina  $\alpha$ .

La Figura 13 muestra un cromatograma de pigmentos clorofílicos de una muestra de aceite de oliva virgen extra obtenido por este último método.



**Figura 13.** Cromatograma HPLC de pigmentos clorofílicos de un aceite de oliva extravirgen (Fuente: Romero del Río, 2015).

#### 4.3. Relación entre los pigmentos y la calidad del aceite de oliva virgen

La composición clorofílica y carotenoide presente en los alimentos ha supuesto que durante mucho tiempo se valorase en mayor medida por su función estética, debido a sus propiedades cromáticas, sin embargo, el trabajo de investigación (Gertz y Fiebig, 2006; Aparicio-Ruiz, 2010; Gandul-Rojas et al., 2013) ha propiciado que los pigmentos contenidos en frutos y vegetales se consideren auténticos indicadores de calidad. Para establecerlos es esencial conocer el contenido y clase de pigmentos en el fruto fresco, así como las transformaciones que ocurren en éste durante el procesado, para así evaluar el color con total garantía.

Se ha establecido como índice de calidad y autenticidad del aceite de oliva virgen en general un perfil clorofílico y carotenoide, cuya relación permanece constante en torno a la unidad, y la relación carotenoides minoritarios y luteína en torno al 0,5. Por otro lado,

los aceites monovarietales son identificados por las diferencias tanto en el total de pigmentos, como en la composición carotenoide (Roca y Mínguez-Mosquera, 2001).

La cantidad de pigmentos clorofílicos encontrados en el aceite de oliva virgen depende de factores genéticos, del estado de maduración del fruto, de los procesos de extracción y de las condiciones de almacenamiento. Existen estudios que indican que el contenido de clorofilas varía según la altitud a la que esté situado el cultivo. Por ejemplo, en aceites obtenidos en zonas de la cuenca del Mediterráneo el contenido de clorofilas es inferior al de aceites obtenidos de aceitunas cultivadas en altitud. Y también se ha puesto de manifiesto que existen diferencias en el contenido de pigmentos según la variedad, siendo Hojiblanca y Picual las que presentan un mayor contenido frente a otras como Arbequina (Gandul-Rojas et al., 2013). Por este motivo existe cierta controversia a la hora de establecer el contenido inicial de los pigmentos del aceite (Romero del Río, 2015).

La determinación de algunos pigmentos clorofílicos se ha propuesto como método para establecer la calidad y la adulteración del aceite de oliva. Es el caso de la pirofeofitina *a*, cuya formación se ve afectada por la temperatura. Su presencia en aceites de oliva vírgenes se ha relacionado con la adición fraudulenta de aceites desodorizados a baja temperatura (Aparicio-Ruiz et al., 2010). La desodorización a bajas temperaturas (< 100 °C) permite la eliminación de los compuestos volátiles responsables de los defectos sensoriales, sin embargo, algunos autores (Gandul-Rojas et al., 2013) han observado que se produce un aumento de la concentración de pirofeofitina *a* y, en consecuencia, se ha sugerido el porcentaje de pirofeofitina *a* como un marcador químico de la degradación del aceite (Gandul-Rojas et al., 1999). Incluso existen algunas normativas que han establecido la pirofeofitina *a* como marcador de calidad del aceite de oliva para la categoría virgen extra, fijando el límite en un porcentaje inferior al 17% (García-González et al., 2017) (Tabla 2).



**Tabla 2.** Valores límite (%) de pirofeofitinas (PPP) para la categoría de aceite de oliva virgen extra según distintas normativas (Fuente: García-González et al., 2017).

Marcador	COI	EU	Codex Alimentarius	USA	California (USA)	Australia	South Africa
PPP en AOVE	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	≤17	≤17	≤17

Nota: EVOO, aceite de oliva virgen extra; n.e., no hay valor establecido para este marcador.

#### 4.4. Pirofeofitinas, calidad y frescura del aceite de oliva virgen

Tal como se ha dicho anteriormente la calidad del aceite de oliva depende de varios factores, entre ellos se encuentran los ambientales (clima y suelo), los agronómicos (técnicas de cultivo) y los genéticos (variedad de aceituna). Así como el tratamiento tecnológico de la aceituna y el modo de conservación del aceite una vez obtenido.

Los procesos de hidrólisis (por agentes enzimáticos dan lugar a la formación de ácidos libres) y las reacciones de oxidación (originan alcoholes, cetonas y aldehídos que producen mal olor y sabor modificando por ende las características organolépticas) son los responsables del deterioro que sufre el aceite con el tiempo.

Los criterios de calidad y sus límites vienen recogidos en los reglamentos de la Unión Europea, Reglamento CE 2568/ 1991 y posteriores modificaciones (CE, 2013) referentes a las características de los aceites de oliva y sus métodos de análisis. Estas normas establecen la clasificación comercial de los aceites en sus distintas categorías basándose en una serie de parámetros físico-químicos (acidez libre, índice de peróxidos, coeficientes de extinción específica, etc.) y sensoriales (Benito et al., 2009).

Aunque se ha relacionado el contenido de pirofeofitina a con la calidad, a menudo los conceptos de calidad y frescura del aceite de oliva tienden a ser confundidos, a pesar de que son términos independientes. Por ejemplo, aceites no frescos (después de un largo período desde su obtención) pero obtenidos de aceitunas de buena calidad pueden tener

mejor calidad sensorial que aceites frescos pero obtenidos de aceitunas dañadas (macadas, infectadas, etc.) (Aparicio-Ruiz et al., 2014; Romero de Río, 2015).

Varios estudios realizados muestran como la pirofeofitina a es un parámetro de frescura y no de calidad del aceite de oliva (Aparicio-Ruiz, 2014), tal y como mostró un trabajo (Aparicio-Ruiz, 2010) en el que se analizaron 6 aceites, 3 almacenados con refrigeración a 4°C y otros 3 a una temperatura ambiente de 25°C durante 4 años. En estos últimos se observó un elevado porcentaje de pirofeofitina a mostrando el efecto de la temperatura en la conversión de feofitina “a” a pirofeofitina “a”.

Las pirofeofitinas tienen solo una relación casual con la calidad sensorial del aceite, que generalmente va disminuyendo a lo largo del tiempo debido a procesos oxidativos. Durante estos procesos se genera la presencia de aromas desagradables, lo que coincide con el aumento de pirofeofitinas, pero de forma meramente casual. Por ese motivo no serían buenos marcadores para la calidad sensorial pero lo serían como marcadores de frescura, ya que muestran una alta correlación con el tiempo de almacenamiento (vida-útil) del aceite y podrían contribuir a la armonización del parámetro “consumir preferentemente antes de”.

Se puede concluir que la pirofeofitina “a” podría considerarse como indicador de la frescura del aceite, además de proporcionar información sobre las condiciones de almacenamiento a la que ha estado sometido.



## 5. CONCLUSIONES

1. El aceite de oliva virgen es un producto de alto valor añadido que forma parte de la dieta mediterránea debido a sus propiedades sensoriales y saludables. España es el primer país productor a nivel mundial, por lo que el sector olivarero es uno de los componentes principales del sistema agroalimentario español
2. Los pigmentos clorofílicos están presentes en el aceite al que llegan a partir del fruto. Aunque las clorofilas son moléculas estables pueden sufrir alteraciones mediante procesos enzimáticos, oxidativos o térmicos que originan compuestos derivados. Las pirofeofitinas se generan por degradación de las feofitinas, que a su vez son compuestos de degradación de las clorofilas.
3. Se han puesto a punto distintos métodos de análisis para determinar los pigmentos clorofílicos en el aceite de oliva virgen. El análisis requiere de una etapa previa de aislamiento de los pigmentos seguida de una separación cromatográfica mediante HPLC. El método más usado actualmente para la determinación de pirofeofitina utiliza SPE-HPLC-DAD.
4. La concentración de pirofeofitina en los aceites de oliva vírgenes aumenta con la temperatura y con el tiempo de almacenamiento, lo que posibilita su uso como marcador. Ya ha sido incorporado a las normativas de algunos países productores pero no a la de la Unión Europea ni a la del COI.
5. El contenido de pirofeofitinas no está relacionado con la calidad organoléptica, pero sí un buen indicador de la frescura del aceite. Puede proporcionar información útil sobre las condiciones de almacenamiento del aceite de oliva virgen e incluso podría contribuir a la armonización del criterio para establecer la fecha de consumo preferente.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AAO. Agencia para el Aceite de Oliva. MAPAMA; 2017. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/funciones-estructura/organizacion-organismos/organismos-publicos/aao/>
- Aparicio-Ruiz R. Características de las reacciones de termodegradación de pigmentos clorofílicos y carotenoides en aceite de oliva virgen. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. 2008.
- Aparicio-Ruiz R, Mínguez Mosquera MI, Gandul Rojas B. Thermal degradation kinetics of chlorophyll pigments in virgin olive oils. 1. Compounds of series a. *J Agric Food Chem.* 2010; 58: 6200-6208.
- Aparicio-Ruiz R, Aparicio R, García-González DL. (2014). Does 'best before' date embody extra-virgin olive oil freshness? *J Agric Food Chem.* 2014; 62: 554-556.
- Bartolini G, Prevost G, Messeri C, Carignani, G, Menini UG. *Olive Germplasm: Cultivars and World-wide Collections.* Rome: FAO; 1998.
- Benito M, Oria R, Sánchez-Gimeno AC. Influencia del retraso en el procesado de las aceitunas tras la recolección, en parámetros físico-químicos y nutricionales del aceite de oliva de la variedad Racimilla. *Grasas Aceites.* 2009; 60(4): 382-387.
- Campos C. *Pigmentos: clorofila, características, alteraciones, métodos para proteger el color.* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. 2013.
- Cano Marchal P, Gómez Ortega J, Aguilera Puerto D, Gómez García J. Situación actual y perspectivas futuras del control del proceso de elaboración del aceite de oliva virgen. *RIAI.* 2011; 8: 258-269.

- Casanovas Castro M. Metabolismo de compuestos fenólicos en olivas y estudio de aceites de oliva singulares de la provincia de Lleida. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida. 2012.
- CE. Reglamento nº 172/66/CEE de la Comisión por el que se establecen los coeficientes de equivalencia de las diferentes denominaciones y calidades de los aceites de oliva que no se hayan sometido a un proceso de refinación; 5 de noviembre de 1966.
- CE. Reglamento nº1348/2013 de la Comisión que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. Diario Oficial de la Unión Europea, L 338, 31-67; 2013.
- COI. El olivo, el aceite y la aceituna. Madrid: Consejo Oleícola Internacional; 1998.
- COI. Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T. 15/Doc nº3/Rev. 8. Madrid: Consejo Oleícola Internacional; 2015a.
- COI. Sensory analysis of olive oil. Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. COI/T. 20/Doc. nº15/Rev. 7. Madrid: Consejo Oleícola Internacional; 2015b.
- COI. Consejo Oleícola Internacional. Datos producción, consumo, exportación e importación europea y mundial de aceite de oliva; 2017. Disponible en: [www.internacionaoliveoil.org](http://www.internacionaoliveoil.org).
- Di Giovacchino L. Technological aspects. En: Aparicio R, Harwood J, editores. Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties. New York: Springer Science; 2013. p 57-96.
- DGE (2012). Hinweise zu den DGF-Einheitmethoden C-VI 15 (08) und C-VI 16 (08) zur Bestimmung von Pyropheophytin a und isomeren Diacylglycerinen. Germany: German Society for Fat Science; 2012.
- Gandul Rojas B, Gallardo Guerrero L, Garrido Fernandez J, Minguez Mosquera MI. Control de pigmentos clorofílicos y carotenoides por HPLC en el aceite de oliva virgen. Informe del grupo C.S.I.C. Sevilla. 1991.
- Gandul Rojas B, Gallardo Guerrero L, Roca M, Aparicio Ruiz R. Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Color Issues. En: Aparicio R, Harwood J, editores. Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties. New York: Springer Science; 2013. p.220-254.

- García-González DL, Tena N, Romero I, Aparicio-Ruiz R, Morales MT, Aparicio R. A study of the differences between trade standards inside and outside Europe. *Grasas Aceites*. 2017; 68: 15-28.
- Gertz C, Fiebig HJ. Pyropheophytin a: Determination of thermal degradation products of chlorophyll a in virgin olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2006; 108: 1062-1065.
- Gómez-Rico Rodríguez-Barbero A. Influencia de factores agronómicos y tecnológicos en el perfil de los compuestos fenólicos y volátiles del aceite de oliva virgen de calidad. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha; 2008.
- Gross J. Pigments in vegetables. Chlorophylls and carotenoids. New York: Van Nostrand Reinhold; 1991.
- Guiuffida. D, Salvo. FA, La Pera. L, Dugo G. Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. *Food Chem*. 2007; 101, 833-837.
- Hornero-Méndez D, Gandul-Rojas B, Mínguez-Mosquera MI. Routine and sensitive SPE-HPLC method for quantitative determination of pheophytin a and pyropheophytin a in olive oils. *Food Res Int*. 2005; 38: 1067-1072.
- ISO. International Organization for Standardization, 29841. Vegetables fats and oils- Determination of the degradation products of chlorophylls a and a' (pheophytins a, a' and pyropheophytins. Ginebra; 2009.
- Lozano Sánchez J, Segura Carretero A, Fernández Gutiérrez A. Composición del Aceite de Oliva. En: Fernández Gutiérrez A, Segura Carretero A, editores. *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía*. Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja; 2009. p. 197-224.
- Luna G. Caracterización de aceites de olive vírgenes europeos: implicaciones del análisis sensorial y la actitud de los consumidores. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla; 2003.
- Mínguez-Mosquera MI, Gandul-Rojas B, Gallardo-Guerrero ML. Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 1992; 40: 60-63.
- Morales MT, León-Camacho M. Gas and liquid chromatography: Methodology applied to olive oil. En: En: Harwood JL, Aparicio R, editores. *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*. Gaithersburg, MA (USA): Aspen Publishers, 2000. p. 159–207.

- Morales MT, Luna G, Aparicio R. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chem.* 2005; 91: 293-301.
- Morettini A, Binni G, Bellini E. Comportamento di alcune cultivar di olivo da tavola francesi e spagnole nella Maremma toscana. *Riv Ortoflorofruitt.* 1972<; 56 (1): 3-19.
- Quintanares Piné R, Domínguez Corona JJ, Segura Carretero A, Fernández Gutierrez A. Técnicas de análisis del aceite de oliva. Fernandez Gutierrez A, Segura Carretero A, editores. *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía.* Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja; 2009. p. 249-285.
- Quizacán MC, Díaz AC, Zuluaga CM. La nariz electrónica, una novedosa herramienta para el control de procesos y calidad en la industria agroalimentaria. *Vitale (Facultad de Química Farmacéutica Colombia).* 2011; 18 (2): 209-17.
- Roca M, Mínguez-Mosquera MI. Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *J Agric Food Chem.* 2001: 49, 832-840.
- Román S. Calidad del aceite de oliva. Úbeda; 2012. Disponible en:  
<https://es.slideshare.net/sergiomarta/calidad-del-aceite-de-oliva-virgen>
- Romero del Río I. Evaluación de indicadores de la calidad del aceite de oliva virgen: fortalezas, debilidades y oportunidades. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla; 2015.
- Uceda M, Hermoso M. La Calidad del Aceite de Oliva. El cultivo del olivo. Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L., editores. Junta de Andalucía. 1997.
- Valenzuela A, Morgado N. Las grasas y aceites en la nutrición humana: Algo de su historia. *Rev Chil Nutr.* 2005; 32 (2).