

XXXVI Asamblea del Instituto de la Grasa

PIGMENTOS CLOROFÍLICOS COMO MARCADORES DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Dr. Beatriz Gandul Rojas

Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos



PPP ≤ 17





¿Qué es PPP?

¿Por qué $PPP \leq 17$?

¿Cómo hacer $PPP \leq 17$?

PPP: porcentaje de pirofeofitina “a”

PPP: Percentage of Pyropheophytin

Pirofeofitina “a”

- ✓ **Se forma a partir de feofitina “a”**
- **Marcador de las condiciones de almacenamiento del AOV.**
- **Conexión con la fecha de consumo preferente del AOV:
“Best before”**

Reglamento (UE) nº 1169/2011

sobre la información alimentaria facilitada al consumidor

CAPÍTULO IV

INFORMACIÓN ALIMENTARIA OBLIGATORIA

SECCIÓN 1, Artículo 9

Lista de menciones obligatorias:

✓ fecha de duración mínima o de caducidad

AOV: “sin especificar”

✓ condiciones especiales de conservación

AOV: “al abrigo de la luz y del calor”

Necesitamos una base científica para otorgar una fecha de consumo preferente:

- ✓ **garantías al consumidor**
- ✓ **no en forma aleatoria ni generalizada**

Se demandan métodos para predecir la vida útil del aceite de oliva

Vida útil de un alimento

Período en que puede mantenerse, en las condiciones de almacenamiento especificadas, sin que pierda su seguridad y calidad óptimas



Vida útil



Fecha de consumo preferente

¿Quién y cómo la establece?

✓ A criterio del envasador

✓ 18-24 meses?

La vida útil empieza desde la elaboración

¿Almazara?

¿Envasadora?



¿Qué edad tiene nuestro aceite?

Iniciativa positiva & compleja

Estudios de vida útil

Dependen:

- ✓ **Proceso de fabricación: calidad**
- ✓ **Tipo de envasado**
- ✓ **Condiciones de almacenamiento**
- ✓ **Ingredientes**

ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL

Monitorizar el envejecimiento

¿Cómo?

Midiendo un parámetro sensible a las condiciones especiales de almacenamiento del AOV: “al abrigo de la luz y el calor”, en función del tiempo y la temperatura

¿Qué parámetro utilizar?

parámetros de calidad reglamentados:
Acidez, Ks, IP

se pueden aplicar para rastrear el deterioro o el envejecimiento del AOV bajo diferentes condiciones de almacenamiento

Otros parámetros químicos:

- ✓ Volátiles
- ✓ Diglicéridos
- ✓ Fenoles
- ✓ Pigmentos clorofílicos

Monitorizar el envejecimiento

¿Qué hacer?

➤ Tests de almacenamiento real: modelos empíricos
predecir en condiciones específicas

➤ Un paso más: modelo cinético

Predecir en función de variables del almacenamiento

2008: primeros estudios cinéticos (índice de peróxidos; K_s).

Monitorizar el envejecimiento

❖ Pigmentos clorofílicos

1) Tests de almacenamiento real:

AOVs de distintas variedades:

- ✓ temperatura controlada de 15°C
- ✓ temperatura ambiente

2) Estudio termocinético de degradación:

- ✓ diferentes temperaturas controladas
- ✓ diferentes aceites

Establecer

“un modelo cinético de predicción”

parámetro de degradación elegido

% de pirofeofitina a

PPP

¿que conseguimos?

**predecir la evolución de PPP
durante el almacenamiento del AOV**

¿en que condiciones?

❖ **no en unas únicas condiciones concretas,
sino en función de las condiciones térmicas
del almacenamiento:**

Opciones:

- ✓ **Temperatura fija controlada**
- ✓ **Temperatura ambiente del lugar**

¿Por qué elegimos PPP?

- ✓ Pigmento no propio del AOV recién extraído
- ✓ Se forma durante el almacenamiento del AOV
- ✓ Es muy sensible a la temperatura
- ✓ Porcentaje de PP permite eliminar variables:
Contenido total en pigmentos
f (variedad y estado de madurez)

PERFIL DE PIGMENTOS COMO INDICE DE AUTENTICIDAD Y CALIDAD

Aceite de oliva virgen fresco

Pigmentos del Fruto fresco

+

Pigmentos productos de la elaboración

Cambios químicos y enzimáticos

CLOROFILAS

Clorofila *a*

Clorofila *b*

Clorofilas alomerizadas:

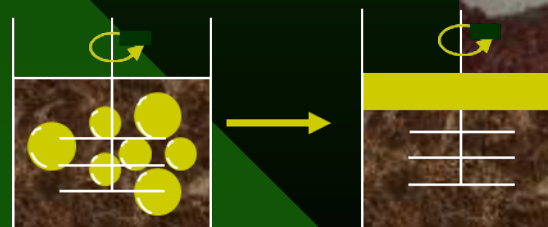
13² OH-clorofilas

15¹ OH-Lactona-clorofilas

Clorofilidas*



CAROTENOIDES



PERFIL DE PIGMENTOS COMO INDICE DE AUTENTICIDAD Y CALIDAD

Aceite de oliva virgen fresco

Pigmentos del Fruto fresco

+

Pigmentos productos de la elaboración

Cambios químicos y enzimáticos

DERIVADOS CLOROFÍLICOS

CLOROFILAS

Clorofila *a*
Clorofila *b*

Clorofilas alomerizadas:
13² OH-clorofilas
15¹ OH-lactona-clorofilas

Clorofilidas*

CAROTENOIDES

Feofitinas *a* y *b*

Feofitinas alomerizadas:
13² OH-feofitinas
15¹ OH-lactona-feofitinas

*feoforbidas

CAROTENOIDES

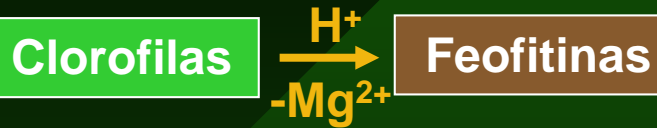


**Perfil de pigmentos es sensible a la degradación durante el almacenamiento del AOV
Incluso “al abrigo de la luz y el calor”**



Cambios asociados al almacenamiento

Feofitinización



- Oscuridad y Oxígeno limitado

Pirofeofitinización



Alomerización/Oxidación

Feofitinas

Derivados alomerizados

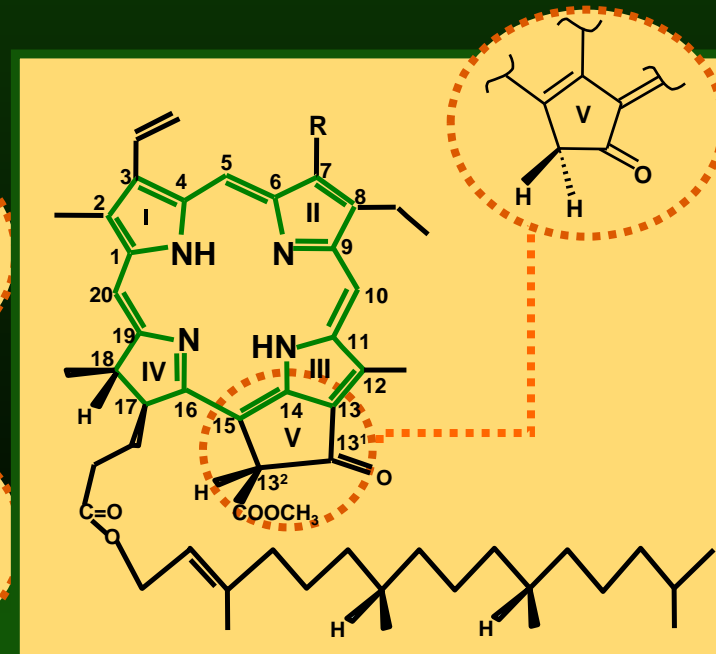
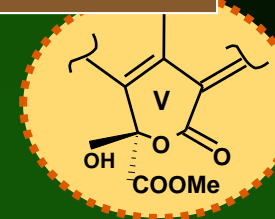
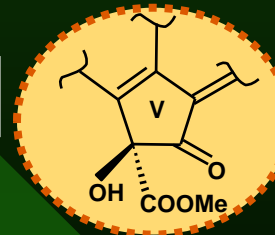
Luz

O_2

13² OH-feofitinas

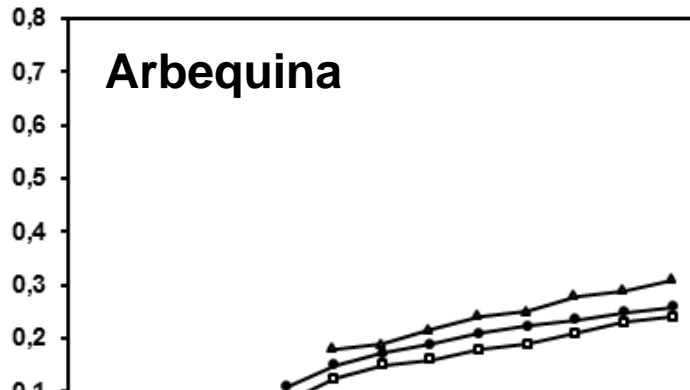
Derivados Incoloros

15¹ OH-lactona-feofitinas

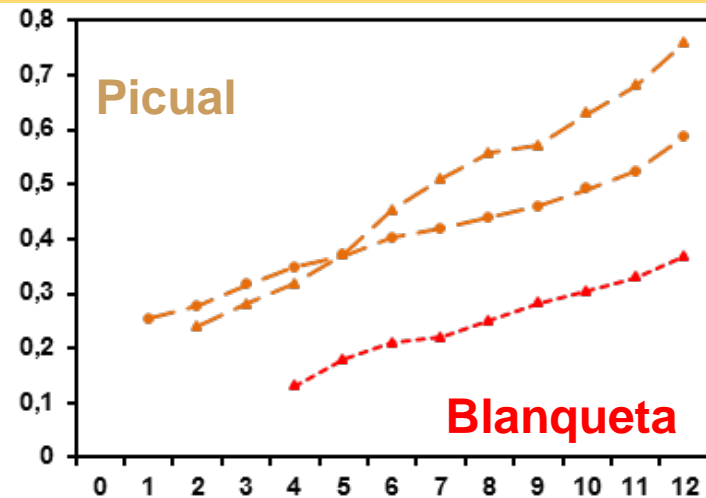
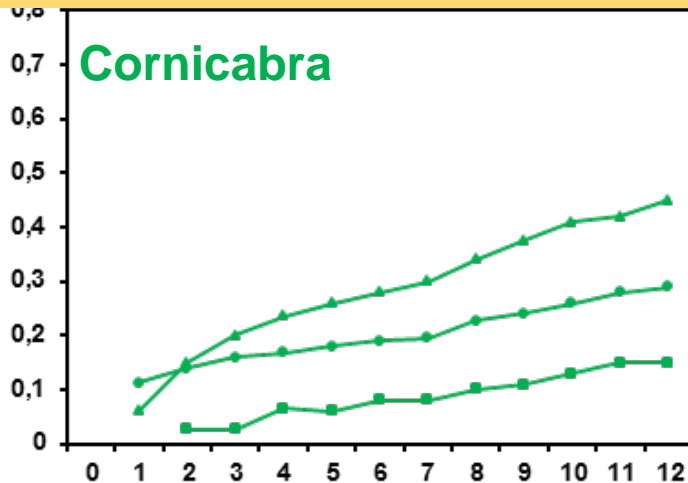


ALMACENAMIENTO A 15°C

Cambios en concentración de PP ($\mu\text{mol/kg}$)



Parámetro muy variable

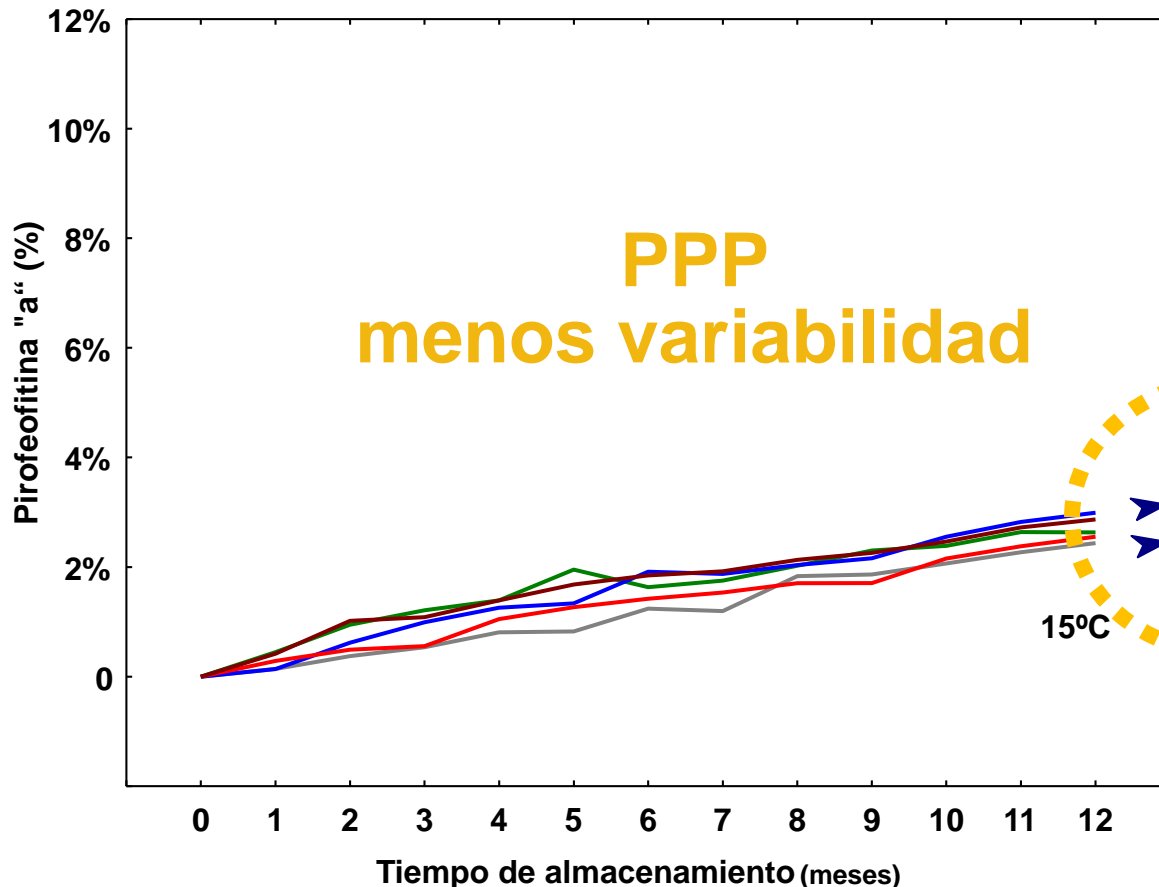


ALMACENAMIENTO A 15°C

Porcentaje de Pirofeofitina (PPP)

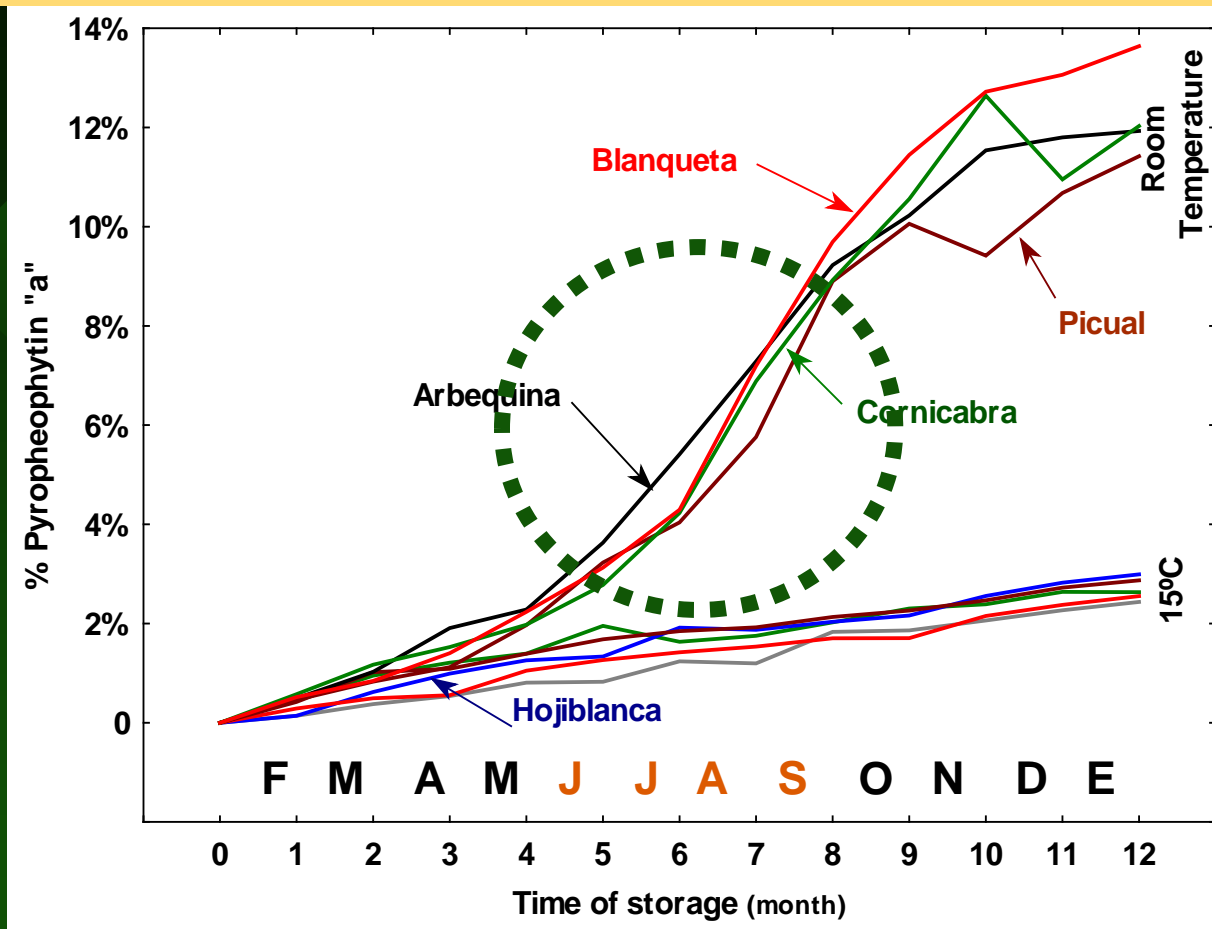
PPP: $100 \times \text{pirofeofitina "a"} / (\text{pirofeofitina "a"} + \text{feofitina "a"})$

$$\% Pfa = 100 \times Pfa / (Pfa + fa)$$



ALMACENAMIENTO A TEMPERATURA AMBIENTE

Cambios en PPP



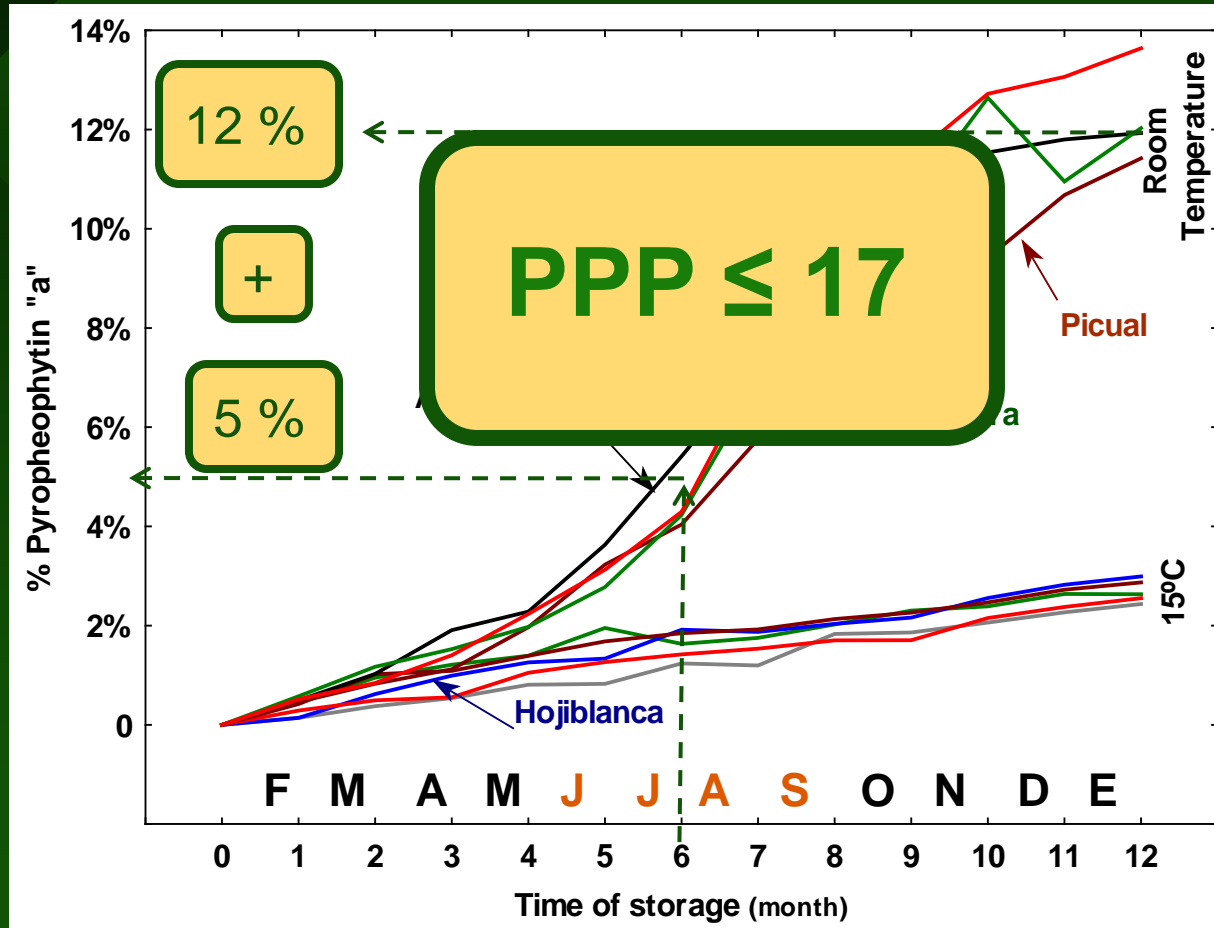
1) Gandul-Rojas B, Roca M, Carmona-Ramón C, Mínguez-Mosquera MI 1999. *1th INTERNATIONAL CONGRESS ON PIGMENTS IN FOOD TECHNOLOGY*: "Stability of chlorophyll pigments during storage of virgin olive oil".

2) Gandul-Rojas B, Hornero-Méndez D, Roca M, Aparicio-Ruiz R, Mínguez Mosquera MI. 2005. *26th WORLD CONGRESS AND EXHIBITION OF THE ISF. MODERN ASPECTS OF FATS AND OILS*. "Determination of pyropheophytin to pheophytin ratio as quality index in extra virgin olive oils".

3) Roca, M, Aparicio-Ruiz R, Gandul-Rojas B, Mínguez-Mosquera MI. 2006. *4th EURO FED LIPID CONGRESS: OILS, FATS AND LIPIDS FOR A HEALTHIER FUTURE*. Chemistry behind colour of virgin olive oil.

ALMACENAMIENTO A TEMPERATURA AMBIENTE

Cambios en PPP



% Pirofeofitina *a*

PPP

Parámetro Marcador de :
- Grado de frescor
- Condiciones térmicas



investigar
dependencia con la T

- ▶ **establecer un modelo cinético**
describir los cambios del parámetro PPP.

Monitorizar el envejecimiento del AOV

- 1) Elegir parámetro: PPP
- 2) Tests de almacenamiento real
- 3) Establecer un modelo cinético

capaz de predecir su evolución en F (variables del almacenamiento):
tiempo y temperatura

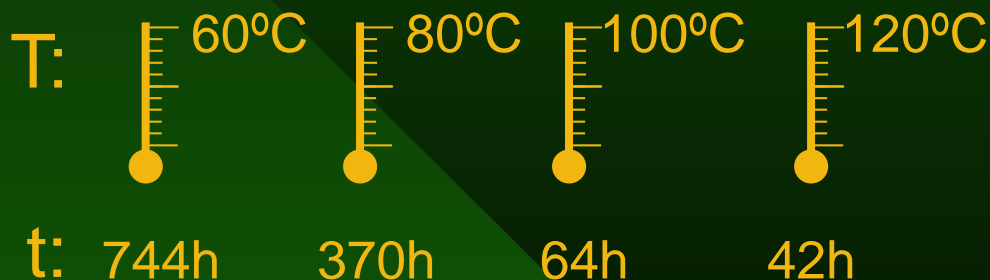
Fijas: oscuridad y disponibilidad limitada de oxígeno

ESTUDIO TERMOCINETICO

Caracterización de las reacciones de termo-degradación de "feofitina "a"

en función de:

- Temperatura



X 32



Tipo de matriz :

– según un contenido en pigmentos:

- alto
- medio
- bajo

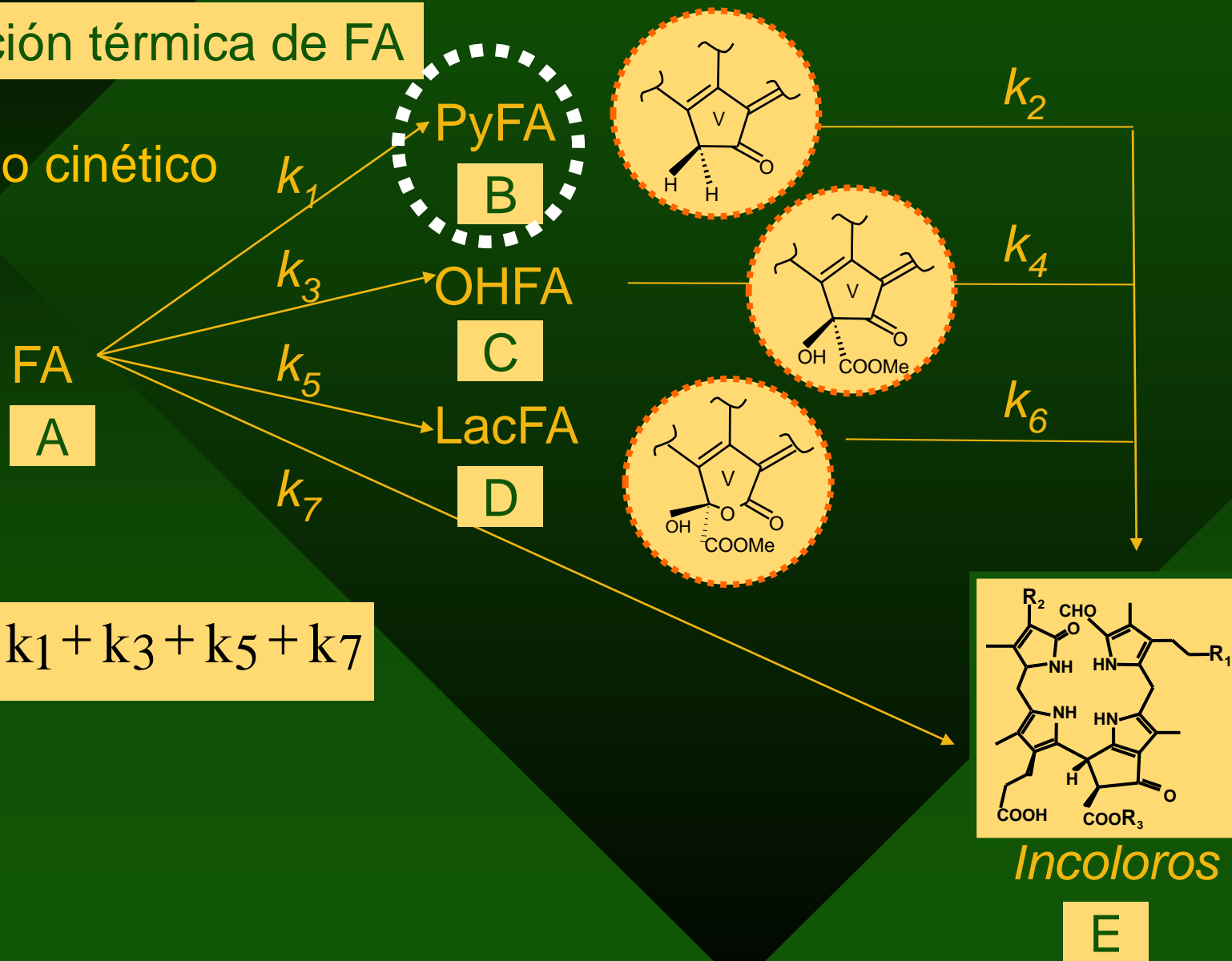
3 Muestras de AOV de la cooperativa “Sor Ángela de la Cruz”, Oleoestepa.

Muestra	Fecha de obtención	Contenido en pigmentos (nmol/kg)	
			Clorofilas Serie “a”
N	Noviembre	Alto	16484,6 ± 322,9
D	Diciembre	Medio	9146,3 ± 469,5
E	Enero	Bajo	3185,0 ± 154,4

ESTUDIO TERMOCINÉTICO

Degradación térmica de FA

Mecanismo cinético



Velocidad de la reacción, V

$$V = -\frac{d[C]}{dt} = k \cdot [C]^n$$

$n = 1$

$$-\frac{d[C]}{dt} = k \cdot [C]$$

Integración

$$[C] = [C]_0 e^{-k \cdot t}$$

$$[Fa] = [Fa]_0 e^{-k_{ta} \cdot t}$$

$$k_{ta} = k_1 + k_3 + k_5 + k_7$$

$$[Pirofa] = \frac{k_1 [Fa]_0}{k_2 - k_{ta}} \left[e^{-k_{ta} \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t} \right] + [Pirofa]_0 e^{-k_2 \cdot t}$$

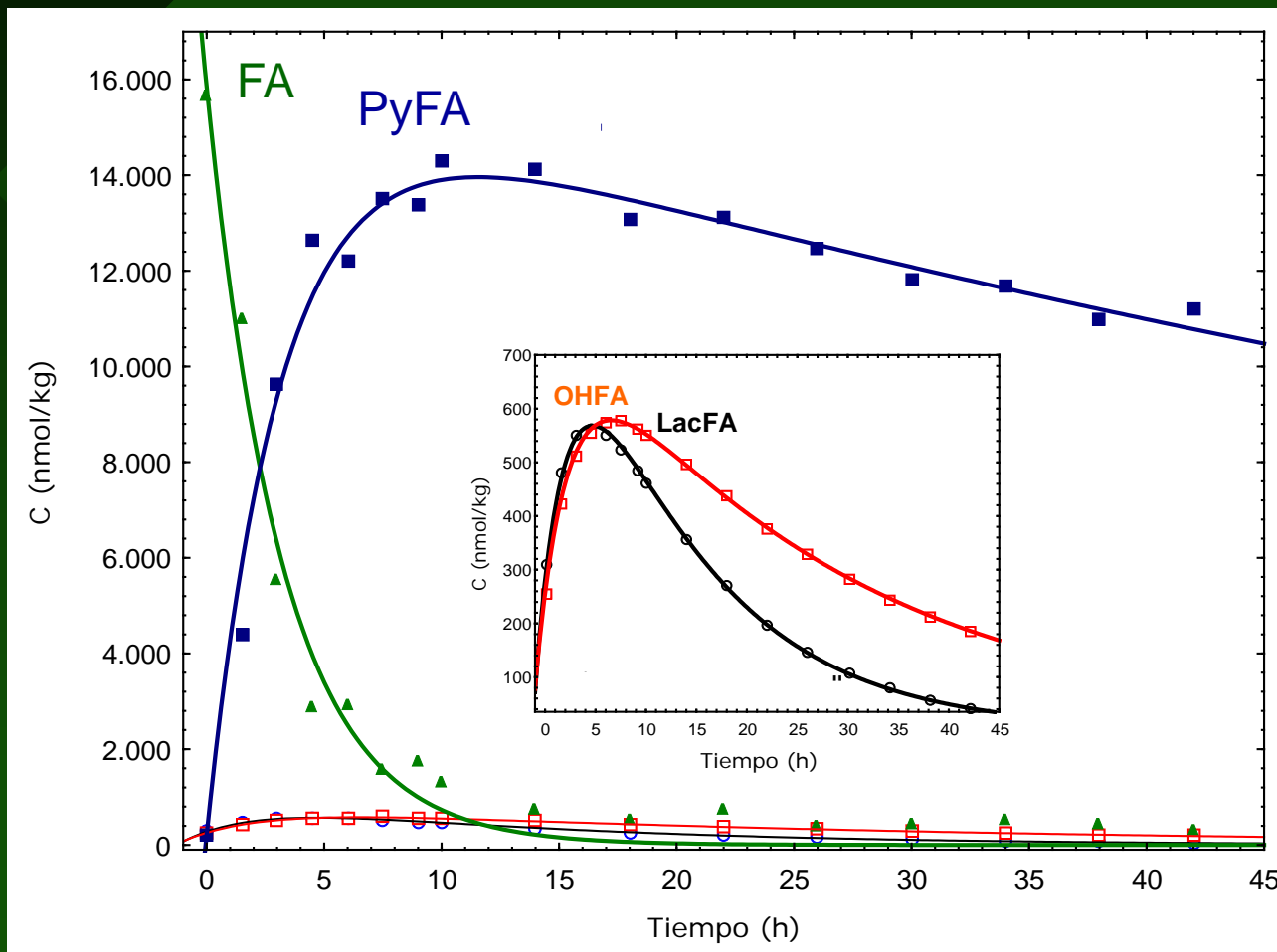
Estudio cinético:

120 °C en Matriz Noviembre (alta pigmentación)

Análisis de regresión no lineal



Constantes cinéticas, k



R^2

Mecanismo Orden 1

adecuado para describir estas transformaciones

Parámetros termodinámicos

Constantes
cinéticas

k_{ij}

$j = 60, 80, 100, 120^\circ\text{C}$

Temperaturas

$i = \text{N, D, E}$

Matrices oleosas

$\text{Ln}(k_{ij})$ vs $1/T_j$

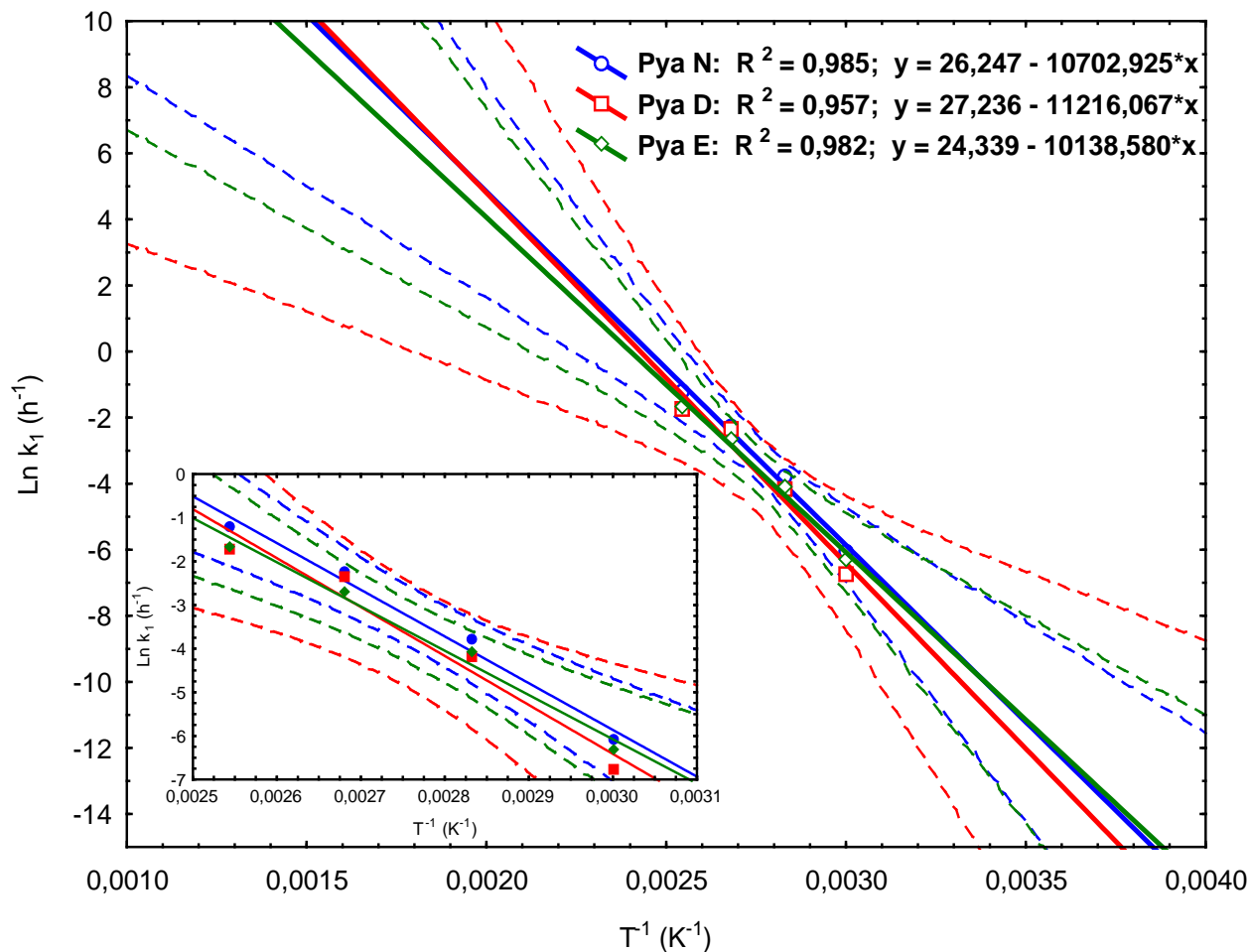
Ecuación de Arrhenius

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R.T}$$

Rectas de Arrhenius

Formación de PyFa en 3 medios de reacción.

Intervalos de confianza al 95%.



No existe punto de corte:

- rectas casi paralelas y próximas.
- todos los puntos dentro del mínimo intervalo de confianza.
- Son rectas isoentálpicas e isoentrópicas



El mecanismo **no se ve afectado**, en ninguna de sus etapas **por el tipo de matriz oleosa**

Los parámetros termodinámicos aquí caracterizados pueden ser extrapolados a cualquier tipo de matriz de VOO

Las ecuaciones matemáticas que nos describen la dependencia de las velocidades de reacción con la temperatura pueden ser extrapolados a cualquier tipo de AOV.

Que quiere esto decir:

Que hemos obtenido nuestro pretendido modelo para predecir la formación de PP con el tiempo y la temperatura de almacenamiento y que se puede aplicar a cualquier aceite de AOV.

Modelo de predicción

% Pirofeofitina "a"

$$\% \text{ Py a } (t) = \left[\frac{[\text{Py a}] (t)}{[\text{Py a}] (t) + [\text{F a}] (t)} \right] \times 100$$

$$[\text{Fa}] = [\text{Fa}]_0 e^{-k_{t_a} \cdot t}$$

$$[\text{Pirofa}] = \frac{k_1 [\text{Fa}]_0}{k_2 - k_{t_a}} \left[e^{-k_{t_a} \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t} \right]$$

$$k_{t_a}(T) = e^{(\alpha_{t_a} - \beta_{t_a}/T)}$$

$$k_1(T) = e^{(\alpha_1 - \beta_1/T)}$$

$$k_2(T) = e^{(\alpha_2 - \beta_2/T)}$$

Validación del Modelo

Predicciones del modelo
para el almacenamiento a temperatura ambiente

T media mensual

k_{ta}

k_1

k_2

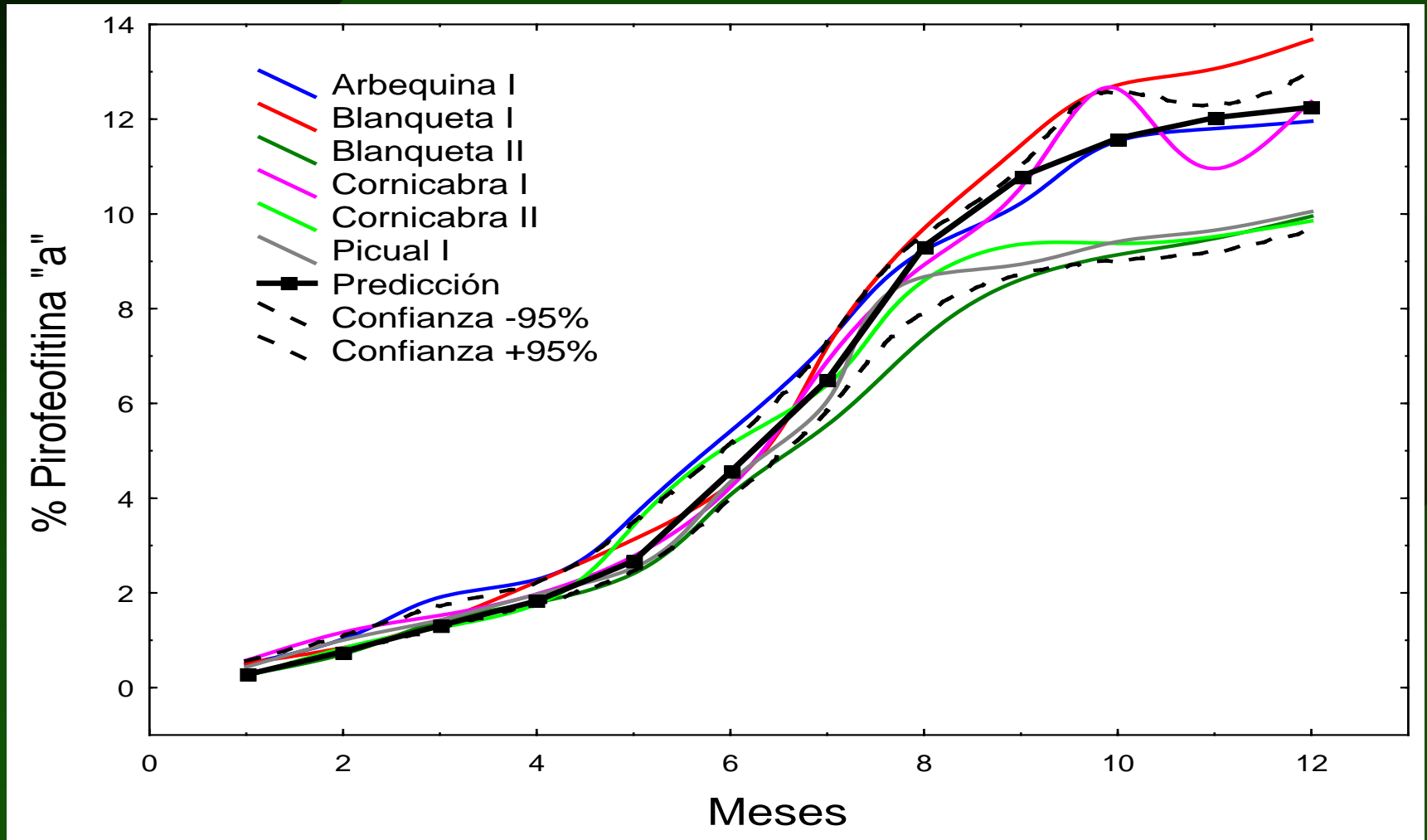
PPP

Febrero	11,4 °C
Marzo	15,6 °C
Abril	19,2 °C
Mayo	22,3 °C
Junio	26,2 °C
Julio	28,2 °C
Agosto	27,8 °C
Septiembre	24,1 °C
Octubre	20,4 °C
Noviembre	13,7 °C
Diciembre	12,2 °C
Enero	10,3 °C

$$k_{ta}(T) = e^{(\alpha_{ta} - \beta_{ta}/T)}$$
$$k_1(T) = e^{(\alpha_1 - \beta_1/T)}$$
$$k_2(T) = e^{(\alpha_2 - \beta_2/T)}$$

Aplicación del Modelo

Predicciones del modelo
para el almacenamiento a temperatura ambiente.

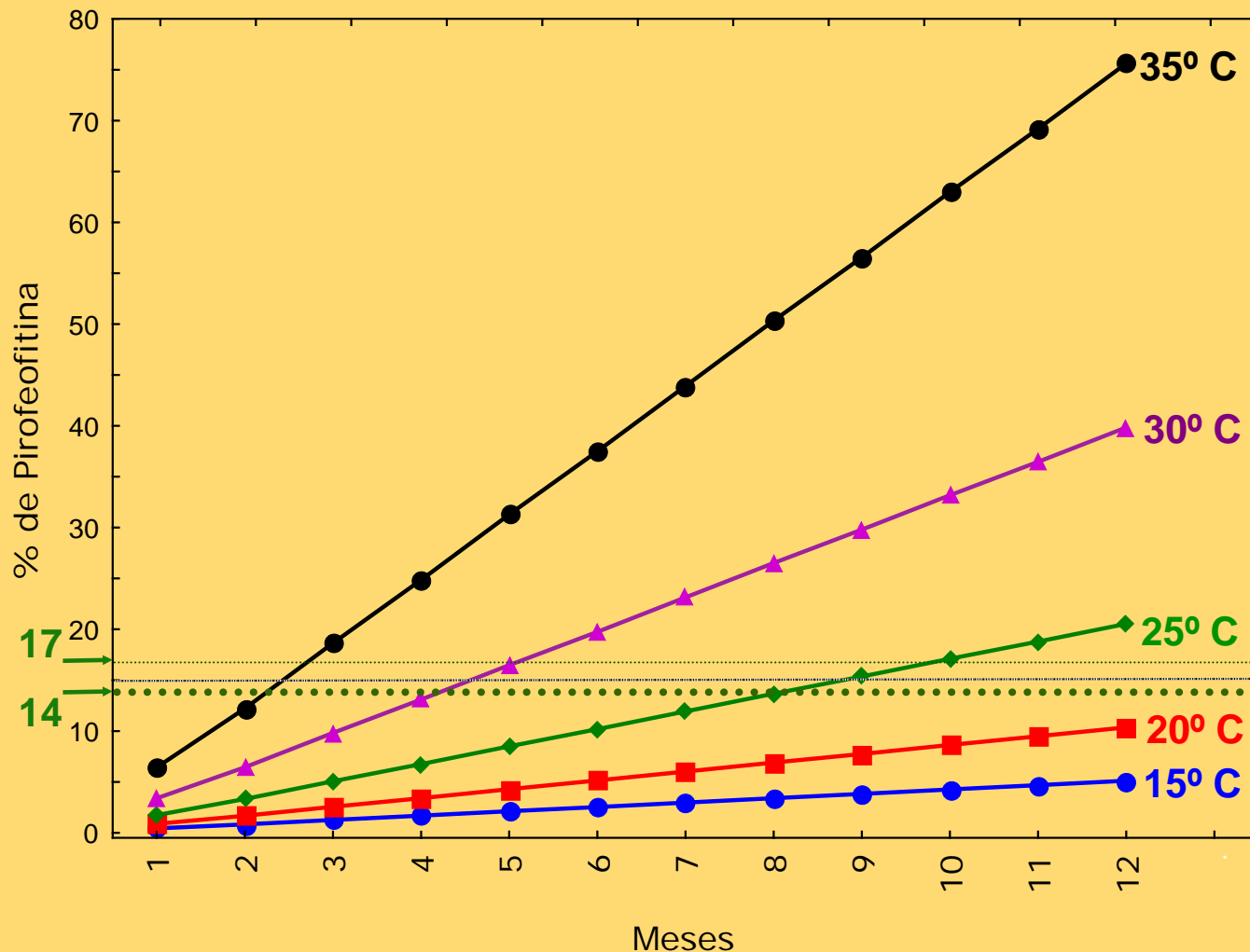


Ajuste mediante algoritmo spline. Los límites de confianza corresponden a los resultados experimentales.

Aparicio-Ruiz R, Roca M, Gandul-Rojas B 2012 "Mathematical model to predict formation of pypopheophytin a in virgin olive oil during the storage". *J. Agric. Food Chem.* 60:7040-7049.

Predicción de la evolución PPP en aceites almacenados durante un año a temperaturas controladas de 15°C a 35°C.

El nivel de corte según almacenamiento a temperatura ambiente:
12 meses: 14% (máximo en 12 meses) 17% (media en 18 meses)



Vida útil



Fecha de consumo preferente

PPP

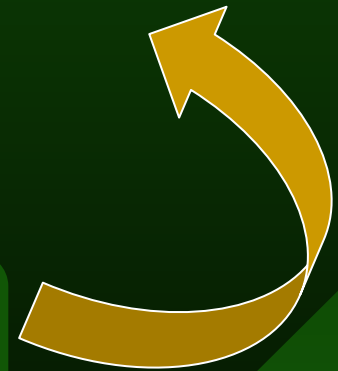


Calidad Sensorial

Marcador químico
de almacenamiento



Tiempo y condiciones de
almacenamiento



Fecha de consumo preferente



PPP

“edad del aceite”

Rastrear el tiempo y las condiciones del almacenamiento a granel

Modelo predicción

¿PPP ≤ 17?

Temperatura media
Lugar de destino

“fecha de consumo preferente”



Base científica para “best before” específico de cada partida de AOV

Aplicaciones del Modelo

A: Predicción de la pérdida de frescor del aceite de oliva virgen.

$f(T)$ de almacenamiento:

- fija controlada
- ambiente variable

B: Establecer su fecha de consumo preferente o vida útil.

- Marcado un límite para PPP

C: Detectar un almacenamiento en condiciones adversas.

PPP teórico \ll PPP experimental

- altas temperaturas y/o iluminación

PPP teórico \geq PPP experimental

- almacenamiento correcto

Un ejemplo:



Consumo preferente: Diciembre 16

PPP en Abril 16

Le restan 9 meses de almacenamiento

A una media anual de 12 % de incremento de PPP (1% mensual) = 9%

Si

¿PPP ≤ 17?

$$17 - 9 = 8\%$$

8% máximo que deberíamos exigir a este aceite en este momento

ANÁLISIS DE PPP

HPLC + DETECCIÓN Vis a 410nm

$$PPP = (\text{Área PFa} / (\text{Área PFa} + \text{Área Fa})) \times 100$$

Métodos:

	Peso de muestra	Volumen final	Factor dilución	Detección	REFERENCIA
Inyección directa	8g	100mL	12,5	Visible	Psomiadou and Tsimidou 1998
Inyección directa	0,2g	1mL	5*	Fluorescencia	Li et al 2015
SPE	1g	200 µL	0,20	Visible	Minguez et al. 1992
SPE	0,3g	200 µL	0,67	Visible	ISO 29841:2009 (Gertz et al. 2006)
SPE	1g	1mL	1	Visible	Fang et al. 2015 (FDA Taiwan)
SPE	0,5g	3mL	6*	Fluorescencia	Hornero et al. 2005
LPE	10-15g	1.5mL	0,1-0,15	Visible	Minguez et al. 1992

Almacenamiento Luz vs Oscuridad

Table 1. PPP content during the whole experiment under light exposure, darkness and by mathematical model prediction ($\lambda = 410$ nm).

Time (h)	M.M.P.	Darkness	Light
	PPP	PPP \pm SD	PPP \pm SD
0	5,65	5,65 \pm 0,34	5,65 \pm 0,34
120	6,20	5,85 \pm 0,26	5,27 \pm 0,21
240	6,61	6,14 \pm 0,28	7,27 \pm 0,55
14 d 336	6,94	6,67 \pm 0,13	9,11 \pm 0,24
456	7,34	7,37 \pm 0,25	13,46 \pm 0,41
552	7,63	7,40 \pm 0,23	18,09 \pm 0,73
28 d 672	7,93	7,63 \pm 0,09	26,86 \pm 1,34
768	8,12	7,13 \pm 0,08	27,66 \pm 1,39
888	8,44	7,71 \pm 0,16	15,73 \pm 6,38
984	8,69	7,91 \pm 0,08	24,43 \pm 2,05
1152	9,30	8,93 \pm 0,56	25,11 \pm 3,16
1272	9,58	8,43 \pm 0,59	30,19 \pm 3,12
1392	9,80	9,04 \pm 0,17	25,33 \pm 2,46

M.M.P., mathematical model prediction; SD, standard deviation; h, hour; PPP, pyropheophytin percentage.

Fotooxidación $F_a > P_{Fa}$

$$PPP = 100 \times P_{fa} / (P_{fa} + f_a)$$

PPP↑↑

Fotooxidación $Fa > Pfa$

$$PPP = 100 \times Pfa / (Pfa + fa)$$

PPP↑↑

Altos LOD

Resultados erróneos

Si Pfa no se detecta

$$100 \times Pfa / (Pfa + fa) = 0$$

~~PPP = 0~~

PPP = no detectado

✓ Después de un mínimo almacenamiento PP debe ser detectada

¿Qué es PPP?

$$\% Pfa = 100 \times Pfa / (Pfa + fa)$$

Porcentaje de pirofeofitina a

Marcador químico del tiempo y condiciones térmicas de almacenamiento del AOV en oscuridad

¿Por qué $PPP \leq 17$?

Valor medio después de 18 meses de almacenamiento a temperatura ambiente

¿AOVE = AOV?

¿Cómo hacer $PPP \leq 17$?

Controlando que la temperatura de almacenamiento no supere los 22 °C.

Evitando la luz

Agradecimientos:

- Dra. ML Gallardo-Guerrero
- Dra. M Roca López-Cepero
- Dr. R Aparicio-Ruiz
- Personal técnico: S. Alcañíz.
- Prof. MI Mínguez Mosquera

