



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Máster en Ingeniería Industrial

MÁSTER EN INGENIERÍA INDUSTRIAL

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Estudio experimental de la extracción de polifenoles de alperujo de aceituna por extracción asistida con microondas.

Autor: Dña. Cristina Giralda Herguedas

Tutor: D. Rafael. B Mato Chaín

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente

Valladolid, Septiembre, 2017

RESUMEN

El alperujo es el residuo mayoritario en la extracción de aceites de oliva por centrifugación de dos fases. Debido a su alto contenido en polifenoles y sus propiedades antioxidantes, está cobrando gran interés comercial. En este trabajo se estudia la influencia del uso de técnicas de extracción asistidas por microondas (MAE) como pretratamientos en extracciones convencionales sólido-líquido. En primer lugar, se ha optimizado la extracción convencional, analizando la influencia de las distintas variables de operación sobre el rendimiento de extracción. A continuación, se realizaron dos pretratamientos por microondas: pretratamiento a presión atmosférica sin disolvente (SFME) y pretratamiento presurizado con disolvente (MAE.P). El efecto producido por estos pretratamientos, se evaluó mediante el estudio del rendimiento de la extracción (mg de fenoles/g alperujo seco) y la riqueza del extracto (mg de fenoles/ g extracto seco) utilizando técnicas espectrofotométricas y HPLC. Los resultados obtenidos, reflejaron una mejora del rendimiento de extracción utilizando pretratamientos MAE.P, ya que aceleraron el proceso de extracción en comparación con las extracciones convencionales. La mayor concentración de hidroxitirosol se encontró en extracciones con pretratamientos MAE.P. La oleuropeína únicamente se identificó en extracciones con pretratamiento SFME. Los resultados obtenidos vislumbraron una extracción parcial inicial en todas las muestras analizadas, debido a este hecho y a la baja repetitividad de los experimentos, se llegó a la conclusión que el producto suministrado para el análisis se encontraba en mal estado.

Palabras Clave: *Alperujo, Extracción, Polifenol, MAE, Rendimiento.*

ABSTRACT

The alperujo is the majority residue in the extraction of olive oils by centrifugation of two phases. Due to its high content in polyphenols and its antioxidant properties, it is gaining great commercial interest. In this work the influence of the use of microwave assisted extraction techniques (MAE) as pretreatments in conventional solid-liquid extractions is studied. To do this, the conventional extraction has been optimized, analyzing the influence of the different operating variables on the extraction efficiency. Two microwave pretreatments were then performed: solvent-free atmospheric pretreatment (SFME) and solvent-pressurized pretreatment (MAE.P). The effect of these pretreatments was evaluated by studying the extraction yield (mg of phenols / g dry perp) and the richness of the extract (mg of phenols / g dry extract) using spectrophotometric techniques and HPLC liquid chromatography. The results obtained showed an improvement in extraction efficiency using MAE.P pretreatments as they accelerated the extraction process compared to conventional extractions. The highest concentration of hydroxytyrosol was found in extractions with pretreatments MAE.P. While oleuropein was only identified in extractions with pre-treatment SFME. The obtained results showed an initial partial extraction in all the analyzed samples, due to this fact and to the low repetitiveness of the experiments, it was concluded that the product supplied for the analysis was in poor condition.

Keywords: *Alperujo, Extraction, Polyphenols, MAE, Yield.*

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. <i>INTRODUCCIÓN</i>	3
1.2. <i>OBJETIVOS</i>	4
CAPÍTULO 2. ESTADO DEL ARTE	5
2.1 <i>EL SECTOR DEL ACEITE DE OLIVA EN ESPAÑA</i>	7
2.2 <i>MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA</i>	8
2.3 <i>ALPERUJO</i>	10
2.3.1 <i>Composición del Alperujo</i>	10
2.3.2 <i>Uso y aprovechamiento del alperujo</i>	11
2.3.3 <i>Compuestos fenólicos en el alperujo</i>	13
2.4 <i>MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES</i>	15
2.4.1 <i>Extracción convencional</i>	15
2.4.2 <i>Extracción asistida por microondas</i>	16
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 <i>MATERIA PRIMA</i>	25
3.2 <i>REACTIVOS Y SOLVENTES</i>	25
3.3 <i>DISPOSITIVOS Y MATERIALES UTILIZADOS</i>	26
3.4 <i>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS</i>	26
3.4.1 <i>Procedimiento de extracción convencional Sólido-Líquido</i>	27
3.4.2 <i>Pretratamiento térmico mediante microondas</i>	31
3.5 <i>DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD</i>	40
3.6 <i>DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO FENÓLICO</i>	40
3.7 <i>TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA, DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES</i>	41
3.8 <i>TÉCNICA CROMATOGRAFÍA, ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLIFENOLES POR HPLC44</i>	
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1 <i>CONTENIDO DE HUMEDAD DEL ALPERUJO</i>	49
4.2 <i>CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO SECO O EXTRACTO SECO</i>	50
4.3 <i>RENDIMIENTO Y RIQUEZA DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS</i>	51
4.3.1 <i>Rendimiento del proceso de extracción convencional Sólido-Líquido</i>	52
4.3.2 <i>Rendimiento del proceso de extracción con pretratamiento SFME</i>	53
4.3.3 <i>Rendimiento del proceso de extracción con pretratamiento MAE Presurizado</i>	54

<i>4.4 RIQUEZA DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....</i>	<i>56</i>
<i>4.5 MODELADO CINÉTICO DE LAS ECUACIONES</i>	<i>59</i>
<i>4.6 COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS</i>	<i>61</i>
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	65
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA.....	69
ABREVIATURAS.....	75
SÍMBOLOS.....	77
ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del alperujo.	11
Tabla 2: Reactivos y solventes utilizados.	26
Tabla 3. Estudio preliminar para la determinación de S:L óptima.	27
Tabla 4: Cuadro de concentraciones para la construcción de la curva de calibración para el ácido gálico.	42
Tabla 5. Cuadro utilizado en el cálculo de la curva de calibración del Hidroxitirosol.	45
Tabla 6: Cuadro realizado en el cálculo de la curva de calibración de la Oleuropeína.	46
Tabla 7. Códigos y características de las extracciones realizadas.	49
Tabla 8. Contenido de humedad del alperujo.	50
Tabla 9. Residuo seco (mg/L) promedio de las extracciones estudiadas.	50
Tabla 10. Rendimiento promedio de extracción convencional sólido-líquido (mg GAE/ g alperujo seco).	53
Tabla 11. Rendimiento promedio de extracción con pretratamiento SFME (mg GAE/ g alperujo seco).	54
Tabla 12. Rendimiento promedio de extracción con pretratamiento MAE.P (mg GAE/ g alperujo seco).	55
Tabla 13. Riqueza promedio de extracción con pretratamiento SFME (mg GAE/ g extracto seco).	58
Tabla 14. Riqueza promedio de extracción con pretratamiento MAE.P (mg GAE/ g extracto seco).	58
Tabla 15. Parámetros de extracción cinética en extracción convencional.	60
Tabla 16: Tiempos de retención y longitudes de onda para la cuantificación de Hidroxitirosol y Oleuropeína por HPLC.	61
Tabla 17: Concentraciones de Hidroxitirosol, en extracciones CONV, SFME, MAE.P en los distintos tiempos de extracción.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de la evolución de la superficie de Almazara en España.	7
Figura 2. Representación gráfica de la evolución de la producción de aceite de oliva en España	8
Figura 3. Sistema de extracción de Dos fases (18).....	9
Figura 4. Estructura química de Oleuropeína (1), Hidroxitirosol(2),(11).....	14
Figura 5. Esquema básico del recipiente utilizado en la extracción con pretratamiento MAE....	17
Figura 6. Método iterativo de resolución.....	20
Figura 7. Gráfico de temperaturas de ebullición para distintas presiones iniciales.	21
Figura 8. Gráfica de evolución del disolvente evaporado frente a la temperatura alcanzada para distintas presiones iniciales.....	21
Figura 9. Alperujo, estado original tras extracción de aceite (35).....	25
Figura 10. Estado del alperujo tras su entrega en recipiente, variedad Arbequina.....	25
Figura 11: Esquema de los distintos procesos de extracción realizados con alperujo.	26
Figura 12. Equipo utilizado en extracción convencional.	29
Figura 13: Ficha de experimento de extracción convencional.	30
Figura 14. Equipo utilizado en el pretratamiento MAE presurizado.....	34
Figura 15. Ficha genérica para la realización de extracción con pretratamiento SFME.....	36
Figura 16. Ficha genérica para la realización de extracción con pretratamiento MAE presurizado	37
Figura 17. Gráfica representativa de una extracción convencional.....	38
Figura 18. Gráfica representativa de un pretratamiento SFME.....	38
Figura 19. Gráfica representativa de un pretratamiento MAE.P.....	39

Figura 20. Curva de calibración de ácido gálico, para la determinación de polifenoles disueltos, obtenida a partir del programa UVProbe.	43
Figura 21. Curva de calibración de Hidroxitirosol.	45
Figura 22. Curva de calibración de Oleuropeína.	46
Figura 23. Gráfico de Residuo Seco (mg/L) en extracciones CONV, SFME y MAE.P en función de las muestras tomadas.	51
Figura 24. Tendencia experimental del rendimiento en extracciones CONV, SFME y MAE.P.	56
Figura 25. Extracción convencional de polifenoles totales (TPC), en términos de rendimiento y riqueza.	57
Figura 26. Datos experimentales de riqueza de extracciones con pretratamiento SFME y MAE.P.	59
Figura 27. Cromatograma de extractos obtenidos en extracciones CONV, SFME, MAE.P en muestras iniciales a 280 nm.	62

ÍNDICE DE ECUACIONES

- Ec.(1).....	17
- Ec.(2).....	17
- Ec.(3).....	18
- Ec.(4).....	18
- Ec.(5).....	18
- Ec.(6).....	18
- Ec.(7).....	19
- Ec.(8).....	19
- Ec.(9).....	19
- Ec.(10).....	40
- Ec.(11).....	41
- Ec.(12).....	43
- Ec.(13).....	45
- Ec.(14).....	46
- Ec.(15).....	59
- Ec.(16).....	60

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del olivar y la obtención del aceite de oliva, tienen una gran importancia en el sector agroalimentario en la Unión Europea. Existen aproximadamente 2 millones de empresas oliveras y en estos países se producen aproximadamente el 75% del aceite de oliva total, lo que conlleva un promedio de producción de 2,12 millones de toneladas. De esta producción el 96% se produce entre España (49%), Italia (12%) y Grecia (9%) (1).

En España la industria olivera se concentra principalmente en la Comunidad Andaluza, aunque se está iniciando la producción de aceite de oliva en Castilla y León. Hoy en día existen dos almazaras en Medina de Rioseco y Medina del Campo.

El alperujo es el residuo procedente de las almazaras que utilizan sistemas de extracción de aceite de oliva por centrifugación de dos fases. La composición de este residuo es variable, ya que depende del tipo de cultivo, condiciones atmosféricas, forma de procesamiento. La producción de este residuo se encuentra entre los 3.500.000 y 4.000.000 de toneladas/año (2). Su transporte y tratamiento resultan complicados debido a su alta generación y su elevada humedad, influyendo negativamente sobre el medio. Actualmente el alperujo tiene distintas utilidades, tales como: residuo industrial, material combustible, fertilizante o complemento en alimentación animal, pero debido a su composición su aprovechamiento es muy reducido (3),(4).

Únicamente el 2% de los compuestos fenólicos se transfieren al aceite durante la extracción, mientras que en el alperujo queda retenido el 98% restante (5). Esto explica que el alperujo sea un subproducto rico en compuestos fenólicos, tales como el hidroxitirosol, tirosol, y oleuropeína (6). Los compuestos fenólicos o polifenoles son ampliamente conocidos ya que poseen efectos beneficiosos para la salud, debido a sus propiedades antioxidantes y cardioprotectoras (3),(7),(8). El uso del alperujo como materia prima no solo contribuye a superar el problema ambiental que este residuo ocasiona (7), si no que también es una fuente barata de antioxidantes naturales con concentraciones de hasta 100 veces mayores que en el aceite de oliva extra (1). Por todo lo anterior, existe gran interés comercial en la venta de un posible extracto.

Los métodos de extracción de polifenoles a partir del alperujo descritos en la bibliografía corresponden generalmente a técnicas de extracción convencionales sólido-líquido cuyos inconvenientes generales son el largo tiempo de extracción y la baja riqueza del producto obtenido. Se describe también el uso de procesos hidrotermales y extracciones de alta presión- alta temperatura (HPHT) (3). Con estos métodos se aumentan las concentraciones de polifenoles en el extracto final, pero se produce la degradación de polifenoles con valiosas propiedades bioactivas (9). Debido a estos resultados, se incentivó la realización de estudios de métodos alternativos de extracción. Uno de ellos ha sido el uso de técnicas de extracción asistidas por microondas (MAE). Existen pocas referencias bibliográficas sobre este método, aunque algunos autores ponen de manifiesto el incremento de contenido fenólico del extracto y la reducción de los tiempos de operación. La radiación de microondas irrumpe en la estructura sólida de la materia prima, facilitando la fuga de compuestos activos,

mejorando el rendimiento de la extracción (8). Por ello, este trabajo propone la realización de un pretratamiento MAE corto, como complemento a la extracción convencional, en lugar de un proceso de extracción MAE completo. Un pretratamiento de bajo tiempo de residencia permite la irradiación del material de forma homogénea en un microondas de tamaño razonable. Se produce una intensificación de energía, provocando el aumento brusco de la temperatura durante el pretratamiento, pero debido a su corta duración se evita la degradación de los compuestos fenólicos acelerando su extracción (9). Tras esto, se continúa la extracción mediante la técnica convencional.

A la hora de medir la eficiencia del método se consideran dos parámetros, el rendimiento y la riqueza del extracto final. La mejora de la extracción tiene que ser en cantidad de producto (rendimiento), y en calidad (riqueza del extracto final). Cuando se realizan las extracciones, se extraen otras sustancias (azúcares y fibras) que deprecian el valor del producto final. Se entiende como riqueza fenólica la concentración de compuestos activos en el extracto final. Se expresa en base seca ya que el extracto se comercializa en ese estado para asegurar su estabilidad (10). Es un parámetro crucial para la comercialización de un producto, ya que a mayor riqueza mayor valor tendrá en el mercado.

En resumen, la valorización de estos residuos, provocarían beneficios al sector agroalimentario, aumentando la rentabilidad del cultivo del olivar, almazaras y orujeras. Esta posible comercialización de compuestos bioactivos del alperujo posibilitará la creación de nuevos mercados de productos químicos y biológicos (11).

1.2. OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Máster forma parte del estudio llevado a cabo por el grupo de investigación Alta Presión perteneciente al Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid, España.

El propósito general de este trabajo es el análisis de la influencia de las técnicas de extracción asistida por microondas (MAE) utilizadas como pretratamientos en extracciones convencionales sólido-líquido.

Para lograr este objetivo general, se perseguirán los siguientes objetivos específicos.

- Optimizar la extracción convencional sólido-líquido, analizando sobre el rendimiento de extracción la influencia de las principales variables de operación: proporción producto/disolvente, concentración del disolvente y tiempo de tratamiento.
- Analizar los rendimientos de extracción y la riqueza de los extractos obtenidos para cada una de las extracciones realizadas.
- Caracterizar la composición fenólica de los extractos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución.

CAPÍTULO 2.

ESTADO DEL ARTE

CAPÍTULO 2. ESTADO DEL ARTE

2.1 EL SECTOR DEL ACEITE DE OLIVA EN ESPAÑA

La industria del aceite de oliva es muy importante en el Mediterráneo. España es el país con mayor superficie destinada al cultivo del olivar y, por lo tanto, a la producción del aceite de oliva. Se encuentra seguido de Italia, Grecia, Turquía, Siria y Túnez, aunque otros países como Australia, Argentina y Sudáfrica son actualmente productores emergentes debido al cultivo intensivo del olivo (12).

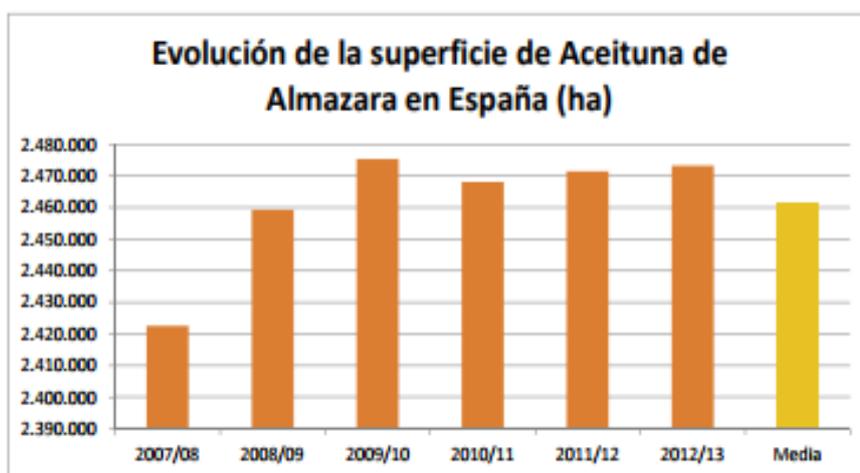


Figura 1. Representación gráfica de la evolución de la superficie de Almazara en España.

Según las estadísticas agrarias realizadas en 2016, España tiene una superficie dedicada al cultivo de aproximadamente 2.623.156 hectáreas, de las cuales 2.470.811 hectáreas están destinadas a la aceituna de almazaras (2). En la Figura 1, se observa la evolución que ha seguido la superficie del olivar destinado a almazara en España desde la campaña 2007/2008 hasta la campaña 2012/2013.

En la península, es el segundo cultivo en extensión, después de los cereales, y está presente en 34 de las 50 provincias españolas, destacando la Comunidad Andaluza donde se concentra el 62% de la superficie de olivar y un 82% de la producción española. A modo de ejemplo, Jaén produce el 50% del total nacional y el 20% del total mundial (13).

En la Figura 2, se muestra la producción de aceite en las campañas anteriormente mencionadas, batiéndose un récord en la campaña 2011/2012 con 1,6 millones de toneladas, mientras que en la campaña de 2012/2013 hubo un decremento en la producción por el carácter vecero del cultivo del olivar. Aunque cabe destacar que en el último decenio la producción media incrementó en un 23% respecto al anterior periodo, que fue de 986.654 t (14). Otro dato a destacar es la producción obtenida en la cosecha de la campaña 2013/2014 y del 2014/2015 que fue de 3.27 millones y 2,39 millones de toneladas respectivamente, lo que supuso un aumento en la producción respecto a años anteriores.

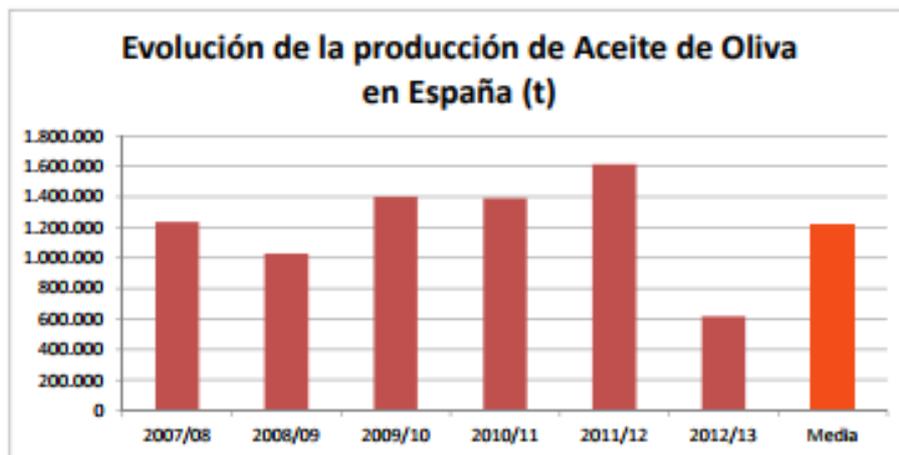


Figura 2. Representación gráfica de la evolución de la producción de aceite de oliva en España

En cuanto a la producción de aceite de oliva, representa aproximadamente el 60% de la producción de la Unión Europea y el 45% de la mundial. Por todo ello, queda constancia que el sector del aceite en España es uno de los principales promotores socioeconómicos (15).

2.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA

Con el paso de los años, gracias a los avances tecnológicos, los sistemas de extracción de aceite de oliva han ido mejorándose progresivamente. Inicialmente se utilizó el sistema de prensado clásico, cuyo funcionamiento estaba basado en la utilización de un molino de rulos y una decantación para la separación de las distintas fases (11).

En los años 70, el prensado clásico fue sustituido por el sistema de extracción centrífugo de tres fases. En este sistema se incorpora la masa en el decantador centrífugo horizontal junto con agua proveniente del exterior para fluidificar la pasta y hacerla girar a alta velocidad. Se produce la separación por diferencia de densidad de distintas fases: una líquida oleosa denominada aceite, otra líquida acuosa denominada alpechín, y por último una fase sólida denominada orujo con una humedad aproximada del 45 %, formado por la pulpa, hueso y piel de la aceituna (16). El alpechín es una mezcla de aguas de vegetación de la aceituna junto con agua incorporado en el proceso. Los componentes del sistema de tres fases son el molino triturador, batidora, decantador centrífugo horizontal y separadoras verticales de aceite y alpechín (17).

La centrifugación de tres fases presentó muchas ventajas en comparación con el prensado clásico, pero generó a su vez, grandes inconvenientes ya que se producía un aumento de consumo de agua y energía junto con la producción de aguas contaminantes (alpechín) en torno a 1,25 litros de alpechín por cada kg de aceituna (12).

A principios de los años 90 se implantó un nuevo sistema de extracción de aceite de oliva mediante centrífugas de dos fases que redujo en un 75% la proporción de residuos. Gracias a este sistema no se precisa la incorporación de agua del exterior para fluidificar la pasta de aceituna, por lo que se disminuye considerablemente el volumen de alpechín

generado (0,25 L de efluentes líquidos / kg de aceitunas procesadas frente a 1,24 L de efluentes líquidos / kg de aceitunas procesadas en la centrifugación de tres fases (18). Tras la centrifugación se produce una fase oleosa y un residuo sólido de alto porcentaje de humedad conocido como alperujo. Por otro lado, se aumenta la calidad del aceite de oliva extraído ya que el contenido de polifenoles que permanece en él aumenta un 1% en relación con la centrifugación de tres fases (19).

En la siguiente figura se muestra un esquema de los principales procesos realizados en una extracción de aceite de oliva de dos fases, sus componentes principales son: el molino triturador, batidora, decantador centrífugo horizontal y separadores verticales de aceite (17). Gracias a este sistema de centrifugación se han solucionado las dificultades que presentaban las almazaras frente a los vertidos de alpechín, ya que causaban grandes problemas ambientales debido a la alta demanda química de oxígeno y sus efectos antimicrobianos y fitotóxicos.

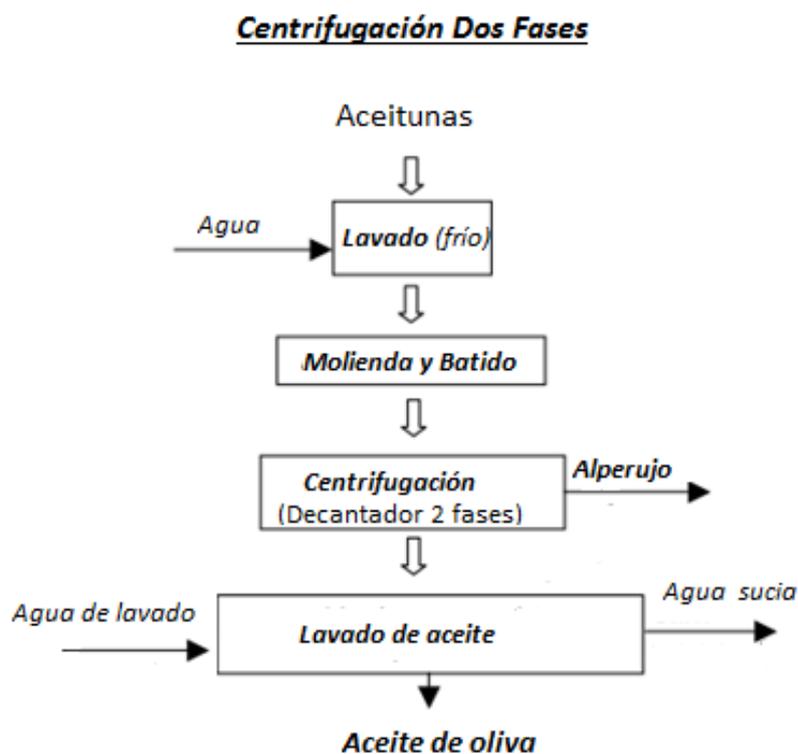


Figura 3. Sistema de extracción de Dos fases (18)

El sistema de extracción de dos fases presenta las siguientes ventajas e inconvenientes en relación con el sistema de extracción de tres fases (12):

- Ventajas:
 - Construcción de centrífuga más sencilla, menor coste.
 - No se producen problemas técnicos asociados a la mezcla de agua y aceite debido a la precipitación de compuestos que se depositan formando una capa en la centrífuga.

- Mayor rendimiento en relación a la cantidad de materia prima introducida, menor consumo de energía, debido a que se debe procesar un menor volumen de materia (no se añade agua).
 - Menores costes operacionales, requiere menor cantidad de agua.
 - Mejor calidad del aceite producido, mejor estabilidad frente a la oxidación y características organolépticas.
- Inconvenientes:
 - El residuo producido, alperujo dobla la cantidad de residuo sólido generado en el sistema de tres fases.
 - El contenido de humedad del alperujo 55- 70%, dificulta su transporte y su almacenamiento.
 - La composición del alperujo, con gran carga orgánica, rico en grasas y compuestos fenólicos, cuyos tratamientos son más caros que los realizados a los residuos del sistema de tres fases.

Los rendimientos industriales de separación de fases, tanto para el orujo en el proceso de tres fases como del alperujo en dos fases no son del 100%, extrayéndose después mediante procesos químicos que originan un aceite que no es óptimo para el consumo humano (18). Estos rendimientos dependerán de infinidad de factores, desde la naturaleza de la materia prima, proceso maquinaria utilizada, etc.

Hoy en día, en España en torno al 90 % de los procesos productivos de aceite de oliva se realizan a partir del sistema de extracción de dos fases, obteniéndose aproximadamente 80 toneladas de alperujo por cada 100 toneladas de aceitunas extraídas (20), (21), (22). La producción de residuo alperujo en Andalucía obtenidos en la última década se encuentra entre 3.500.000 y 4.000.000 toneladas/año (14). Se trata de un dato alarmante ya que el alperujo presenta una consistencia con alta humedad por lo tanto se requieren una infraestructura completamente distinta a la utilizada para el tratamiento de los residuos generados por la extracción de tres fases.

2.3 ALPERUJO

2.3.1 Composición del Alperujo

El alperujo, también denominado alpeorujo, es un residuo procedente de las almazaras que utilizan sistemas de extracción de aceite con decantador de dos fases. Tiene una composición variable, dependiendo del tipo de oliva, tipo de suelo de cultivo, tiempo de cosecha y la forma de procesamiento (23).

Se trata de un residuo semi-sólido formado por pequeños fragmentos de hueso de aceituna triturada (15% p/p), pulpa de aceituna (20% p/p) y agua (65% p/p), con un pH ligeramente ácido con fuerte olor (24). La materia orgánica presente en el alperujo se compone de lignina, hemicelulosa y celulosa, y constituyen el 39%, 30% y 23% del total

de materia orgánica. Otros componentes orgánicos del alperujo son las grasas (11%), proteínas (7%), carbohidratos solubles (manitol, sacarosa y fructosa, 12%, en base seca) y compuestos fenólicos (1.4%, en base seca)(25).

En la siguiente tabla se muestra la composición química del alperujo, obtenido de sistemas de extracción de dos fases (26).

Parámetro	Rango
Humedad (% peso fresco)	55,6 – 74,5
pH	4,89 – 6,45
Conductividad (dS/m)	0,88 – 4,76
Relación C/N	28,2 – 72,9
Materia orgánica (%)	60.3 – 98.5
Nitrógeno total (g/kg)	7,0 – 18,4
Minerales totales (g/kg)	10.16 – 48.03
Lignina (% en base seca)	19.8 – 47.5
Hemicelulosa (% en base seca)	15.3 – 38.7
Celulosa (% en base seca)	17.3 – 33.7
Lípidos (% en base seca)	3.76 – 18
Proteínas (% en base seca)	6.7 – 7.2
Carbohidratos solubles (g/kg en base seca)	12,9 – 164,0
Compuestos fenólicos (g/kg en base seca)	6,2 – 23,9

Tabla 1. Composición química del alperujo (16).

Debido a su elevada humedad, su bajo contenido en aceite y la necesidad de secado, no resulta interesante realizar extracciones secundarias (27). Su alto contenido en lignina dificulta su degradación bacteriana. El carácter tóxico del alperujo, reside en su concentración de compuestos fenólicos (11), (28) y como se ha comentado anteriormente, y debido a que se trata de un residuo de textura pastosa obtenido en grandes volúmenes y alto potencial contaminante, su eliminación genera grandes problemas medioambientales y económicos su eliminación (7).

2.3.2 Uso y aprovechamiento del alperujo

Desde hace más de cinco décadas se han realizado estudios para encontrar una solución para eliminar los residuos de la industria del aceite de oliva (29). La doble naturaleza de este tipo de residuos (recurso que puede ser reciclado y vertido contaminante) provoca diferencias entre grupos de investigación a la hora de tratarlo para su revalorización.

A continuación, se describen algunos de los usos de este residuo, convirtiéndolo en un subproducto del proceso de extracción de aceite de oliva.

– Compostaje de alperujo:

El alperujo se puede utilizar como abono de suelos agrícolas, ya que se trata de un proceso sencillo y barato para transformar los residuos orgánicos en fertilizantes (30). Sin embargo, este residuo como quedó demostrado en gran cantidad de estudios (11), no puede aplicar directamente sobre el suelo por los efectos fitotóxicos derivados de los compuestos fenólicos que afectan a la estabilidad estructural del suelo. Este efecto se soluciona realizando al alperujo un pretratamiento biológico de fermentación en presencia de oxígeno gracias a microorganismos, con el que se obtiene alperujo con ausencia de efectos fitotóxicos debido a la degradación y/o polimerización de compuestos fenólicos (31).

– Energía térmica y eléctrica

El alperujo seco y extractado se utiliza como combustible en las propias plantas extractoras para la generación de calor o electricidad. A la gran mayoría del alperujo se le da este uso, ya que presenta un elevado poder calorífico (400kcal/kg). Sin embargo, la mayor parte de la energía obtenida por la cogeneración se utiliza para el secado del alperujo, por lo que el rendimiento del proceso es bajo. Se está exportando este residuo a Reino Unido, donde se utiliza para alimentar las calderas de los sistemas de calefacción (32).

– Fermentación en estado sólido

Se propuso utilizar el alperujo como alimento para el ganado, pero debido a su alta proporción de fibras de baja digestibilidad y a su baja concentración de proteínas, se recomendó utilizar suplementos proteínicos. Gracias al proceso de fermentación sólida se consiguió aumentar el valor nutricional de los residuos vegetales (12).

– Extracción de compuestos valiosos

El alperujo posee compuestos de interés para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

Se trata de un residuo muy rico en compuestos fenólicos ya que únicamente el 2% de los fenoles de la oliva son transferidos al aceite (7). Se puede utilizar en la producción de pectina, compuesto de gran interés en la industria alimentaria porque es utilizado como agente estabilizante y emulsionante.

– Otras aplicaciones

Una de las posibles aplicaciones del alperujo, es la producción de bioplásticos. Este material se puede sintetizar mediante microorganismos bacterianos a partir de cualquier residuo orgánico. Otra aplicación poco común fue la utilización como material adsorbente de metales pesados para depurar efluentes contaminados (12).

2.3.3 Compuestos fenólicos en el alperujo.

Los compuestos fenólicos son compuestos bioactivos, que forman parte de un grupo de sustancias ampliamente extendidas en el reino vegetal. Se encuentran presentes en frutas y verduras, caracterizadas por tener un grupo fenol. Se han identificado más de ocho mil polifenoles distintos, pero los predominantes son los flavonoides, los ácidos y alcoholes fenólicos, los estilbenos y los lignanos.

Son los responsables del color brillante de muchas frutas y verduras, y actúan sobre los radicales libres que se produce en presencia de luz UV, contacto con el O₂, con metales previniendo su deterioro (3).

En la actualidad existen un gran número de artículos científicos que demuestran las actividades antioxidantes, cardioprotectoras, antimicrobianas, antihipertensivas, anticancerígenas, y neuroprotectoras, que podrían utilizarse en las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentaria (33).

En el aceite de oliva, los polifenoles contribuyen al sabor, al aroma y al color, y los más abundantes son el tirosol y el hidroxitirosol, seguidos del ácido caféico y la oleuropeína.

El alperujo contiene el 98 % de los compuestos fenólicos totales de la oliva, (6) debido a la moderada solubilidad de estos compuestos en el agua.

La composición de compuestos fenólicos del alperujo es muy variable, ya que depende de muchos factores como la variedad de oliva, el estado de maduración, las condiciones climáticas, y el proceso de extracción (34). Como norma general, posee alta concentración en compuestos fenólicos tales como: oleuropeína, hidroxitirosol y tirosol.

La oleuropeína es un compuesto fenólico específico de la oliva, que le ayuda a ser resistente a los daños de los insectos y otros factores (35). Durante la maduración de la oliva, el batido y formación del alperujo, se produce la hidrólisis de la oleuropeína, dando lugar a sus componentes: oleuropeína aglicón, hidroxitirosol y ácido elenólico (36). Se le atribuye ser responsable del sabor amargo del aceite. Algunos de los efectos asociados de este compuesto fenólico son los siguientes: prevención cardiovascular, ya que reduce la presión arterial, inhibe la oxidación del colesterol, antioxidante, antiinflamatorio, anti-cáncer (11), ya que inhibe el crecimiento de líneas celulares tumorales, antimicrobiano, ya que daña la pared bacteriana, protector de la piel, antienvjecimiento, etc.

El hidroxitirosol es un alcohol fenólico, procede de la hidrólisis de la oleuropeína, que se genera a medida que el fruto va madurando, durante la molienda y batido de las aceitunas en el proceso de elaboración del aceite de oliva (37). Se ha demostrado que este compuesto fenólico presenta una actividad antioxidante superior a la de otros antioxidantes conocidos como la vitamina E (38). Presenta propiedades farmacológicas y una elevada actividad antioxidante, esta última debida tanto a un efecto quelante de iones de metales, como a un efecto secuestrador de radicales libres. El hidroxitirosol, al igual que la oleuropeína, presenta propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas (agentes infecciosos del tracto intestinal y respiratorio (11). Otros estudios demostraron sus efectos beneficiosos contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (39).

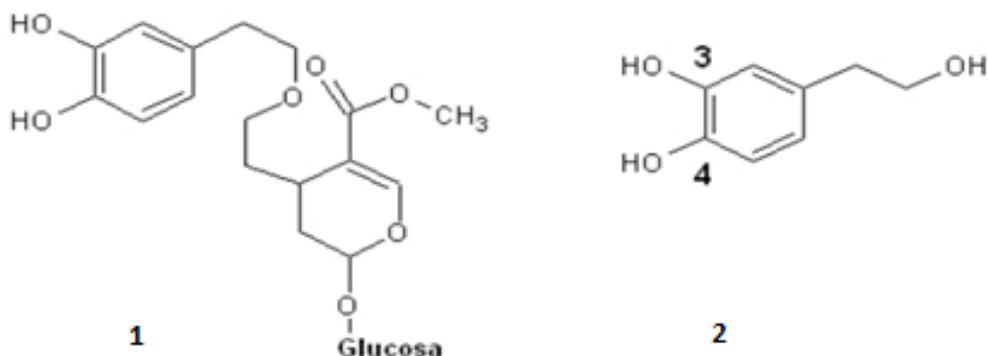


Figura 4. Estructura química de Oleuropeína (1), Hidroxitiroso(2),(11)

Gracias a las características del hidroxitiroso, su extracto puede comercializarse de distintas formas. En la actualidad, algunas de ellas son:

– Nutracéutico

Las sustancias nutracéuticas son aquellas sustancias presentes en alimentos o partes del alimento que proporcionan un beneficio para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades. Por lo tanto, son productos que incluyen compuestos bioactivos procedentes de los alimentos pero que se comercializan en forma farmacéutica y contienen mayores concentraciones de las que contendría el alimento del que proceden.

– Cosmética

Estudios científicos comprobaron que este compuesto fenólico actúa sobre los radicales libres, uno de los focos del envejecimiento, pudiéndose comercializar como compuesto natural con agentes antioxidantes en cremas y geles (40).

– Alimentos funcionales con hidroxitiroso (40).

Son alimentos que además de su valor nutricional, poseen propiedades beneficiosas para la salud humana. Esta molécula es soluble en solventes acuosos debido a su carácter polar, por lo que, podría introducirse en el consumo diario a partir de leche, zumos, salsas, etc.

2.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

La extracción de compuestos fenólicos es bastante compleja ya que depende de muchos factores, tales como la naturaleza de la matriz que los contiene y la estructura química del compuesto a extraer, por lo que para cada materia prima se debe optimizar un proceso de extracción específico, debido a que no existe un método común de extracción.

2.4.1 Extracción convencional

Para lograr optimizar los métodos de extracción, y por lo tanto maximizar su rendimiento, hay que tener en cuenta diversos factores. Algunos de ellos son: el tipo de disolvente, el pH del medio de extracción, la temperatura de extracción, al número de pasos de extracción, el volumen del disolvente, y el tamaño y forma de la partícula (7).

Los métodos de extracción se pueden agrupar en dos grandes grupos: extracción con disolventes orgánicos y extracción en fase sólida (SPE, solid phase extraction).

La extracción con un disolvente orgánico o mezclas acuosas de disolventes alcohólicos es el método más común de extracción. Está fundamentado en la transferencia de masa desde la muestra al disolvente de extracción según la solubilidad del compuesto de interés en el disolvente. Entre las distintas técnicas de extracción usadas destacan técnicas convencionales como el soxhlet o la agitación magnética (41). La extracción en fase sólida se basa en el uso de cartuchos con un relleno específico que tienen afinidad por los compuestos fenólicos de interés.

Sin embargo, los métodos de extracción convencional presentan una serie de inconvenientes como son el consumo elevado de disolventes, largos tiempos de extracción, bajo rendimiento debido a la degradación de los compuestos de interés, y baja selectividad del proceso. Por ello, en la actualidad se están realizando estudios de nuevas técnicas de extracción, como la extracción asistida por microondas, ultrasonidos, o extracción con fluidos supercríticos.

2.4.1.1 Extracción convencional sólido-líquido de los compuestos fenólicos en el alperujo

El alperujo se trata del residuo más importante en la extracción de aceite por centrifugación de dos fases. Debido a su gran volumen genera un gran impacto ambiental. Este residuo posee gran cantidad de compuestos fenólicos (42).

La extracción más habitual de los compuestos fenólicos del alperujo se realiza por agitación magnética, utilizando mezclas de disolventes etanol/agua y metanol/agua en distintas relaciones S:L, dependiendo del tipo de compuesto de interés (8).

Según algunos autores (1), la optimización de este tipo de extracción se consigue con una extracción con metanol a 70 °C durante 12 horas, lo que atestigua la larga duración de este método.

En un estudio realizado por (18), se realizaron extracciones convencionales sólido-líquido, utilizando como disolvente agua mediante una relación sólido-líquido (1:20, p/v). Obtuvieron un porcentaje de fenoles solubles en agua de 1.5% del total de la materia orgánica. Paini et al. (3), estudiaron la extracción de compuestos fenólicos del alperujo a partir de un reactor agitado bajo condiciones de alta presión y temperatura. Utilizaron etanol/agua, (50:50, v/v) como disolvente. Otros autores incluyeron modificaciones a la extracción convencional, realizando extracciones a alta presión. Según estudios realizados por Aliakbarian et al.(7), utilizando este método de extracción, registraron el mayor rendimiento a 180 °C en un tiempo de extracción de 90 minutos, ya que superando este tiempo se produjo la degradación de los polifenoles.

Sin embargo, los métodos de extracción convencional presentan una serie de inconvenientes como son el consumo elevado de disolventes, y largos tiempos de extracción, bajo rendimiento debido a la degradación de los compuestos de interés y baja selectividad del proceso. Por ello, en la actualidad se están realizando estudios de nuevas técnicas de extracción, como la extracción asistida por microondas, ultrasonidos, o extracción con fluidos supercríticos.

2.4.2 Extracción asistida por microondas

Entre estas nuevas técnicas se encuentra la extracción asistida por microondas (MAE, Microwave Assisted Extraction). Las microondas son ondas electromagnéticas de frecuencias entre 300 MHz y 300 GHz. Son radiaciones ionizantes que se caracterizan por producir cambios en la vibración de las moléculas por migración de los iones y rotación de los dipolos sin modificar su estructura molecular.

La extracción MAE, utiliza la energía del microondas para calentar disolventes en contacto con muestras sólidas y para dividir compuestos de interés de la muestra en el disolvente. Esta técnica presenta grandes ventajas en comparativa con la extracción convencional ya que puede reducir el tiempo de extracción y el consumo de disolventes (8).

Se utiliza para una amplia variedad de productos vegetales, ya que produce un calentamiento tanto del disolvente como de la matriz vegetal de forma eficiente y homogénea debido a la rotación del dipolo del disolvente (43). La extracción MAE, utiliza la energía del microondas para calentar disolventes en contacto con muestras sólidas y para recuperar compuestos de interés de la muestra en el disolvente. Esta técnica presenta grandes ventajas en comparación con la extracción convencional ya que puede reducir el tiempo de extracción y el consumo de disolventes (8). La eficacia de este proceso dependerá del disolvente utilizado en la extracción, la muestra utilizada, los compuestos a extraer y sus constantes dieléctricas.

La extracción MAE, también se pueden utilizar como pretratamiento adicional a una extracción convencional, para suscitar un calentamiento selectivo y rápido del agua de

la muestra, lo que produce un aumento de presión dentro de las células facilitando una transferencia rápida de los compuestos de interés al disolvente de extracción. Si se utilizan recipientes cerrados, se posibilita un calentamiento por encima del punto de ebullición del disolvente y se acelera la transferencia de masa de los compuestos de interés (41). Si a dicho recipiente cerrado se le aplica vacío, la temperatura de ebullición del disolvente se aumentará sin poner en compromiso el volumen de disolvente evaporado. Bajo estas líneas se muestra el estudio teórico que avala la afirmación anterior.

Se representa a modo esquemático el recipiente donde se ejecutará el pretratamiento MAE presurizado (Figura 5).

En donde:

- V_t : volumen total del recipiente.
- V_a° : volumen ocupado por la masa de alperujo.
- V_d° : volumen de disolvente etanol/agua al 50%.
- V_n° : volumen de nitrógeno inicial.
- V_{de} : volumen de disolvente evaporado en el proceso.

Se conocen los siguientes datos de partida:

- Presión de carga del nitrógeno (P°).
- Volumen inicial del disolvente (V_n°).
- Volumen de la carga de alperujo (V_a°).
- Presión final del pretratamiento (P).

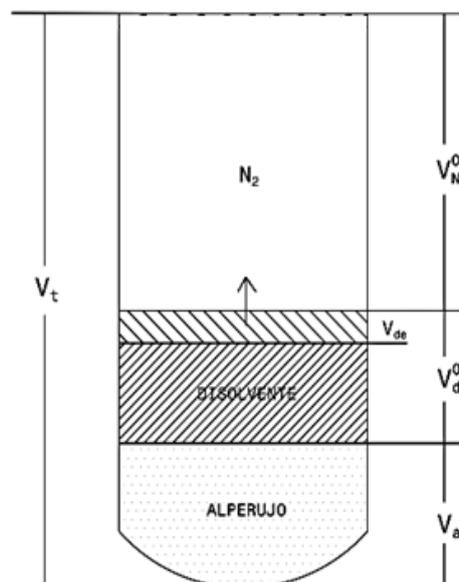


Figura 5. Esquema básico del recipiente utilizado en la extracción con pretratamiento MAE.

Se realiza el balance al volumen del recipiente (V_t), el cual se va a mantener constante durante toda la experimentación. En el instante inicial:

$$V_t = V_a^\circ + V_d^\circ + V_n^\circ \quad \text{Ec.(1)}$$

, donde V_a° es el volumen inicial de la carga de alperujo, V_d° es el volumen del disolvente inicial y V_n° es el volumen inicial ocupado por el gas nitrógeno.

Teniendo en cuenta la ley de los gases ideales ($pV=nRT$):

$$V_t = V_a^\circ + V_d^\circ + \frac{n_n^\circ * R * T^\circ}{P^\circ} \quad \text{Ec.(2)}$$

, dónde n_n° son los moles iniciales del nitrógeno, T° es la temperatura inicial (293K) , R es la constante universal de los gases y P° es la presión inicial de carga del nitrógeno.

Despejando de la ecuación [0.2] los moles de nitrógeno cargados inicialmente:

$$n_n^\circ = \frac{P^\circ * (V_t - V_a^\circ - V_s^\circ)}{R * T^\circ} \quad \text{Ec.(3)}$$

Una vez realizado el pretratamiento MAE presurizado, la irradiación de calor provoca la evaporación de ciertos moles de disolvente. Por lo tanto, si se realiza un balance al volumen del recipiente en el momento final, considerando que el volumen ocupado por el alperujo en el recipiente (V_a) permanece constante:

$$V_t = V_a + (V_d^\circ - V_{de}) + (n_n^\circ + n_{de}) * \frac{R * T}{P} \quad \text{Ec.(4)}$$

, dónde V_{de} es el volumen de disolvente líquido evaporado tras el pretratamiento por microondas, n_{de} el número de moles correspondientes a ese disolvente evaporado, y por último P, T corresponden a la presión y temperatura alcanzada al final del pretratamiento.

El volumen ocupado por el disolvente evaporado (V_{de}), pasa a ser ocupado por el gas:

$$V_{de} = \frac{(n_{de} * Mw_d)}{\rho_d} \quad \text{Ec.(5)}$$

, dónde Mw_d es la masa molecular del disolvente y ρ_d su densidad.

Como se evapora muy poco disolvente, se admite comportamiento de compuesto puro, ya que su composición apenas varía en la fase líquida. Su presión de vapor (P_d), será una función de la temperatura:

$$P_d = f(T) \quad \text{Ec.(6)}$$

La ecuación correspondiente se obtiene a partir de los valores de P_d a diferentes temperaturas, obtenidas con el software “Aspen Plus” para mezclas etanol/agua, (50:50, v/v). En el Anexo 1, se encuentran los valores de la presión de vapor de disoluciones etanol/agua, (50:50, v/v) calculados, y su correlación con la ecuación de Antoine.

$$\ln P_d = 4,592422 - \frac{394,957}{0,971451 + T} \quad \text{Ec.(7)}$$

, dónde $P_d = [\text{bar}]$, y $T = [^\circ \text{C}]$.

Ley de Dalton:

$$P_d = Y_d * P \quad \text{Ec.(8)}$$

, dónde Y_d es la fracción molar del disolvente en el vapor.

La fracción molar de disolvente en el vapor:

$$Y_d = \frac{n_{de}}{n_n^\circ + n_{de}} \quad \text{Ec.(9)}$$

La resolución del sistema no es explícita, por lo que se debe resolver por medio de un proceso iterativo. Primeramente, se fija una presión final (P), y a continuación se supone un valor para la temperatura final del pretratamiento (T). A partir de la ecuación [7] se calcula la presión de vapor del disolvente (P_d). Seguidamente se obtiene la fracción molar (Y_d) del mismo con ayuda de la ley de Dalton Ec. [8]. Utilizando la ecuación [9] se obtiene el número de moles de disolvente evaporado (n_{de}) en el pretratamiento. El volumen ocupado por el disolvente (V_{de}) se determina por medio de la ecuación [5] y finalmente con la ayuda de la ecuación [4] se calcula el volumen total del recipiente. Este valor se compara con el volumen real del recipiente para determinar cuándo el cálculo iterativo se da por finalizado.

Si volumen calculado no coincide con el real, se vuelven a realizar los cálculos anteriores suponiendo otra temperatura final de pretratamiento (Figura 6). Estos cálculos se encuentran recogidos en el Anexo 1.

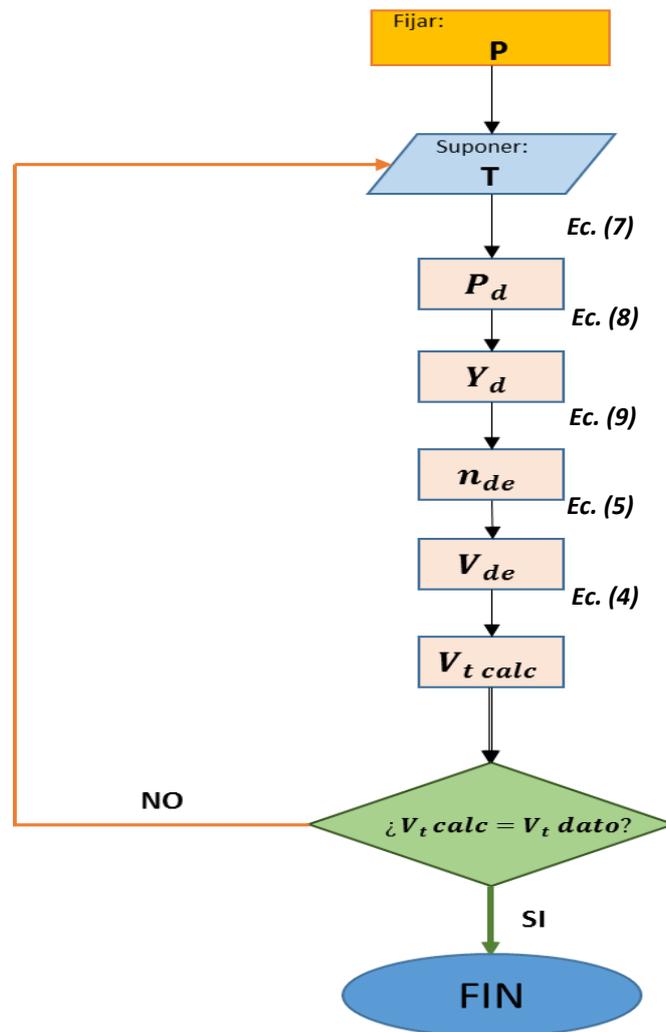


Figura 6. Método iterativo de resolución.

En la Figura 7 se muestran las distintas temperaturas de ebullición del disolvente en función de la presión final alcanzada. Si el proceso se iniciase con una presión de una atmósfera, tras el pretratamiento realizado (3,5 atm) la temperatura de ebullición del disolvente sería 103°C aproximadamente. Si antes de realizar el pretratamiento, se le aplicase un vacío al recipiente para alcanzar una presión inicial de 0.2 atmosferas, para la misma presión final de 3,5 atmósferas se elevaría la temperatura de ebullición del disolvente a 114 °C.

El aumento de la temperatura de ebullición del disolvente con la presión, sumado al hecho de que el volumen total de disolvente evaporado durante el pretratamiento para distintas presiones iniciales es muy similar (Figura 8), hacen interesante el uso del vacío en el pretratamiento por microondas MAE, ya que permite alcanzar temperaturas más elevadas para un mismo valor de la presión final.

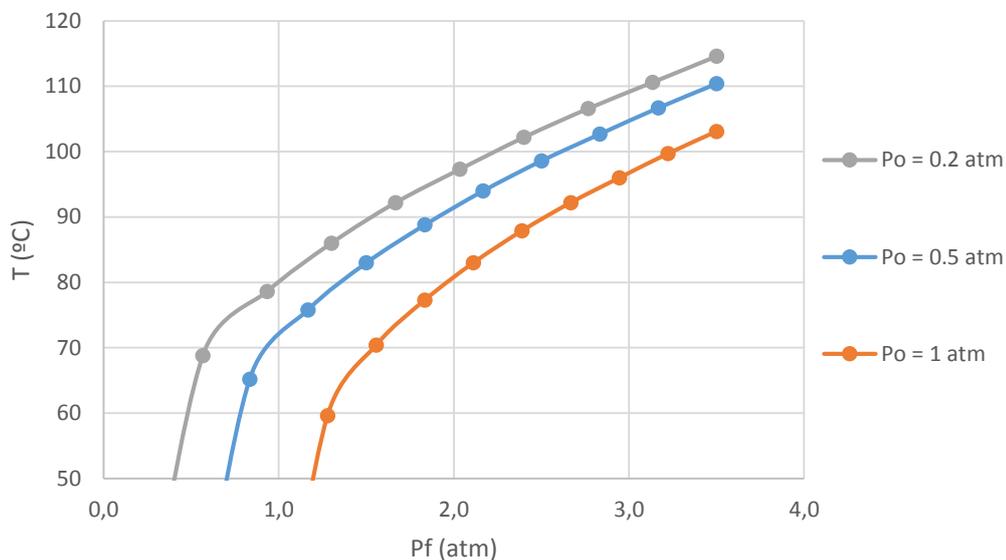


Figura 7. Gráfico de temperaturas de ebullición para distintas presiones iniciales.

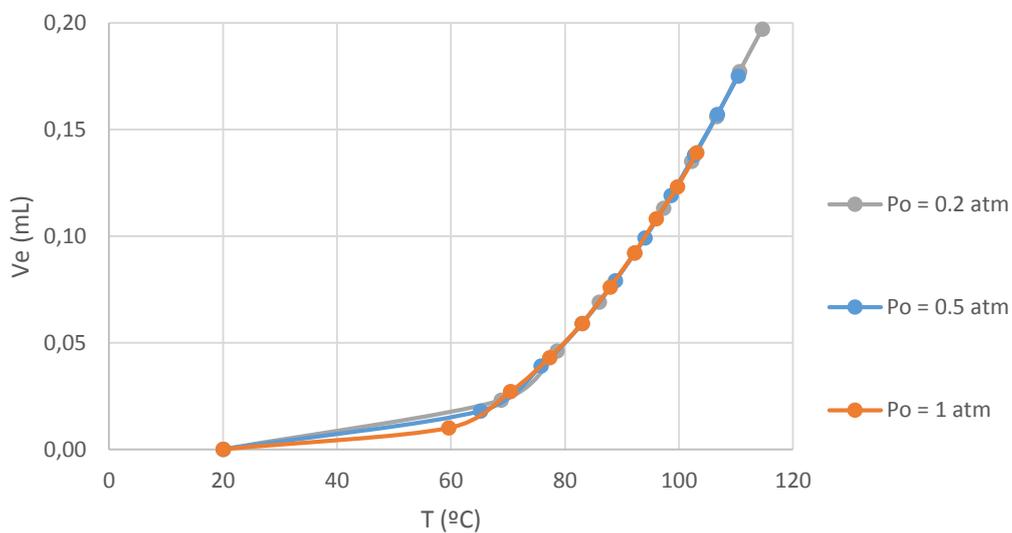


Figura 8. Gráfica de evolución del disolvente evaporado frente a la temperatura alcanzada para distintas presiones iniciales.

2.4.2.1 Extracción MAE de los compuestos fenólicos del alperujo.

Hoy en día no existen muchos estudios documentados, sobre este tipo de extracción en el alperujo, ya que se trata de una técnica relativamente novedosa. Diversos estudios muestran que el hidroxitirosol es uno de los principales fenoles detectados en el alperujo (44).

El estudio realizado por Perez-Serradilla et al. (8), consistió en mezclar 2 g de muestra con 6 ml de metanol/agua (80:20, v/v) y 9 ml de n-hexano. Tras una lixiviación (14 minutos de radiación microondas a 200 W), el extracto se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min para minimizar el espesor de la interfase y separar las partículas en suspensión. Los resultados demostraron el aumento del rendimiento respecto a una extracción convencional.

Estudios realizados por Kong Wei-bao et al. (45), demostraron que el contenido de polifenoles extraídos por medio de técnicas MAE era superior al 18-38% en comparación con métodos de extracción convencional con disolvente. Para la realización de este estudio utilizaron como disolvente etanol/agua (60:40, v/v), una proporción de sólido a líquido 1:20 (p/v), potencia MW 300 W, y un tiempo de extracción de 3 minutos.

CAPÍTULO 3.

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIA PRIMA

La materia prima utilizada en el presente trabajo ha sido alperujo Figura 9, proveniente de la almazara OLIDUERO pertenecientes a la bodega “EMINA” del Grupo Matarromera (Medina del Campo - Valladolid, España). La variedad de olivas utilizada por el Grupo Matarromera es, en su totalidad, Arbequina.

El alperujo se suministró congelado a unos -18°C en un único recipiente el cual contenía aproximadamente 900 gramos. Para agilizar la realización de los experimentos posteriores, fue necesario repartir el alperujo en distintos recipientes individuales, cada uno de ellos con una cantidad aproximada de 30 gramos, por lo que se descongeló parcialmente el alperujo para su repartición. Una vez distribuido se introdujeron todos los recipientes inmediatamente en un congelador a 18°C con gas inerte nitrógeno para evitar de esta manera cualquier tipo de degradación. En la Figura 10 se muestra el estado en el que se encontraba la materia prima original de partida.



Figura 10. Alperujo, estado original tras extracción de aceite (35).



Figura 9. Estado del alperujo tras su entrega en recipiente, variedad Arbequina.

3.2 REACTIVOS Y SOLVENTES

En la siguiente tabla se resumen los principales reactivos y solventes utilizados en el presente trabajo, así como su pureza y procedencia.

Reactivo/ Solvente	Pureza / Concentración	Suministrador
Solución de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3)	20% p/v, saturado	Panreac
Etanol Absoluto	--	Panreac
Reactivo Folin - Ciocalteu	2M	Panreac
Ácido Gálico	> 97,5 %	Sigma
Dimetilsulfóxido (DMSO)	>99,9 %	Sigma

Agua Milli-Q	--	--
Agua Destilada Tipo II	--	--

Tabla 2: Reactivos y solventes utilizados.

3.3 DISPOSITIVOS Y MATERIALES UTILIZADOS

A continuación, se enumeran los equipos utilizados más significativos:

- Microondas CEM Discover SP.
- Espectrofotómetro modelo UV-2550, SHIMADZU.
- Cromatografía líquida de alta resolución: Sistema ALLIANCE HPLC, módulos de separación Waters e2695, Detector Waters 2414, columna Base Sílica Mediterránea, Teknokroma.
- Balanza analítica digital con precisión 4 decimales (0.0001g): Adventurer pro, OHAUS.
- Placa calefactora y agitadora magnética: RTC Clasic, IKA.
- Agitador vórtex: SA3, Stuart.
- Estufa.
- Centrífuga.

3.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Se han realizado distintas extracciones de compuestos fenólicos. En el siguiente esquema se resumen las extracciones realizadas. Se han comparado extracciones convencionales, con extracciones convencionales sometidas a distintos pretratamientos térmicos por medio del uso de microondas.

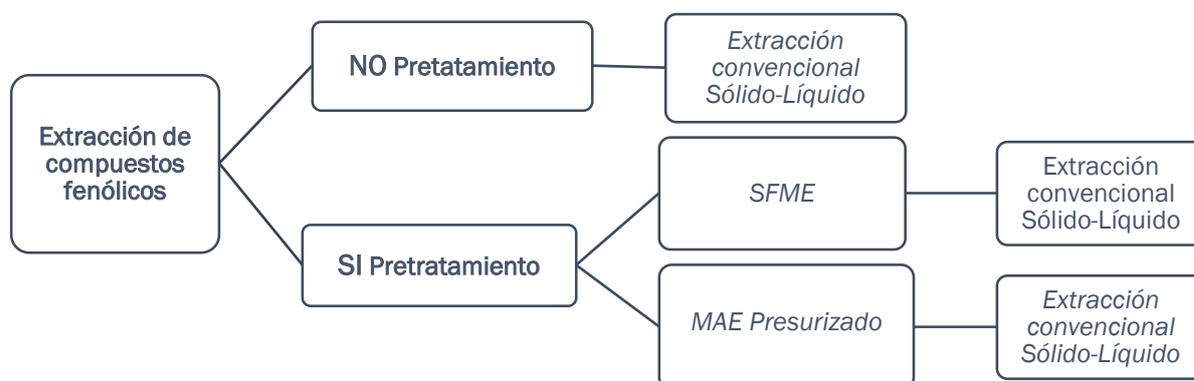


Figura 11: Esquema de los distintos procesos de extracción realizados con alperujo.

3.4.1 Procedimiento de extracción convencional Sólido-Líquido

En la extracción de compuestos fenólicos convencional Sólido-Líquido a 70 °C se ha utilizado como disolvente etanol/agua, (50:50, v/v), utilizando agua tipo II para su constitución. Se estudiaron las siguientes relaciones sólido:líquido (S:L): 1:1, 1:2, 1:5, 1:20, 3:100, 1:100 (p/v).

En la siguiente tabla se muestra un resumen del estudio preliminar que se llevó a cabo para determinar la relación sólido:líquido (S:L) óptima a utilizar en el proceso de extracción convencional. Se compararon los distintos rendimientos (η) obtenidos en un tiempo de extracción de 180 minutos.

Relación S:L (p/v)	η en t=180 min (mg GAE/g alperujo seco)		
	Promedio	\pm	SD
1:1	14,55	\pm	0,66
1:2	20,37	\pm	2,73
1:5	30,26	\pm	1,65
1:20	29,33	\pm	1,73
3:100	28,82	\pm	0,74

Tabla 3. Estudio preliminar para la determinación de S:L óptima.

Se observó que según se incrementó la cantidad de disolvente aumentó el rendimiento, pero a partir de una relación S:L 1:5 no se produjo un aumento significativo del rendimiento de extracción a tiempo 180 minutos. Por lo que se eligió para el estudio una relación S:L 1:5, ya que si se utilizan otras relaciones S:L tales como 1:20 o 3:100 se obtienen rendimientos similares, pero aumenta el coste de extracción debido a la necesidad de mayores cantidades de disolvente.

El procedimiento experimental se basó en el método descrito por Álvarez et al. (10), con modificaciones tanto en la temperatura de extracción como en el tiempo de extracción para adecuarlo al alperujo.

Con el paso del tiempo se optimizó el proceso experimental inicial, hasta llegar al proceso experimental de extracción convencional (CONV) que se detalla a continuación:

1. Primeramente, se preparó un baño a 70 °C con agitación a 700 rpm por medio de una placa calefactora y agitadora magnética, un vaso de precipitados, y una barra de agitación magnética.
2. Se añadieron 85 ml de disolvente, a un matraz redondo (denominado matraz 1), junto con una barra de agitación magnética.

3. Antes de proceder al cierre del matraz por medio de un tapón (Figura 12), se arrastró el aire que pudiese contener el matraz utilizando un flujo continuo de un gas inerte (nitrógeno), durante unos segundos para minimizar la posible oxidación de los polifenoles.
4. A continuación, se introdujo en el baño preparado con anterioridad el conjunto soporte + matraz 1 + aro estabilizador (Figura 12) para que de esta forma el disolvente, antes de iniciar el proceso de extracción, alcanzase la temperatura del baño y aumentase la velocidad del proceso experimental.
5. Seguidamente, se pesaron 17 g de alperujo y se introdujeron en otro matraz redondo (matraz 2). Por el mismo motivo de antes, previamente al cierre del matraz se arrastró el aire de su interior por medio de gas inerte (nitrógeno).
6. Cuando el disolvente alcanzó la temperatura del baño (70 °C), se vertió en el matraz 2, que contiene la materia prima. Es en este punto donde se inicia la extracción fenólica, por lo que se tomó la primera muestra en este momento, nada más añadir el disolvente y tras una agitación de unos segundos, con el fin de determinar la cantidad de polifenoles inicialmente libres.
7. Inmediatamente después de tomar la primera muestra del experimento, se eliminó el aire que hubiese podido entrar en el matraz durante esta primera toma de muestra por medio de nitrógeno y se cerró el matraz.
8. El matraz se introdujo nuevamente en el baño para continuar con la extracción. El proceso completo tuvo una duración aproximada de 180 minutos, y durante este tiempo se extrajeron un total de seis muestras a tiempos parciales: 10, 20, 40, 90 y 180 minutos respectivamente.
9. Cada uno de los extractos fenólicos se filtró con un filtro de jeringuilla de celulosa regenerada de 0.45 μm y se almacenó en un tubo de eppendorf. El residuo sólido recogido en el filtro se descartó.
10. Las muestras obtenidas se enfriaron rápidamente en un baño de hielos y se introdujeron para su posterior análisis en el congelador.

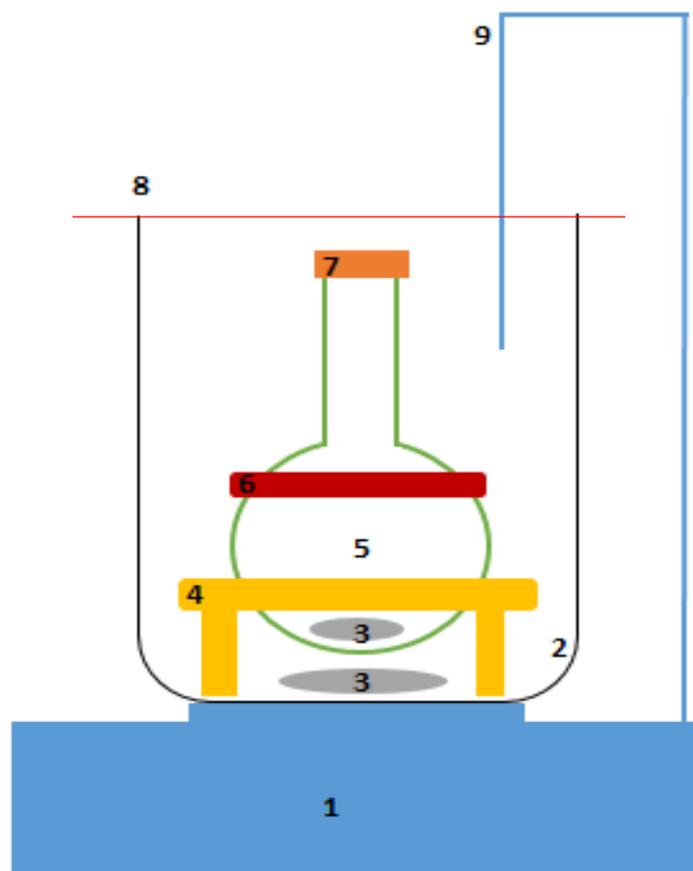


Figura 12. Equipo utilizado en extracción convencional.

(1: placa calefactora y agitadora magnética, 2: Recipiente para baño, 3: Barra de agitación magnética, 4: soporte, 5: matraz, 6: aro estabilizador, 7: tapón, 8: cubierta de papel de aluminio, 9: sensor de temperatura).

En la siguiente página se muestra el ejemplo de la ficha de procedimiento de un experimento genérico, utilizada en el desarrollo de una extracción convencional sólido-líquido (Figura 13). Como se puede observar se realiza el pesaje de los viales, ya que este dato va a ser necesario a la hora de realizar el cálculo del residuo o extracto seco.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

- PROCEDIMIENTO Investigador: _____ [*]
- Extracción convencional** Fecha: _____ [*]
- Experimento número: _____ [*]
- Disolvente: Etanol+ agua ____ % [Etanol: Panreac, Agua tipo 2] [*]
- Alperujo: Matarromera Febrero 2017 [*]
- Temperatura EXTRACCIÓN: _____ °C [*]
- Relación solido/líquido = _____ g/ml [*]
1. Encender placa calefactora colocando un vaso con agua a la temperatura programada, introducir imán de agitación (____ rpm) y cubrir dicho vaso con papel aluminio para mantener constante la temperatura. [*]
 2. Se introduce en un vial recubierto con papel de aluminio, el volumen de disolvente que se va a utilizar para la relación solido/líquido de estudio: [*]
 - Volumen de disolvente = _____ ml []
 - Barrer con N₂. []
 3. Se introducirá en el vial un imán de agitación y se cerrará con su tapón correspondiente, una vez realizado esto, se introduce en el baño para que alcance la temperatura programada. []
 4. Mientras se va calentando el vaso y el vial con el disolvente anterior se procede a medir la masa de alperujo que se va a tratar, de acuerdo con la relación sólido líquido programada, y la masa de disolvente establecida en el punto 1:
 - masa aproximada de alperujo = _____ g [calculado] []
 - Masa recipiente = _____ g []
 - Masa recipiente + alperujo = _____ g []
 5. Cuando ya ha alcanzado la temperatura se procede al cambio de viales introduciendo en el vial de la masa de alperujo el disolvente calentado anteriormente y todo ello se introduce en el baño, para que de esta forma no se desperdicie la masa del mismo.
 - Masa recipiente después de echar el disolvente = _____ g []
 - Barrer con N₂. []
 - Masa de disolvente = _____ g [calculado] []
 6. Se toman muestras a diferentes tiempos de extracción, la primera nada más agitar el alperujo en el disolvente (t=0), según el siguiente procedimiento: [*]
 - Masa eppendorf vacío []
 - Tomar la hora
 - Toma de muestra con jeringa + filtro en tubo eppendorf.
 - Barrer con N₂.
 - Pesar eppendorf con muestra.
 - Se enfría la muestra y se introduce en el congelador.

[*] Preparar antes de empezar el experimento.

No.	t (aprox.) min [*]	Hora	Eppendorf Vacío (g) [*]	Eppendorf +muestra (g) para un volumen de :__ ml)[*]
_.00	0	00:00:00		
_.01	10			
_.02	20			
_.03	40			
_.04	90			
_.05	180			

Figura 13: Ficha de experimento de extracción convencional.

3.4.2 Pretratamiento térmico mediante microondas

A continuación, se describen los procedimientos seguidos en los pretratamientos realizados al alperujo. Ambos siguieron el método propuesto por Álvarez. et al. (10) con ligeras modificaciones. Como se observa en el esquema anterior (Figura 11), se realizaron dos pretratamientos con microondas al alperujo antes de la etapa extracción. Se utilizó una unidad de microondas CEM Discover.

Cada uno de estos pretratamientos fueron:

- **SFME (Solvent Free Microwave Extraction):** en este pretratamiento se irradió al alperujo libre de disolvente con una potencia de 300 W, a presión atmosférica hasta alcanzar una temperatura de 100°C.
- **MAE.P (Microwave Assisted Extraction-Presurizado):** se irradió a una mezcla de alperujo-disolvente con relación S:L igual a 1:5 con una potencia de 300 W en un recipiente presurizado, hasta alcanzar una presión de 2.5barg, a fin de alcanzar una temperatura superior a la normal de ebullición del disolvente.

3.4.2.1 Extracción con pretratamiento SFME

En este caso, la muestra de alperujo se sometió a un pretratamiento con microondas a presión atmosférica (recipiente abierto). Para ello se irradió la materia prima tal y como había sido suministrada, sin adicionar ningún disolvente durante el pretratamiento. Tras este pretratamiento se incorporó el disolvente y se realizó una extracción convencional similar a la anteriormente descrita.

El procedimiento de extracción con pretratamiento SFME llevado a cabo fue el siguiente:

1. Inicialmente, se preparó un baño a 70 °C con agitación propia a 700 rpm por medio de una placa calefactora agitadora magnética, un vaso de precipitados, y una barra de agitación magnética.
2. Tras la introducción de 85 ml de disolvente etanol/agua (50:50, v/v) en un matraz (destinado a la extracción convencional sólido-líquido), se eliminó el aire de su interior por medio de gas nitrógeno y posteriormente se cerró con un tapón. Este se introdujo en el baño para que el disolvente alcanzase la temperatura del baño con la ayuda de los elementos descritos en la Figura 12 de la extracción convencional.
3. Se pesaron 17 gramos de alperujo y se incorporaron al matraz destinado al pretratamiento junto con una barra de agitación magnética.

4. Una vez homogeneizada la muestra de alperujo, por medio de un agitador magnético a 1200 rpm durante aproximadamente dos minutos, se introdujo el matraz con la materia prima en el microondas.
5. El pretratamiento en el microondas se realizó utilizando las siguientes variables de operación: potencia constante de 300 W, agitación en el propio microondas con la ayuda de la barra de agitación introducida con anterioridad en el matraz y refrigeración mediante flujo externo de aire a 2 barg.
6. El pretratamiento con microondas SFME finalizó cuando se alcanzaron aproximadamente 100 °C. El control de temperatura fue posible ya que se registró continuamente con un termómetro de fibra óptica (FoTEMP 4, OPTPcon GmbH).
7. Inmediatamente después del pretratamiento se enfrió el matraz por medio de un baño de hielos en un recipiente con agitación propia, hasta alcanzar una temperatura aproximadamente similar a la del baño de la extracción convencional sólido-líquido.
8. Tras el enfriamiento, se incorporó el disolvente calentado en el baño, en el matraz utilizado en el pretratamiento. Es en este punto del experimento donde se inició la extracción convencional sólido-líquido y por tanto se tomó la primera muestra.
9. Siguiendo el procedimiento de extracción convencional sólido-líquido anteriormente descrito, una vez tomada la primera muestra, a partir de gas nitrógeno se eliminó el aire que hubiese podido entrar tras la primera extracción y se cerró el matraz para continuar con la extracción dentro del baño.
10. Al igual que en la extracción convencional sólido-líquido, el procedimiento tuvo una duración de 180 minutos, Al igual que en el experimento convencional, se tomaron cinco muestras a mayores a los 10, 20, 40, 90 y 180 minutos tras el inicio de la extracción convencional.
11. Cada uno de los extractos obtenidos, se filtró con un filtro de jeringuilla de celulosa regenerada de 0.45 μm , se almacenaron en distintos eppendorfs y el residuo sólido recogido en el papel de filtro se descartó.
12. Por último, se enfriaron las muestras mediante un baño de hielos y se introdujeron inmediatamente después en el congelador para su análisis posterior.

3.4.2.2 Extracción con pretratamiento MAE presurizado

Se practicó una extracción con pretratamiento a partir de una presurización asistida con microondas. En la realización del pretratamiento se utilizó un recipiente denominado Q-tube, el cual puede soportar incrementos de presión de hasta 4,1 bar. De esta manera se aumenta la duración del pretratamiento, ya que se alcanzan temperaturas superiores a la temperatura normal de ebullición de la mezcla etanol/agua (50:50, v/v) (80,2°C), manteniendo disolvente en una fase líquida bajo presión. La explicación teórica de este hecho se detalló en el capítulo Estado del Arte.

Existe una clara diferencia entre este pretratamiento (MAE.P) y el anteriormente descrito SFME ya que, aparte de la diferencia de temperatura alcanzada, en este caso se introduce en el microondas el disolvente junto al alperujo, en lugar de introducirse únicamente la materia prima.

Se mantuvo la relación S:L de 1:5, pero se redujo a 10 gramos la materia prima introducida debido a las dimensiones del Q-Tube, ya que este recipiente no entraba en su totalidad en el microondas y si se utilizaba la cantidad de masa de alperujo del resto de extracciones no se aseguraba su pretratamiento en el Q-tube.

El procedimiento experimental de extracción que siguió en la extracción con pretratamiento MAE presurizado fue el siguiente:

1. Se preparó un baño a 70 °C con agitación propia a 700 rpm por medio de una placa calefactora agitadora magnética, un vaso de precipitados, y una barra de agitación magnética.
2. Se arrastró el aire que pudiese contener el Q-tube destinado al pretratamiento, y el matraz destinado a la extracción convencional sólido-líquido por medio de nitrógeno y después se ha procedido a su cierre.
3. Se introdujo con la ayuda de los elementos descritos en la Figura 14 de la extracción convencional sólido-líquido, el matraz en el baño para que alcanzase su temperatura.
4. Se prepararon 50 ml de disolvente etanol/agua (50:50, v/v), pesado 10 gramos de alperujo e introducido en el Q-tube con la ayuda de varios lavados de disolvente. Seguidamente, se incorporó la barra de agitación y eliminado el aire que pudiese contener por medio de gas nitrógeno. Una vez realizado lo descrito anteriormente, se cerró el Q -Tube.
5. Tras una homogeneización de la muestra a 1200 rpm, durante aproximadamente dos minutos, se creó un vacío ($P = -0.8$ barg) en el Q-tube a partir de una bomba conectada al conjunto que se muestra en la siguiente figura, y tras esto se cerró la válvula.

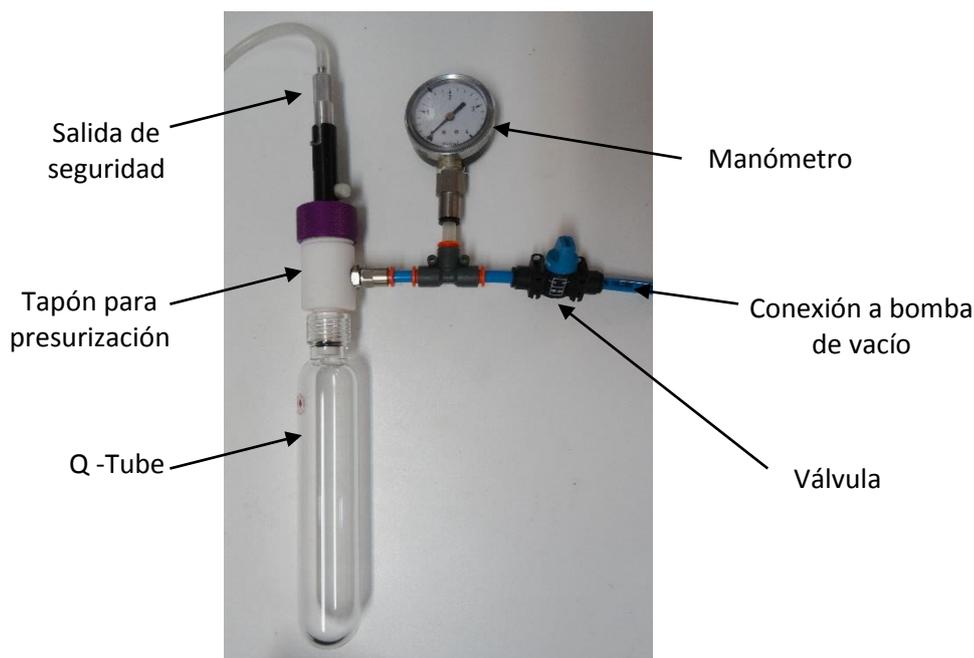


Figura 14. Equipo utilizado en el pretratamiento MAE presurizado.

6. Se introdujo el Q-Tube en el microondas cuyas variables de operación fueron: potencia constante de 300 W, refrigeración apagada, y agitación activada.
7. El pretratamiento con microondas finalizó cuando se alcanzó en el Q-tube una presión $P = 2,5$ barg. En este momento se midió la temperatura por medio del uso de un termómetro infrarrojos.
8. Tras el pretratamiento MAE presurizado se enfrió el Q- Tube por medio de un baño de hielos en un recipiente con agitación propia, hasta una presión de $P = - 0,4$ barg.
9. Enfriado el Q - Tube, se despresurizó, y se introdujo la muestra que contenía en el matraz anteriormente calentado a la temperatura del baño. Es en este punto donde se tomó la primera muestra, y se inició la extracción convencional sólido-líquido.
10. Tras la toma de la primera muestra se introdujo en el baño el matraz cerrado después de la eliminación del aire que pudiese contener el matraz, por medio de gas nitrógeno para continuar con la extracción. Al igual que en los experimentos anteriores, se tomaron cinco muestras a los 10, 20, 40, 90 y 180 minutos tras el inicio de la extracción convencional.

11. Las muestras resultantes, se filtraron con un filtro de jeringuilla de celulosa regenerada de 0.45 μm , se almacenaron en distintos eppendorfs y el residuo sólido recogido en el papel de filtro fue desechado.
12. Se enfriaron las muestras en un recipiente con agua con hielos y seguidamente se introdujeron en el congelador para su análisis posterior.

En las siguientes páginas se muestran los ejemplos de fichas de experimentos genéricos utilizadas en el desarrollo de una extracción de compuestos fenólicos, con pretratamiento asistido con microondas a presión atmosférica SFME y MAE presurizado respectivamente. Simultáneamente a la toma de muestras en los distintos tiempos, se realizó el pesaje de los eppendorfs para posteriormente calcular el extracto seco.

Referencia: Exp. X	
Fecha:xx/xx/xxxx	
Experimento a Pretratamiento MAE a Presión atmosférica	
0.	Arrastrar el aire con nitrógeno en matraz para extracción convencional y en matraz destinado a extracción con microondas, cerrar ambos recipientes.
1.	Preparar en probeta el disolvente utilizado = Volumen de disolvente (ml) =
2.	Preparar baño para extracción convencional . Tª baño (°C) =
4.	Introducir en matraz para extracción convencional el disolvente e introducir el conjunto matraz/disolvente + aro estabilizador + soporte en el baño.
5.	Pesar materia prima (alperujo) en matraz para el pretratamiento con microondas e introducir el imán agitador: Masa de alperujo (g) = Ratio S/L (p/v)
6.	Homogeneizar la materia prima a 1200 rpm durante aproximadamente 2 minutos.
7.	Conectar microondas con refrigeración a P= 2barg Inicio del pretratamiento (h:m:s) = Potencia del pretratamiento (W) = Agitación encendida
8.	Introducir matraz abierto en el microondas y sonda de temperatura en el matraz.
9.	Detener microondas cuando : Tiempo total del pretratamiento (h:m:s) = Temperatura final alcanzada (°C) =
10.	Enfriar matraz utilizado en el microondas con agua fría temperatura próxima a la temperatura del baño Tiempo final del pretratamiento y enfriamiento (h:m:s) =
11.	Introducir el disolvente previamente calentado a temperatura del baño en matraz del pretratamiento y tomar a continuación la primera muestra: M00 Muestra a T=0 min: (h:m:s)
12.	Tras este punto se inicia la extracción convencional introduciendo el matraz en el baño y obteniendo muestra en los siguientes tiempos: M01 Muestra a t=10 min: (h:m:s) M02 Muestra a t=20 min: (h:m:s) M03 Muestra a t=40 min: (h:m:s) M04 Muestra a t=90 min: (h:m:s) M05 Muestra a t=180 min: (h:m:s)

Figura 15. Ficha genérica para la realización de extracción con pretratamiento SFME.

Referencia: Exp. X																			
Fecha:xx/xx/xxxx																			
Experimento a Pretratamiento MAE a Presión																			
0.	Arrastrar el aire con nitrógeno en matraz de extracción convencional y en celda Q-tube, cerrar ambos recipientes.																		
1.	Preparar Baño para extr.convencional e introducir el conjunto: matraz, soporte y aro estabilizador.																		
	Tº baño (°C) =																		
2.	Pesar materia prima (alperujo) en vaso de precipitado:																		
	Masa de alperujo (g) =																		
3.	Preparar en probeta el disolvente utilizado =																		
	Volumen de disolvente (ml) =																		
	Ratio S/L (p/v) =																		
4.	Arrastrar la masa de alperujo a la celda Q-tube con la ayuda de un embudo por medio de varios lavados de disolvente																		
5.	Incorporar imán de agitación en celda Q-tube.																		
6.	Arrastrar el aire de Q-tube con nitrógeno y volver a cerrar el recipiente.																		
7.	Realizar vacío en Qtube:																		
	Presión (barg) =																		
8.	Llevar la celda a microondas																		
9.	Conectar microondas sin refrigeración																		
	Inicio del pretratamiento (h:m:s) =																		
	Potencia del pretratamiento (W) =																		
	Agitación encendida																		
10.	Detener microondas cuando:																		
	Tiempo total del pretratamiento: (h:m:s)																		
	Presión Final = bara = barg																		
	Temperatura final alcanzada (°C) =																		
11.	Enfriar con agua + hielo con agitación interior, hasta llegar a la presión P = barg																		
	Tiempo final del pretratamiento y enfriamiento (h:m:s) =																		
12.	Despresurizar																		
13.	Introducir masa en matraz y tomar primera muestra, tras este punto se inicia la extracción convencional																		
14.																			
	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">M00</td> <td style="padding: 2px 5px;">Muestra a T=0 min:</td> <td style="padding: 2px 5px;">(h:m:s)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">M01</td> <td style="padding: 2px 5px;">Muestra a t=10 min:</td> <td style="padding: 2px 5px;">(h:m:s)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">M02</td> <td style="padding: 2px 5px;">Muestra a t=20 min:</td> <td style="padding: 2px 5px;">(h:m:s)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">M03</td> <td style="padding: 2px 5px;">Muestra a t=40 min:</td> <td style="padding: 2px 5px;">(h:m:s)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">M04</td> <td style="padding: 2px 5px;">Muestra a t=90 min:</td> <td style="padding: 2px 5px;">(h:m:s)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">M05</td> <td style="padding: 2px 5px;">Muestra a t=180 min:</td> <td style="padding: 2px 5px;">(h:m:s)</td> </tr> </table>	M00	Muestra a T=0 min:	(h:m:s)	M01	Muestra a t=10 min:	(h:m:s)	M02	Muestra a t=20 min:	(h:m:s)	M03	Muestra a t=40 min:	(h:m:s)	M04	Muestra a t=90 min:	(h:m:s)	M05	Muestra a t=180 min:	(h:m:s)
M00	Muestra a T=0 min:	(h:m:s)																	
M01	Muestra a t=10 min:	(h:m:s)																	
M02	Muestra a t=20 min:	(h:m:s)																	
M03	Muestra a t=40 min:	(h:m:s)																	
M04	Muestra a t=90 min:	(h:m:s)																	
M05	Muestra a t=180 min:	(h:m:s)																	

Figura 16. Ficha genérica para la realización de extracción con pretratamiento MAE presurizado.

En las Figuras 17, 18, 19 se representan de forma esquemática el desarrollo de los tres procesos: extracción convencional, con pretratamiento SFME y con pretratamiento MAE.P, respectivamente. Se indica en cada uno de los desarrollos de las extracciones el instante de la toma de muestras líquidas.

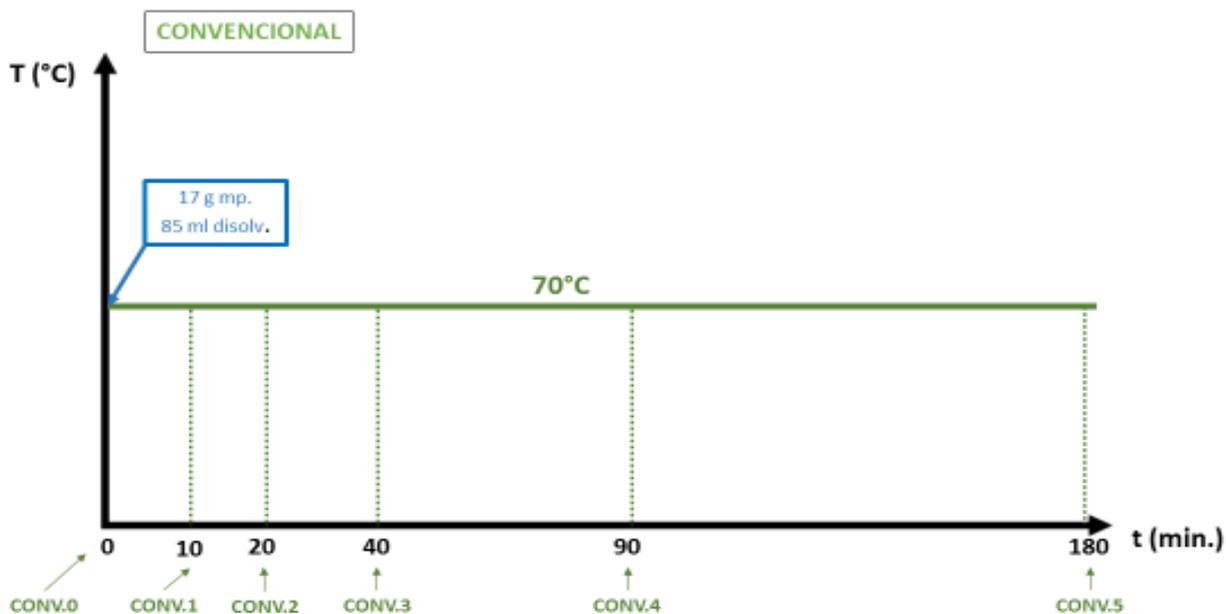


Figura 17. Gráfica representativa de una extracción convencional.

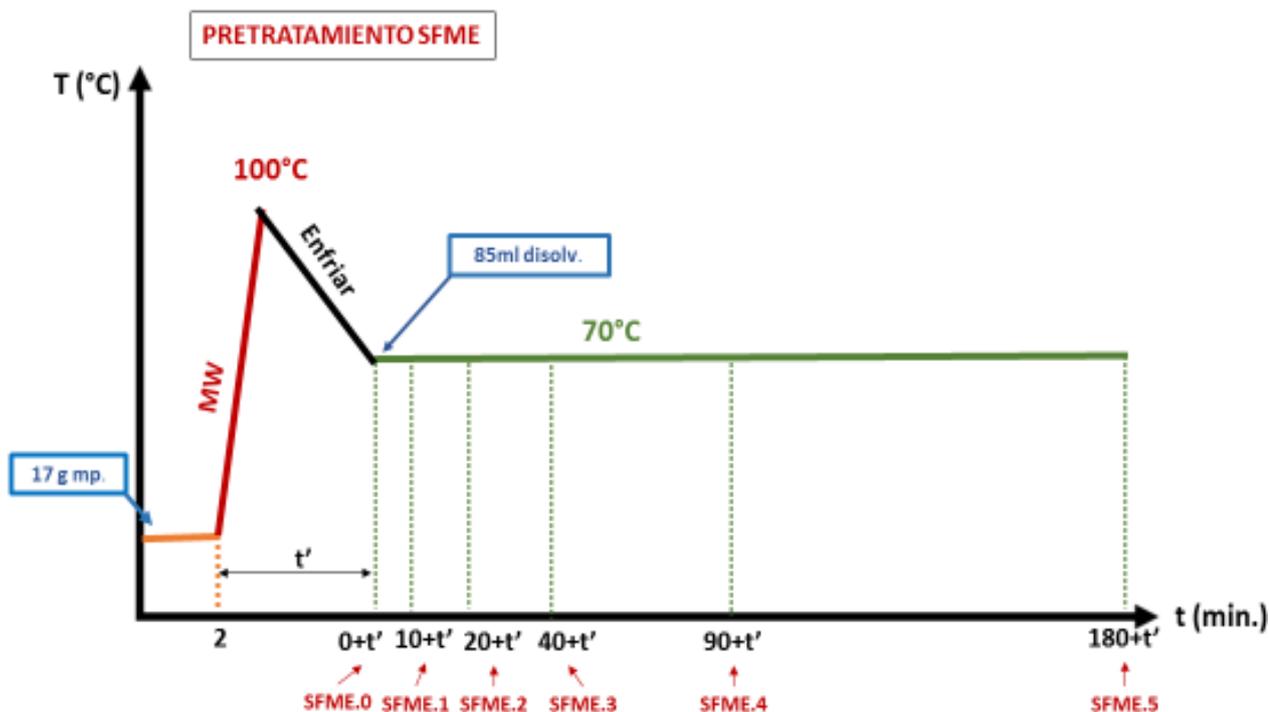


Figura 18. Gráfica representativa de un pretratamiento SFME.

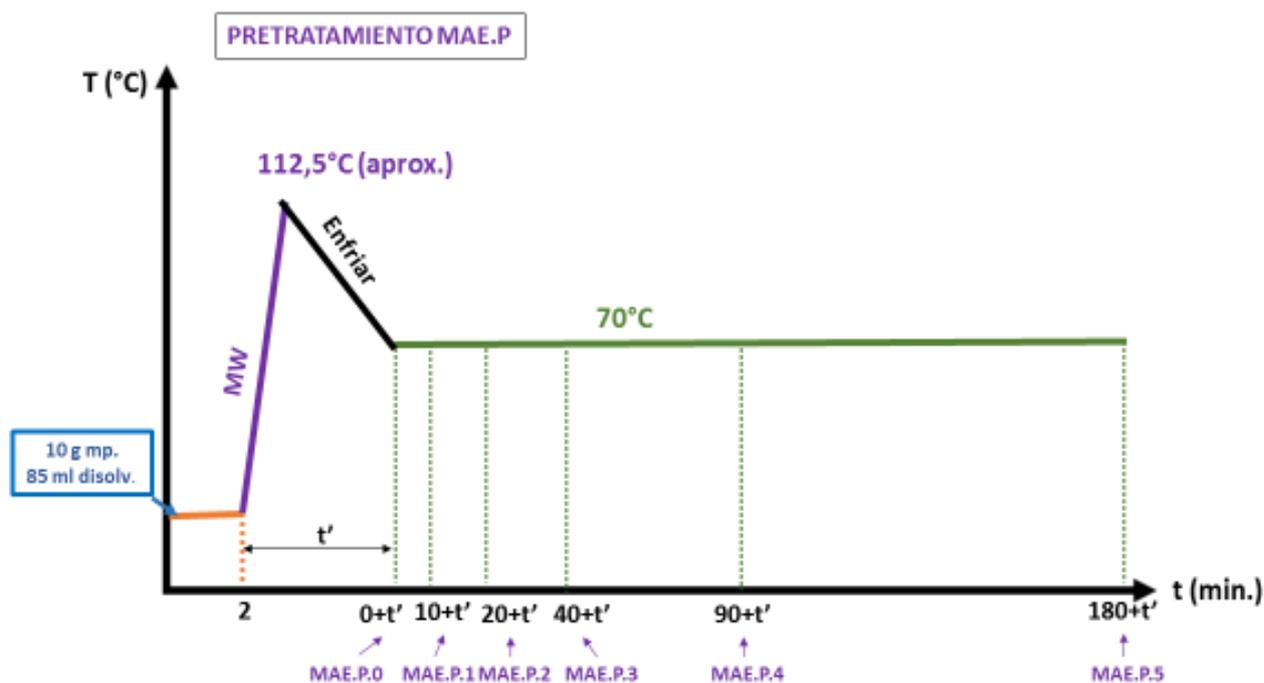


Figura 19. Gráfica representativa de un pretratamiento MAE.P.

En la extracción convencional la primera muestra se tomó al inicio del experimento, una vez calentado el disolvente a 70 °C. Este punto se representa como CONV.0 a tiempo cero minutos en la Figura 17.

En las extracciones con pretratamiento (SFME y MAE.P), la primera muestra líquida se tomó en el inicio de la extracción convencional, tras el enfriamiento posterior al pretratamiento, puntos (SFME.0 y MAE.P.0) en las Figuras 18, 19. El tiempo se empezó a contabilizar después de la etapa de homogeneización de la muestra. Por tanto, las muestras se tomaron a un tiempo superior en comparación con las muestras líquidas de la extracción convencional. El tiempo de las etapas de pretratamiento y enfriamiento depende de muchos factores, por lo que en la gráfica se muestra como t' debido a que se midió de forma aproximada.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Para conocer la humedad del alperujo se llevó a cabo un procedimiento gravimétrico indirecto por desecación (46), el cual se repitió por triplicado para garantizar la repetitividad del proceso:

Se colocaron aproximadamente 9 gramos de muestra húmeda de alperujo, en un recipiente de 11 gramos de peso (previamente secado en estufa a 105 °C durante 24 horas para que alcance peso constante). Se introdujo dicho recipiente con la muestra en una estufa a 105 °C durante 24 horas. Posteriormente se introdujo dicha muestra en un desecador que contenía gel de sílice para que se enfriase. Y se realizó el pesaje de la muestra.

El contenido de humedad (%) en se calculó con la siguiente ecuación:

$$H(\%) = \frac{(Vial_{+MH} - Vial_{+MS})}{(Vial_{+MH} - Vial_S)} * 100 \quad Ec.(10)$$

, dónde $Vial_{+MH}$ es el peso en gramos del recipiente con la muestra húmeda, $Vial_{+MS}$ es el peso en gramos del recipiente con la muestra secada y $Vial_S$ es el peso en gramos del recipiente seco.

3.6 DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO FENÓLICO

Independientemente del tipo de extracción y los pretratamientos aplicados al alperujo realizó el siguiente procedimiento experimental gravimétrico para determinar la cantidad de residuo seco que se encontraba en cada uno de los extractos fenólicos obtenidos.

Se realizó la pesada de un vial de cristal vacío previamente secado en estufa a 105 °C durante 24 horas, para que de esta manera alcanzase un peso constante. A continuación, se han depositado 500 µL con la ayuda de una pipeta en dicho recipiente y se ha procedido a su pesaje, cuyo dato también se puede utilizar para el cálculo de la humedad del extracto. Seguidamente se introdujo dicho recipiente con los 500 µL de extracto fenólico en una estufa a 105 °C durante 24 horas. Por último, se pesó el extracto seco tras enfriarse en un desecador.

Como se observa el procedimiento para la determinación del extracto seco fenólico es exactamente igual que el procedimiento realizado para el cálculo de la humedad del alperujo, teniendo en cuenta que en este caso se utiliza el extracto fenólico obtenido de la extracción de compuestos fenólicos en vez del alperujo.

El residuo seco (mg/l de extracto fenólico húmedo) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$RS \left[\frac{mg_{extracto\ seco}}{L_{extracto\ Húmedo}} \right] = \frac{(Vial_{+Ms} - Vial_s)}{0.005} \quad Ec.(11)$$

, donde $Vial_{Ms}$ es el peso en gramos del recipiente con el extracto fenólico seco y $Vial_s$ es el peso en gramos del recipiente seco.

3.7 TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA, DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La concentración de polifenoles totales de los extractos obtenidos se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (47).

Se basa en la reducción en medio básico del reactivo Folin-Ciocalteu, (que contiene una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico) por acción de los compuestos fenólicos. Debido a esto se forman óxidos de wolframio y molibdeno, cromógenos de color azul intenso que absorben la luz en una franja de 620 nm a 750 nm, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (48).

La lectura de los datos se realizó a través de espectrofotometría a 765 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV / VIS), obteniéndose una medida proporcional a la concentración de compuestos fenólicos del extracto.

1. Preparación de la muestra de extracto fenólico para cada extracción, de un determinado experimento:
 - a) Se prepararon tres soluciones de extracto fenólico de cada extracción ya que se analizaron por triplicado. Se diluyeron 5000 μ L de agua destilada (milli-Q) con 1000 μ L de extracto fenólico en eppendorfs. Las muestras fueron homogeneizadas con la ayuda de un vórtex y denominadas como Réplica 1, Réplica 2 y Réplica 3 respectivamente.

2. Procedimiento para la determinación de compuestos fenólicos de cada una de las soluciones de extracto fenólico:
 - a) Se preparó un baño a 40 °C, a partir de un vaso de precipitados, barra de agitación magnética, termómetro, placa calefactora y agitadora magnética. Se cubrió el baño con papel de aluminio para que alcanzase con mayor rapidez la temperatura designada.

b) Para este método se preparó una muestra de referencia o muestra Blanco, con la que se compararon el resto de muestras de extracto de alperujo (muestra objeto de estudio):

I. Muestra objeto de estudio:

- Se llevaron 40 μL de solución de extracto fenólica a un tubo de ensayo con 3000 μL de agua destilada (milli-Q).
- Se agregaron 200 μL de reactivo Folin-Ciocalteu. Una vez cerrado el tubo de ensayo, se agitó suavemente sin llegar a volcar.
- Tras una espera de 5 minutos se añadió 600 μL de Na_2CO_3 (20%, p/v), y después de cerrar se volvió a agitar el tubo de ensayo.
- Se introdujo en el baño durante 30 minutos.
- Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a $\lambda=765$ nm frente a la solución de blanco para cada una de las soluciones de extracto fenólico.

II. Muestra de referencia o blanco: se siguió el mismo procedimiento que el realizado para la muestra de extracto fenólico, pero se agregaron 40 μL de Buffer en lugar de los 40 μL de disolución de extracto fenólico.

La concentración de compuestos fenólicos totales se calculó a partir de una recta patrón de ácido gálico, que se construyó a partir de un rango de concentraciones de 0 a 900 ppm a través del procedimiento anteriormente descrito. La concentración fenólica obtenida dividió entre el factor de dilución para obtener de esta manera la concentración corregida. Los resultados obtenidos se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto húmedo (mgGAE/L).

Referencia	Concentración (mg/L)	Absorbancia (nm)
Blanco	0,0	0,000
P5	112,5	0,131
P4	225,0	0,264
P3	450,0	0,540
P2	675,0	0,817
P1	900,0	1,075

Tabla 4: Cuadro de concentraciones para la construcción de la curva de calibración para el ácido gálico.

Tanto la respuesta del método, como la curva de calibración (Figura 20), se van a regir por la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (mg/l)} = \text{WL765} * 831,83117 + 1,82792 \quad \text{Ec.(12)}$$

, dónde WL765 es la absorbancia en nm medida por el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.

En la siguiente figura se muestra la curva de calibración del ácido gálico. El coeficiente de regresión es muy próximo a la unidad $R=0.99986$, lo que confirma la linealidad de absorción en este intervalo de concentraciones y la validez del método seleccionado.

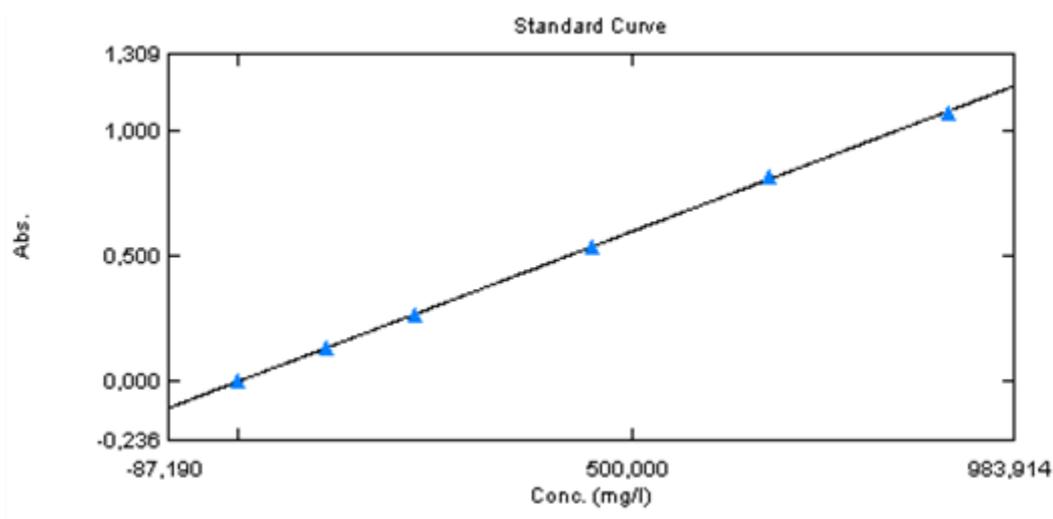


Figura 20. Curva de calibración de ácido gálico, para la determinación de polifenoles disueltos, obtenida a partir del programa UVProbe.

Con los datos obtenidos de residuo seco en cada una de las extracciones, el contenido de humedad de la materia prima (alperujo) y la relación S:L, se calculó la concentración de compuestos fenólicos en función del grado de riqueza de la extracción (mg GAE/ g extracto seco) y en función del rendimiento de la extracción (mgGAE/g alperujo seco).

3.8 TÉCNICA CROMATOGRAFÍA, ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLIFENOLES POR HPLC

Este estudio se realizó para conocer la concentración de hidroxitirosol y oleuropeína en los extractos fenólicos obtenidos en las extracciones.

Estos compuestos se cuantificaron a partir de un Módulo de Separación Waters e2695, equipado con un inyector automático, bomba cuaternaria y un detector de fotodiodos array Waters 2998. Se empleó una columna de separación analítica de fase reversa Mediterranea Sea C18 de características técnicas: 250 × 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm que mantuvo como temperatura de operación 35 °C durante el desarrollo cromatográfico y una precolumna de protección OptiGuard de 1 mm del mismo material (Sigma-Aldrich, España).

Las muestras se filtraron con filtros de jeringuilla de celulosa regenerada de 0,45 µm y se inyectó un volumen de muestra de 20 µl en el sistema.

El procedimiento analítico siguió las directrices propuestas por (49) con algunas pequeñas modificaciones: la separación se consiguió utilizando un gradiente de elución con una composición inicial de agua (pH ajustado a 3,0 con ácido fosfórico) del 90% y metanol al 10%. La concentración del disolvente posterior se aumentó a 30% durante 10 min y se mantuvo durante 20 min. Posteriormente, el porcentaje de metanol se elevó hasta 40% durante 10 min, se mantuvo durante 5 min, y luego aumentó hasta 50%. Finalmente, el porcentaje de metanol se aumentó a 60, 70 y 100% en periodos de 5 min. Las condiciones iniciales se alcanzaron en 15 min. El flujo fue 1 ml/min en todos los experimentos.

Para la detección y cuantificación de los compuestos fenólicos, los cromatogramas se registraron en el detector de fotodiodos a 280 nm para hidroxitirosol y oleuropeína(50). La adquisición y procesamiento de datos se realizaron con el software Water Empower 3.

Los compuestos en cada muestra se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención y los espectros UV / Vis con los patrones.

Las curvas de calibración se realizaron empleando soluciones estándar de patrón en el intervalo 7,5-100 ppm utilizando como solvente DMSO. Se ha utilizado una concentración de stock de patrón hidroxitirosol de 30 ppm y oleuropeína de 15 ppm.

A continuación, se muestra el cuadro donde se sintetizan las operaciones realizadas para llevar a cabo la curva de calibración y la curva de calibración de Hidroxitirosol propiamente dicha, teniendo en cuenta que el tiempo de residencia de este compuesto es aproximadamente de 11 minutos (RT= 10,843-10,909 min).

	V (μL inyectados)	Área (microV·s)	C (ppm)
HT10	10	245341	15
HT20	20	508288	30
HT40	40	1051264	60
HT60	60	1571121	90
HT80	80	2010326	120
HT100	100	2491948	150

Tabla 5. Cuadro utilizado en el cálculo de la curva de calibración del Hidroxitirosol.

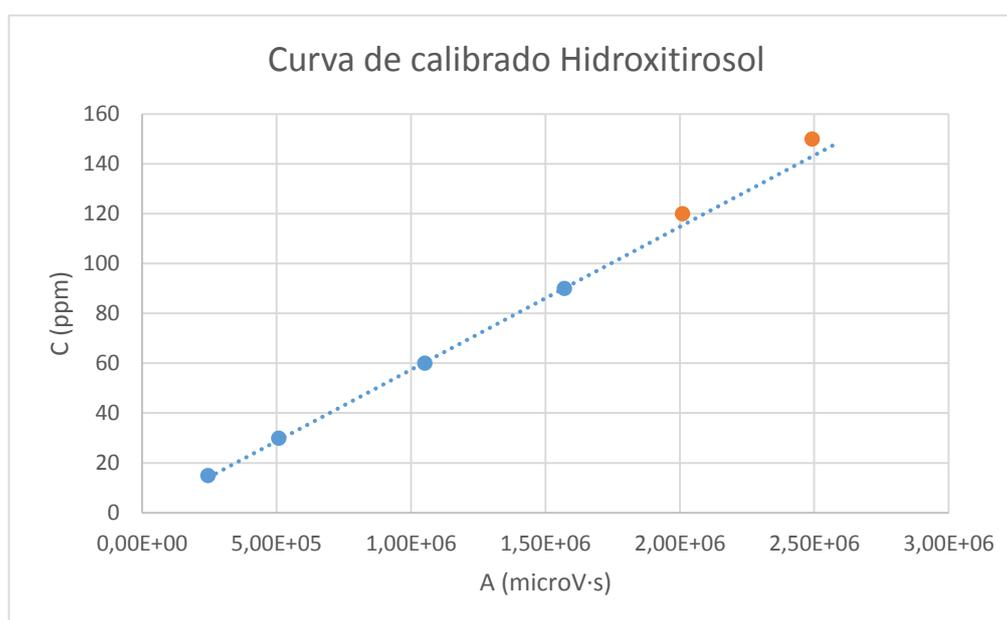


Figura 21. Curva de calibración de Hidroxitirosol.

En la figura anterior se muestra la curva de calibración del hidroxitirosol, la cual se rige por la siguiente ecuación:

$$C_{Hidroxitirosol} [ppm] = 0,00005741 \cdot A [microV \cdot s] \quad Ec.(13)$$

, dónde A se refiere al área del pico representado a los 10,843-10,909 min medido a una longitud de onda de 280 nm.

Para obtener el coeficiente de regresión R=0.9995 y asegurar la viabilidad del método, no se tuvieron en cuenta las dos últimas mediciones de mayor concentración. Con concentraciones superiores a 90 ppm se pierde la respuesta lineal y se desaconsejaría utilizar este método.

Para obtener la curva de calibración de oleuropeína se utilizó como solvente DMSO, conocido el tiempo de residencia cuyo valor es aproximadamente 51 minutos (RT= 51,388-51,494 min) y manteniendo el volumen de inyección del método. En la tabla siguiente se muestran las mediciones realizadas para obtener la curva de calibración:

	V (µL inyectados)	Área (microV·s)	C (ppm)
OLEO10	10	43161	7,5
OLEO20	20	92561	15
OLEO40	40	186472	30
OLEO60	60	281322	45
OLEO80	80	364292	60
OLEO100	100	411168	75

Tabla 6: Cuadro realizado en el cálculo de la curva de calibración de la Oleuropeína

Se obtiene la siguiente ecuación:

$$C_{oleuropeína} [ppm] = 0.000217 \cdot A [microV \cdot s] \quad Ec.(14)$$

, dónde A se refiere al área del pico representado a los 51,388-51,494 min medido a una longitud de onda de 280 nm.

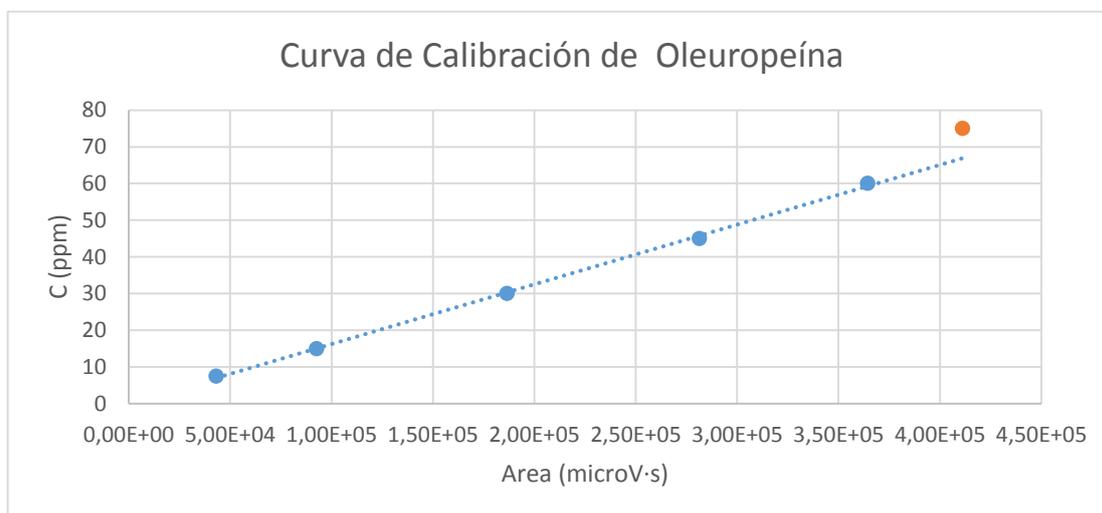


Figura 22. Curva de calibración de Oleuropeína.

Al igual que en la curva de calibración del hidroxitirosol, no se tuvieron en cuenta todos los puntos cuantificados para la construcción de la curva de calibrado. Se despreció el punto de mayor concentración. Dicha curva tiene un coeficiente de regresión R=0.9992. En el intervalo de concentraciones de [7,5- 60 ppm] se tiene certeza de una respuesta lineal y se asegura la viabilidad del método de análisis.

CAPÍTULO 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se da una visión general sobre los resultados de la influencia que tienen los pretratamientos por microondas en una extracción convencional. Para ello se van a comparar los rendimientos y la riqueza de la extracción de extracciones con pretratamiento y sin pretratamiento, y por último se va a realizar un análisis cuantitativo de los polifenoles de interés: hidroxitirosol y oleuropeína.

En la Tabla 7 se muestran los códigos utilizados correspondientes a las muestras de los extractos analizados y el tipo de extracción realizado, para que, a partir de este momento, resulte más sencillo identificarlas. Cada uno de estos códigos estará acompañado de una cifra del 0 al 5 ejemplo CONV.0, CONV.1, que indicará el orden de toma de muestras explicado en las Figuras 17, 18, 19 del Capítulo 3: Materiales y Métodos.

Código	Características
CONV	Extracción convencional 70°C Etanol/Agua (50:50, v/v).
SFME	Pretratamiento SFME + Extracción convencional 70°C Etanol/Agua (50:50 ,v/v).
MAE.P	Pretratamiento MAE presurizado + Extracción convencional 70°C Etanol/Agua, (50:50 ,v/v).

Tabla 7. Códigos y características de las extracciones realizadas

A la hora de calcular el rendimiento y la riqueza de las extracciones, tal y como se indicó en el capítulo anterior, de cada experimento se realizaron seis tomas de muestras a los tiempos: 0, 10, 20, 40, 90, 180 minutos en la extracción convencional, y 0+t', 10+t', 20+t', 40+t', 90+t', 180+t' minutos en las extracciones con pretratamiento. A su vez, cada una de estas muestras del experimento se analizó por triplicado. Por lo tanto, de un único experimento se analizaron 18 muestras. La precisión de estos métodos en términos de reproductibilidad y repetitividad en el laboratorio se determinó mediante la realización de triplicados de los experimentos. Se analizó una matriz de 54 datos para la extracción convencional sólido-líquido, 54 datos para extracción SFME, y otros 54 datos en MAE.P.

En el Anexo 2 se incluyen todos los datos obtenidos de cada extracción, por si se busca una visión más detallada del análisis de datos. Para que resulte más sencillo, la discusión de resultados se realizará con los promedios de las extracciones y las desviaciones estándar asociadas.

4.1 CONTENIDO DE HUMEDAD DEL ALPERUJO.

Se realizó un triplicado del método explicado en el capítulo anterior para la determinación del contenido de humedad. En la siguiente tabla se resumen los valores medios del porcentaje de humedad del alperujo. Como se indica su humedad se encuentra en torno a $76,054 \pm 2,813\%$.

Réplica 1(%)	Réplica 2(%)	Réplica 3(%)	Promedio (%)	Desviación estándar (SD, %)
79,29	74,65	74,22	76,05	2,81

Tabla 8. Contenido de humedad del alperujo.

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO SECO O EXTRACTO SECO.

Los valores del residuo seco (RS), se utilizaron para el cálculo de la riqueza de extracción de compuestos fenólicos. Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 3.6 del Capítulo 3. Materiales y Métodos.

Código	Residuo Seco mg/L			Código	Residuo Seco mg/L			Código	Residuo Seco mg/L		
	Promedio	SD	CV		Promedio	SD	CV		Promedio	SD	CV
CONV.0	8533	2160	25%	SFME.0	19267	10596	55%	MAE.P.0	10600	632	6%
CONV.1	11233	889	8%	SFME.1	11067	2541	23%	MAE.P.1	11333	1418	13%
CONV.2	12033	1376	11%	SFME.2	10167	2670	26%	MAE.P.2	11333	952	8%
CONV.3	12633	763	6%	SFME.3	12267	2369	19%	MAE.P.3	10900	837	8%
CONV.4	13533	1623	12%	SFME.4	11367	2597	23%	MAE.P.4	11233	625	6%
CONV.5	13067	1395	11%	SFME.5	10567	2167	21%	MAE.P.5	11167	612	5%

Tabla 9. Residuo seco (mg/L) promedio de las extracciones estudiadas.

La siguiente tabla recoge los residuos secos obtenidos en cada uno de los puntos de toma de muestra de las extracciones realizadas: convencional sólido-líquido (CONV.), con pretratamiento SFME y pretratamiento MAE.P respectivamente. Se muestran los promedios de los residuos junto a sus desviaciones estándar y coeficientes de variación.

Los valores de residuo seco obtenidos en las primeras muestras tanto la extracción CONV como la extracción SFME tienen un coeficiente de variación muy elevado (25% CONV.0, 55% SFME.0) por lo tanto no son datos significativos de estudio.

En la Figura 23 se muestra un gráfico comparativo de los residuos secos en cada una de las extracciones realizadas, en los distintos puntos de toma de muestra.

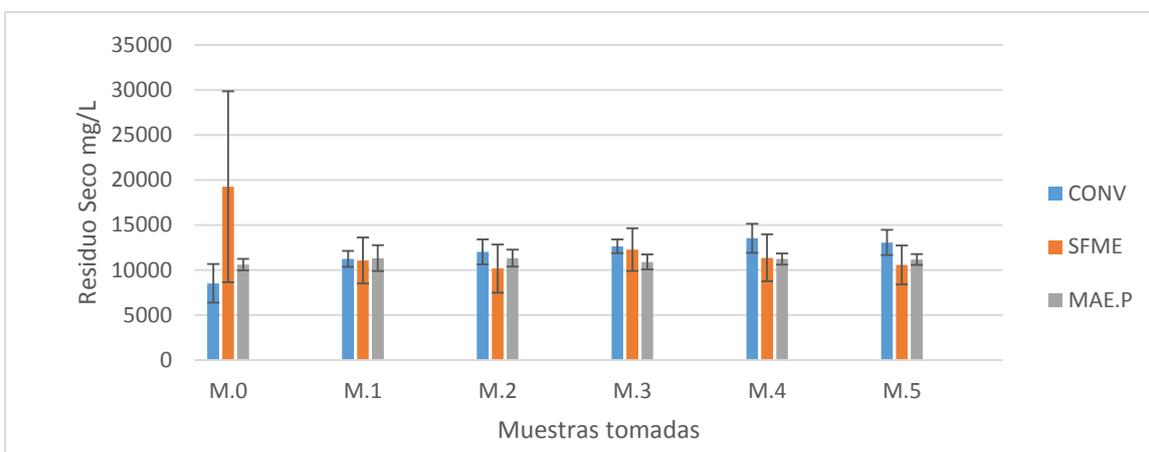


Figura 23. Gráfico de Residuo Seco (mg/L) en extracciones CONV, SFME y MAE.P en función de las muestras tomadas.

Como queda constancia en la figura y tabla anterior, la repetitividad del proceso es baja, ya que se tienen altos coeficientes de variación, probablemente debido a las características de la muestra, ya que se trata de un producto natural.

En la extracción convencional sólido-líquido se observa un aumento paulatino del residuo seco como cabe esperar, mientras que en las extracciones con pretratamiento parece permanecer constante al menos en MAE.P.

Si se relacionan los residuos secos obtenidos en las extracciones, en MAE.P disminuye la concentración final de residuo seco en torno al 15 % en comparación con el proceso de extracción CONV. Este dato resultará interesante en el cálculo de la riqueza de la extracción.

4.3 RENDIMIENTO Y RIQUEZA DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS:

Las concentraciones de polifenoles totales presentes en el alperujo se expresan de dos maneras distintas: en mg ácido gálico equivalente/g de alperujo seco y en mg ácido gálico equivalente/g de extracto seco. La concentración en mg ácido gálico equivalente/g de alperujo seco, representa el rendimiento de la extracción o la cantidad de polifenoles extraídos de la materia prima. Mientras que la segunda forma (mg ácido gálico equivalente/g de extracto seco) describe la riqueza final del producto seco, ya que indica la proporción entre los polifenoles extraídos y las sustancias totales extraídas.

El precio unitario en el mercado del producto final comercializado, que es el residuo seco, vendrá determinado por la riqueza, motivo por el que este parámetro se considera de mayor relevancia que el de rendimiento, ya que las diferencias de precio unitario son muy significativas.

4.3.1 Rendimiento del proceso de extracción convencional Sólido-Líquido

Como se indicó en el capítulo de materiales y métodos, se realizó la extracción convencional utilizando como disolvente una mezcla de etanol/agua (50:50, v/v). Aunque otros estudios demostraron que se aumentaba el rendimiento utilizando otros disolventes como: el metanol (51) o la acetona (52), en este estudio se usó etanol porque los extractos obtenidos estarán destinados a la industria alimentaria y cosmética, donde la restricción en el uso de disolventes está muy delimitada.

De los disolventes utilizados, el etanol se encuentra en la lista de “Disolventes de extracción que deberán utilizarse respetando las buenas prácticas de fabricación para todos los usos” del Anexo “DISOLVENTES DE EXTRACCIÓN CUYA UTILIZACIÓN ESTÁ AUTORIZADA PARA EL TRATAMIENTO DE MATERIAS PRIMAS, DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS O DE COMPONENTES DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS O DE SUS INGREDIENTES” correspondiente a la Directiva 2009/32/CE del Parlamento Europeo y Consejo de 23 de abril de 2009 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la producción de productos alimenticios e ingredientes alimentarios Anexo 3. Otra de las razones de la utilización de este disolvente fue que la empresa suministradora de alperujo ya utiliza etanol para extracción de polifenoles de uva.

Se eligió un tiempo de experimentación de 180 minutos, puesto que a tiempos superiores a 24 horas no se produjo un aumento significativo en el rendimiento de extracción, esto puede deberse a la relación de equilibrio de partición sólido-líquido en las condiciones de trabajo utilizadas y a la degradación de los polifenoles (7).

Se eligió una temperatura de 70 °C, para no superar la temperatura de ebullición del disolvente. Esta temperatura no compromete la estabilidad del producto, ya que autores como Aliakbarian et al. (3) y Rincón et al.(53), trabajaron a temperaturas próximas a los 180°C e hicieron referencia a la alta estabilidad de los compuestos extraídos, principalmente hidroxitirosol.

En la Tabla 10, se encuentran los valores promedios de los triplicados del rendimiento de extracción (η) de los compuestos fenólicos del alperujo en la extracción convencional sólido-líquido (CONV). Se expresan en mg de ácido gálico equivalente/ g alperujo seco (mgGAE/g alpsco) con sus correspondientes desviaciones.

	TPC rendimiento [mgGAE/g alpseco]			Tiempo promedio (min)
	Promedio de las Réplicas	SD	CVar (%)	
CONV.0	14,28	± 4,68	33%	0
CONV.1	23,07	± 1,56	7%	12
CONV.2	24,79	± 1,44	6%	23
CONV.3	25,20	± 2,52	10%	44
CONV.4	28,09	± 1,73	6%	96
CONV.5	31,13	± 1,44	5%	181

Tabla 10. Rendimiento promedio de extracción convencional sólido-líquido (mg GAE/ g alperujo seco).

Se observa en la primera toma de muestras (CONV.0) una concentración de: $14,28 \pm 4,68$ mgGAE/g alpseco. Al tratarse de una extracción convencional sólido-líquido, en este punto únicamente se puso en contacto el disolvente a 70°C y la materia prima, por lo que indica la concentración de polifenoles libres en el alperujo. Aunque el rendimiento de extracción de este punto no resulta significativo debido a su coeficiente de variación (33%), si queda demostrado la existencia de polifenoles libres. En el resto de muestras extraídas, el coeficiente de variación se encuentra en un rango de [5 a 10%], por lo que este proceso de extracción presenta una reproductividad aceptable. A modo general, se observa un aumento progresivo, y a los 180 minutos no se tiene certeza de realizar la extracción en su totalidad, se trata de un proceso largo si se quiere obtener un rendimiento elevado.

4.3.2 Rendimiento del proceso de extracción con pretratamiento SFME

Para realizar una comparativa de rendimientos con el método convencional, se realizó un pretratamiento sin disolvente a presión atmosférica y después se produjo una extracción convencional sólido-líquido bajo las mismas condiciones de operación.

En la Tabla 11 se resumen los valores promedios del rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos del alperujo (mgGAE/g alpseco) en la extracción con pretratamiento SFME. Junto con el promedio de los tiempos de extracción para tener una visión general del proceso. Estos valores se presentan gráficamente en la Figura 11, en comparación con los resultados de las otras dos técnicas.

	TPC rendimiento [mg GAE/g alpseco]			Tiempo promedio (min)
	Promedio de las Réplicas	SD	CVar (%)	
SFME.0	24,50	± 6,87	28%	4
SFME.1	24,86	± 3,18	13%	15
SFME.2	25,08	± 3,69	15%	25
SFME.3	26,88	± 4,26	16%	45
SFME.4	25,72	± 5,36	21%	99
SFME.5	28,48	± 5,24	18%	203

Tabla 11. Rendimiento promedio de extracción con pretratamiento SFME (mg GAE/ g alperujo seco).

Debido a las desviaciones estándar asociadas a cada una de las muestras, no se puede confirmar si durante el proceso de extracción hay un aumento de concentración o no. Lo único que se puede denotar de este método, es la extracción casi total del contenido de polifenoles al inicio de la extracción convencional tras el pretratamiento SFME. Sin tener en cuenta la primera muestra tomada, ya que como se observaba en la extracción convencional anterior posee mucha variabilidad, el conjunto de muestras restantes poseen elevados coeficientes de variación [13 a 21%] lo que indicó la baja reproductividad de los experimentos.

El alperujo es una materia prima natural, y al aplicarle un proceso de calentamiento tan rápido y elevado no se puede predecir su comportamiento, debido a la heterogeneidad de sus compuestos y tampoco se puede asegurar que las muestras de los experimentos fueran iguales debido a la falta de homogeneidad de la materia prima suministrada.

4.3.3 Rendimiento del proceso de extracción con pretratamiento MAE Presurizado

Se realizó el pretratamiento asistido por microondas presurizado con disolvente en atmósfera de nitrógeno para que la extracción de polifenoles del alperujo fuese más eficiente. En este caso en el pretratamiento ya se incluyó el disolvente en su totalidad.

En la Tabla 12 se detallan los valores promedios del rendimiento de los compuestos fenólicos del alperujo (mgGAE/g alpseco) en la extracción con pretratamiento con microondas presurizado (MAE.P), y el correspondiente tiempo promedio de toma de muestras.

	TPC rendimiento [mg GAE/g alpseco]			Tiempo promedio (min)
	Promedio de las Réplicas	SD	CVar (%)	
MAE.P.0	24,95	± 1,28	5%	8
MAE.P.1	27,00	± 2,99	11%	16
MAE.P.2	26,73	± 2,87	11%	26
MAE.P.3	28,38	± 2,35	8%	46
MAE.P.4	29,45	± 2,34	8%	93
MAE.P.5	31,31	± 3,26	10%	186

Tabla 12. Rendimiento promedio de extracción con pretratamiento MAE.P (mg GAE/ g alperujo seco).

Se recuerda que el tiempo de extracción se tiene en cuenta desde el inicio del pretratamiento, por ello la primera toma de muestras no se realiza en tiempo cero.

Se puede garantizar una reproducibilidad de la primera muestra de la extracción ya que tiene un coeficiente de variación del 5%. El proceso en general tiene una repetitividad media ($CV < 12\%$).

Comparando las muestras, se observa un aumento del rendimiento entre la primera muestra tras el pretratamiento ($24,95 \pm 1,28$ mgGAE/g alpseco) frente a la última muestra tras la extracción convencional a 186 minutos ($31,31 \pm 3,26$ mgGAE/g alpseco). Esto indica que, tras el pretratamiento MAE.P, conviene realizar una extracción convencional, pero debido a las desviaciones estándar no se puede decir el tiempo necesario de extracción convencional ya que no se pueden diferenciar de forma clara sus concentraciones.

La Figura 24 muestra una comparativa de la tendencia que sigue el rendimiento promedio de la extracción de compuestos fenólicos en el tiempo en las tres técnicas de extracción empleadas. Las extracciones con pretratamiento SFME y MAE.P se encuentran más a la izquierda debido a que el tiempo comenzó a contabilizarse al iniciarse el pretratamiento. Solamente se incluye la línea de tendencia de los datos experimentales de la extracción convencional, ya que es la única cuyas desviaciones estándar permiten diferenciar el aumento del rendimiento en los distintos puntos.

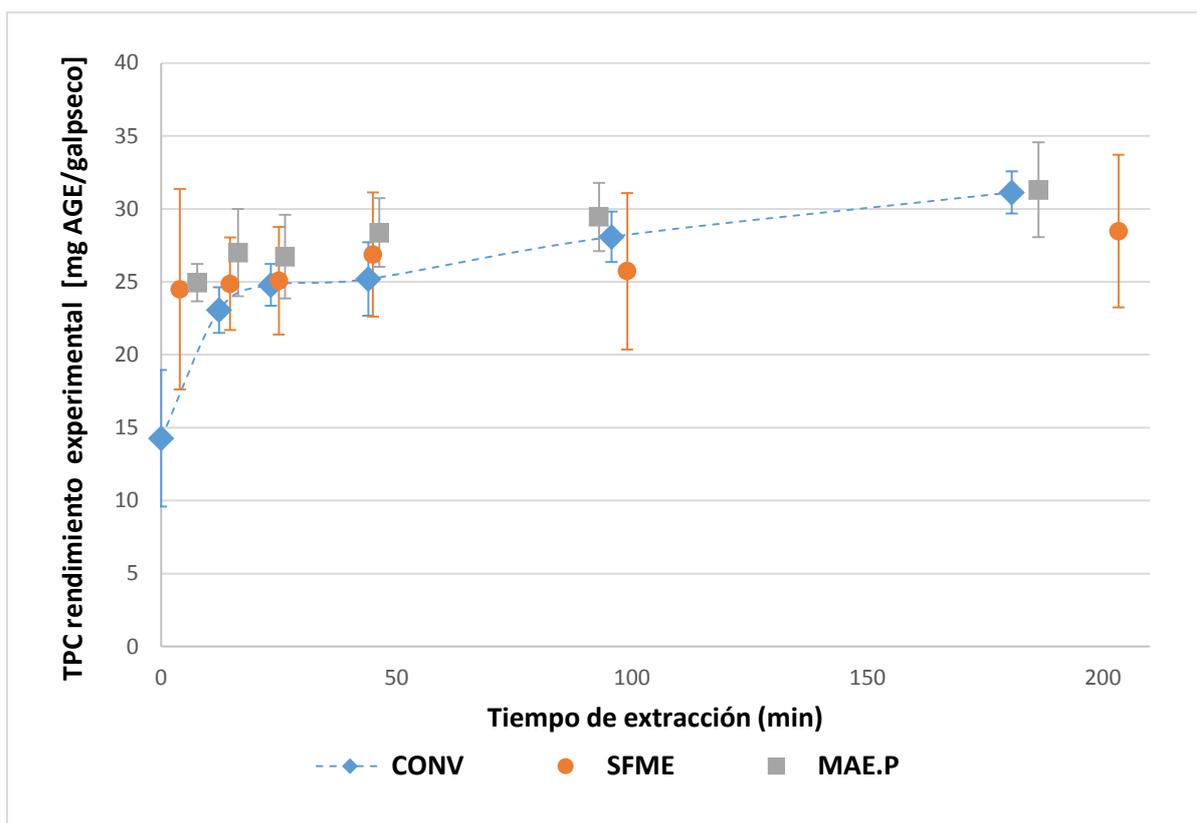


Figura 24. Tendencia experimental del rendimiento en extracciones CONV, SFME y MAE.P.

SFME presenta una gran dispersión de datos en todo el experimento, pero se puede interpretar que después del pretratamiento se obtienen todos los polifenoles extraíbles, ya que no hay mejora adicional del rendimiento tras la extracción convencional. En MAE.P se observa de forma gráfica el aumento del rendimiento tras el pretratamiento en relación con los puntos siguientes correspondientes a la extracción convencional realizada. De forma global, con pretratamientos se observa un mayor rendimiento en menores tiempos de extracción, en comparación con la extracción convencional sólido-líquido.

4.4 RIQUEZA DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

En las extracciones de polifenoles, además del compuesto de interés se extraen muchas otras sustancias como azúcares o fibras. Tal y como se comentó en el Capítulo 1. Introducción, cuanto mayor sea la riqueza del extracto, mayor precio tendrá en el mercado. Los valores de riqueza de las extracciones realizadas se muestran en el Anexo 2. Tienen desviaciones asociadas muy elevadas, por lo que no proporcionan grandes conclusiones. Pero sirven para tener una visión global del proceso de extracción y el estado de la materia prima.

En una extracción convencional sólido-líquido, se necesitan largos tiempos de extracción para obtener elevados rendimientos Figura 24, pero esto provoca que disminuya la riqueza de polifenoles del extracto. Llega un punto, donde se extraen compuestos no deseados en mayor proporción que los deseados, por lo tanto, se empobrece el extracto final. Un ejemplo de esto se muestra en la Figura 25:

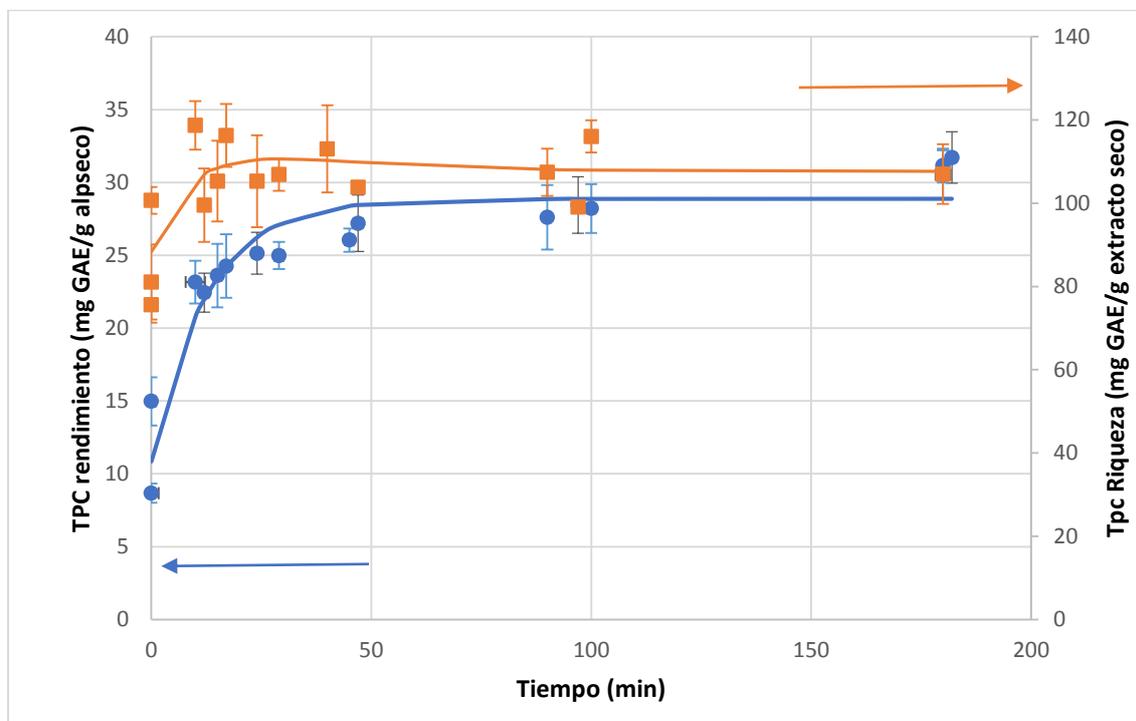


Figura 25. Extracción convencional de polifenoles totales (TPC), en términos de rendimiento y riqueza.

La máxima riqueza de extracción se obtiene aproximadamente a los 30 minutos, donde sólo se extraen el 85% de los polifenoles totales. Al continuar la extracción la riqueza disminuye de forma gradual. El comportamiento esperado de la riqueza en este tipo de extracciones convencionales, es una disminución más acusada, por lo que este es otro motivo para pensar que la materia prima se encontraba en mal estado a la hora de realizar la experimentación.

En las Tablas 13 y 14, se muestran los valores en términos de riqueza promedios (mgGAE/g extracto fenólico o extractoseco) a los tiempos de toma de muestra mostrados de los procesos de extracción con pretratamiento SFME, y MAE.P respectivamente.

	Riqueza [mg GAE/g extractoseco]			Tiempo promedio (min)
	Promedio de las Réplicas	SD	CVar (%)	
SFME.0	88,69	± 49,73	56%	4
SFME.1	119,90	± 26,29	22%	15
SFME.2	138,99	± 53,88	39%	25
SFME.3	116,28	± 29,15	25%	45
SFME.4	120,16	± 29,37	24%	99
SFME.5	143,34	± 35,33	25%	203

Tabla 13. Riqueza promedio de extracción con pretratamiento SFME (mg GAE/ g extracto seco).

	Riqueza [mg GAE/g extractoseco]			Tiempo promedio (min)
	Promedio de las Réplicas	SD	CVar (%)	
MAE.P.0	121,54	± 9,81	8%	8
MAE.P.1	123,38	± 12,88	10%	16
MAE.P.2	122,64	± 19,90	16%	26
MAE.P.3	134,50	± 9,74	7%	46
MAE.P.4	135,03	± 8,53	6%	93
MAE.P.5	144,91	± 17,87	12%	186

Tabla 14. Riqueza promedio de extracción con pretratamiento MAE.P (mg GAE/ g extracto seco).

En la extracción con pretratamiento SFME (Tabla 13), no se puede definir una tendencia clara de la riqueza para cada una de las muestras, debido a las desviaciones estándar asociadas. SFME tiene un coeficiente de variación muy elevado ($CV < 20\%$), que indica baja reproductividad del experimento. La extracción con pretratamiento MAE.P (Tabla 14), posee un valor inicial muy alto, se favorece a la extracción de polifenoles más que la de otros compuestos, parece tener un aumento progresivo durante la extracción, pero no se puede afirmar este hecho por el elevado valor de las desviaciones estándar. La extracción de compuestos no deseados se ve afectada por la radiación, pero no de manera tan significativa como la extracción de polifenoles, por ello el rendimiento y la riqueza son elevados en tiempos más cortos.

En la Figura 26, se muestran los datos experimentales promedios en términos de riqueza de extracción con pretratamiento SFME y MAE.P, donde queda constancia visualmente la gran dispersión de las concentraciones.

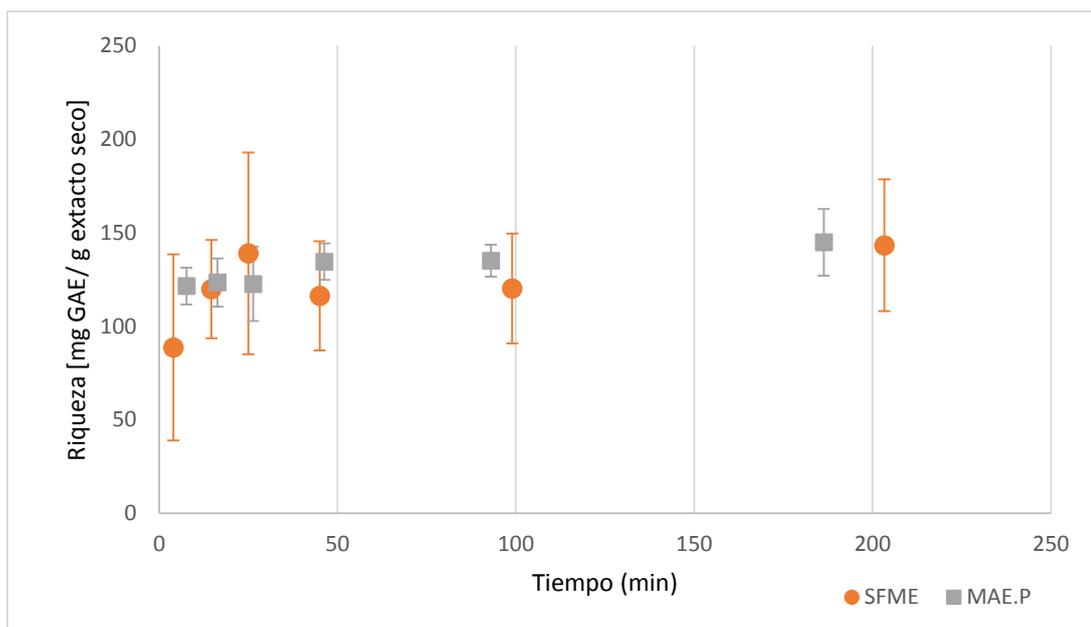


Figura 26. Datos experimentales de riqueza de extracciones con pretratamiento SFME y MAE.P.

4. 5 MODELADO CINÉTICO DE LAS ECUACIONES

Se realiza un estudio cinético del rendimiento (mgGAE/galpseco) y la riqueza (mgGAE/g extractoseco) de las distintas extracciones a partir de las muestras líquidas de extracto fenólico tomadas durante el proceso de extracción (10).

La cinética de extracción siguió una ecuación de primer orden, mostrada a continuación:

$$C_{teor} = C_0 + C_f * [1 - e^{-(k*t)}] \quad \text{Ec.(15)}$$

, dónde C_{teor} representa la concentración calculada en mg/g en un tiempo t (min), C_0 corresponde a la concentración inicial de polifenoles libres en el alperujo. C_f se trata de un factor pre-exponencial (mg/g), sumado a C_0 ($C_0 + C_f$) corresponde al rendimiento de extracción, y k es la constante de velocidad de la extracción (min^{-1}).

Los parámetros de correlación de la ecuación [15], se ajustan mediante la minimización de la desviación estándar (S) entre las concentraciones experimentales y las concentraciones teóricas calculadas, como muestra la ecuación [16], utilizando la herramienta Solver de Excel (Microsoft Corporation, USA).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{exp} - C_{teor})^2}{N - 1}} \quad \text{Ec.(16)}$$

, dónde C_{exp} representa a las concentración (mg/g) experimental, C_{teor} representa la concentración calculada en mg/g en un tiempo t , y N el número de muestras tomadas en el experimento.

Debido a los datos experimentales obtenidos, únicamente se muestran los resultados del estudio cinético de la extracción convencional sólido-líquido, porque en las extracciones con pretratamiento, el coeficiente de correlación entre las concentraciones calculadas y experimentales es muy bajo ($R^2 < 0.5$), por lo que no tiene sentido incluirlas.

Los parámetros cinéticos de extracción se detallan en la Tabla 15. La curva de regresión de riqueza se calcula como la fracción entre la concentración de compuestos activos y las sustancias totales extraídas, a partir de los datos obtenidos del espectrofotómetro (mgGAE/L) y el Residuo seco (mg/L).

Rendimiento (mgGAE/g alpecco)		RS (mg/L)		TPC (mgGAE/L)	
c0	10,84	c0	8597,02	c0	759,37
cf	18,02	cf	5215,63	cf	727,27
k	7,97E-02	k	4,69E-02	k	6,62E-02
ARD	1,71	ARD	1028,92	ARD	121,81
R	0,95	R	0,88	R	0,92

Tabla 15. Parámetros de extracción cinética en extracción convencional.

Se observa que todas las constantes de velocidad de la extracción son del mismo orden. Este dato servirá para comparar las velocidades de extracción de futuros estudios. Se busca un aumento de dicha constante para asegurar una extracción más rápida.

El coeficiente de correlación no es muy elevado $0.88 < R < 0.95$, denotando una baja correlación de datos. Este coeficiente de correlación no es suficientemente elevado, para tener un modelo cinético detallado, pero sí para tener una idea general sobre su comportamiento.

4.6 COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

Conocidos los rendimientos y la pureza de las extracciones llevadas a cabo, se realizó un análisis cromatográfico HPLC ya que el método espectrofotométrico no aporta información sobre la naturaleza individual de los compuestos fenólicos que se encuentran en los extractos. Este estudio se centró en la determinación de las concentraciones de hidroxitirosol y oleuropeína, ya que poseen un alto valor en la industria debido sus propiedades antioxidantes.

El método ha sido descrito en el capítulo anterior, aunque se debe recordar que los volúmenes de inyección del método fueron 20 μ L y la temperatura de 35°C, lo que facilita una reproductividad de los tiempos de retención y cuantificación de los picos (44).

En la Tabla 16, se muestran los tiempos de retención y ecuaciones de las curvas de calibración de los compuestos estudiados.

	Tiempo retención (min)		Longitud de onda (nm)
	Promedio	SD	
Hidroxitirosol	10,88	0,047	280
Oleuropeína	51,44	0,075	280

Tabla 16: *Tiempos de retención y longitudes de onda para la cuantificación de Hidroxitirosol y Oleuropeína por HPLC.*

Este análisis se realizó para tener una primera aproximación del comportamiento del Hidroxitirosol y Oleuropeína en extracciones con pretratamiento asistido por microondas. Por ello no se realizó en la totalidad de los experimentos, si no en los más representativos. A su vez se analizó una extracción convencional sin pretratamiento para observar las diferencias que existen.

En la extracción convencional sólido-líquido se tomaron seis muestras en los tiempos 0, 10, 20, 40, 90, 180 minutos y $0+t'$, $10+t'$, $20+t'$, $40+t'$, $90+t'$, $180+t'$ minutos en las extracciones con pretratamiento. A continuación, a modo de ejemplo el cromatograma de las extracciones CONV, SFME, y MAE.P de las primeras muestras tomadas, medidas a longitud de onda 280 nm.

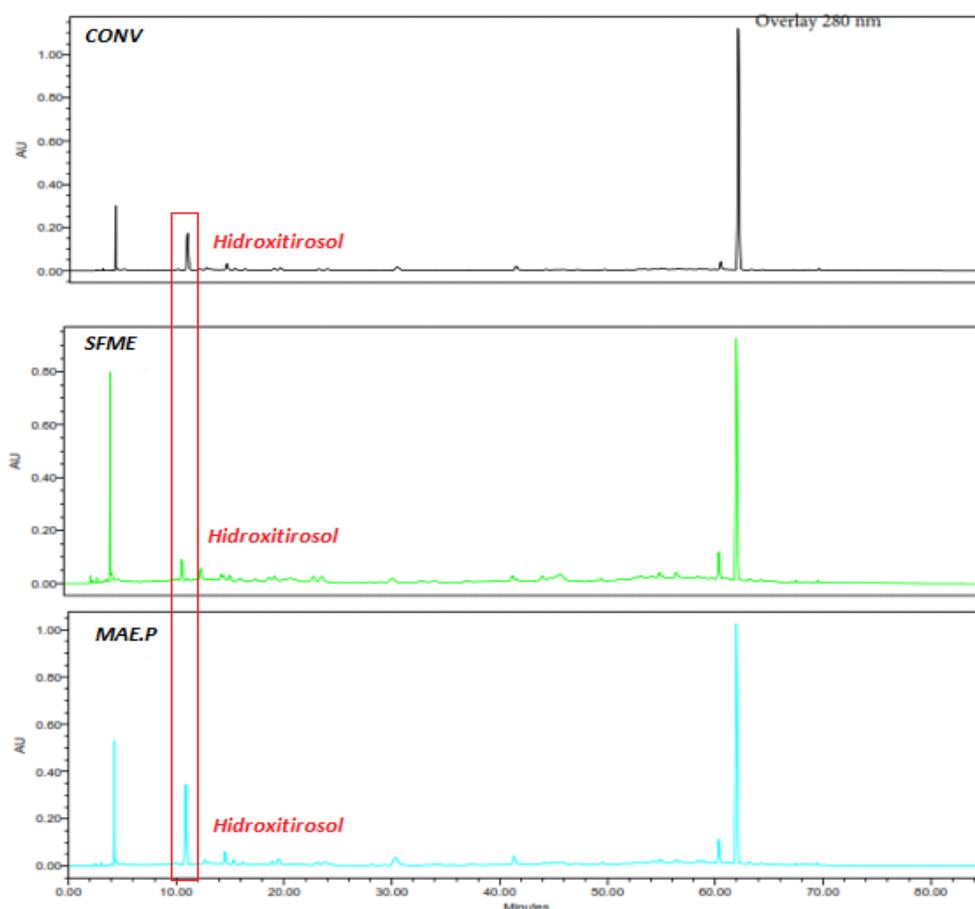


Figura 27. Cromatograma de extractos obtenidos en extracciones CONV, SFME, MAE.P en muestras iniciales a 280 nm. Se representa la señal registrada por el detector UV-Vis (AU) frente al tiempo de retención en la columna cromatográfica.

En las tres extracciones aparece el compuesto fenólico hidroxitirosol, mientras que a simple vista no se observa un pico de oleuropeína claro. Se comprobó que el pico que aparecía en torno a los 65/70 minutos se trataba de una señal del ruido del disolvente.

Para tener verdadera constancia que al tiempo de retención dado aparecía oleuropeína, se realizó el dopado de las muestras anteriores con compuesto patrón, y se comprobó que en la extracción SFME el pico al tiempo de retención 51,2 minutos aumentó, por lo que en ese experimento se demuestra cualitativamente la presencia de este compuesto fenólico, pero no cuantitativamente ya que la cuantificación se realizó de forma manual.

El dopado en las extracciones CONV. Y MAE.P no supuso el aumento del pico que se había caracterizado como oleuropeína. La no aparición de oleuropeína puede deberse a que este compuesto se encuentre hidrolizado en hidroxitirosol ácido elenólico y glucosa (54), y por ello aparece una señal a 320 nm más intensa que a 280 nm a ese tiempo de retención. Ya que ácido elenólico, es un ácido fenólico libre proveniente de un glucósido y su señal es más intensa a esa longitud de onda.

En la Tabla 17 se encuentran las concentraciones de hidroxitirosol de cada una de las extracciones en unidades (mg de hidroxitirosol/ g de extracto fenólico seco).

CÓDIGO	T(min)	Área HT	C (ppm) HT	C (mg HT/g extr.seco)
CONV	0	1977033	113,50	19,24
CONV	10	3836314	220,24	21,81
CONV	20	4012965	230,38	21,33
CONV	40	4167705	239,27	19,94
CONV	90	4392683	252,18	18,96
CONV	180	4690222	269,27	23,01
SFME	0	886864	50,91	4,28
SFME	10	738003	42,37	4,81
SFME	20	835589	47,97	7,05
SFME	40	953816	54,76	5,59
SFME	90	1005300	57,71	6,48
SFME	180	1183044	67,92	7,99
MAE.P	0	3716352	213,36	21,55
MAE.P	10	3826154	219,66	22,41
MAE.P	20	3953438	226,97	22,25
MAE.P	40	4118835	236,46	22,52
MAE.P	90	4551235	261,29	24,19
MAE.P	180	4918447	282,37	24,99

Tabla 17: Concentraciones de Hidroxitirosol, en extracciones CONV, SFME, MAE.P en los distintos tiempos de extracción.

Como se observa en la tabla, la realización de un pretratamiento asistido por microondas presurizado (MAE.P) favorece un aumento moderado de extracción de hidroxitirosol en la primera muestra tomada en relación con la extracción convencional (CONV).

En el pretratamiento sin disolvente SFME, se produce una disminución de extracción de hidroxitirosol en torno a una media de 70%. Esta disminución de la concentración parece deberse a la degradación del hidroxitirosol por las altas temperaturas a las que se realizó el experimento combinado a la ausencia de disolvente en el pretratamiento. Según Soysal et al. (55), cuando se aplica bajo condiciones no idóneas el pretratamiento con microondas, produce productos de baja calidad. Sobre esto, existen citas contradictorias, ya que (7) afirma que la mayor capacidad antioxidante se cuantificó con una temperatura de extracción de 180 °C. Por lo tanto, no se tiene certeza de las causas exactas de la disminución de hidroxitirosol, aunque podría deberse a la degradación del alperujo en el pretratamiento ya que se introducía sin disolvente.

Por lo tanto, a los 180 minutos de experimentación, con respecto a una extracción convencional sólido-líquido realizada a 70 °C a partir disolvente etanol/agua (50:50, v/v), alperujo húmedo y una relación S/L 1:5, la realización de un pretratamiento sin disolvente asistido por microondas (SFME) disminuye un 65% la obtención de este

compuesto fenólico. El pretratamiento asistido por microondas presurizado y con disolvente (MAE.P) produce una mejora en torno al 9%. Algunos autores afirmaban que mediante un tratamiento a alta presión y temperatura utilizando como disolvente etanol/agua (50:50, v/v), en el alperujo no se encontraba hidroxitirosol (3), queda demostrado tras este estudio la extracción de hidroxitirosol tanto en una extracción convencional sólido-líquido con y sin pretratamiento MW.

Tanto en la extracción CONV y MAE.P, no se produce un aumento significativo en la cantidad de hidroxitirosol extraído tras la primera muestra, a diferencia de lo que se indica en la bibliografía, donde la extracción convencional de estos compuestos requiere mucho más tiempo. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo parecen indicar lo contrario. Esto hace sospechar que el alperujo suministrado se encontraba en mal estado y por ello no se obtienen resultados satisfactorios.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Los procedimientos experimentales de extracción convencionales sólido-líquido y con pretratamiento MAE han tenido baja repetitividad, lo que da una idea de la heterogeneidad de la muestra de alperujo. Sumado a que las muestras analizadas se encontraban parcialmente extraídas, (ya que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas en las primeras etapas y las finales), se puede concluir que el alperujo suministrado se encontraba en malas condiciones.

La optimización de la metodología experimental de extracción desarrollada en este trabajo, permitirá que realizar experimentaciones con alperujo de futuras campañas. Debido a que la materia prima de estudio únicamente se encuentra disponible en fechas de campaña (noviembre), serán necesarios estudios con muestras representativas, para posteriormente compararlos con los del alperujo congelado.

A pesar del deficiente estado de la materia prima, se han podido obtener conclusiones cualitativas, en relación al rendimiento y riqueza de las extracciones realizadas y a la caracterización de hidroxitirosol.

Como consecuencia del análisis de los resultados obtenidos, en relación al contenido de polifenoles totales, la realización de pretratamientos MAE, mejoran el rendimiento de extracción y la riqueza de polifenoles, ya que aceleran el proceso de extracción en comparación con una extracción convencional, permitiendo obtener un rendimiento y riqueza elevados tras 15 minutos de experimentación, tiempo muy inferior en comparación a la extracción convencional.

La extracción de hidroxitirosol se favorece con la adición de un pretratamiento MAE.P a la extracción convencional sólido-líquido, tras el proceso de extracción completo (180 minutos) obtiene una concentración de hidroxitirosol de 25 mg HT/g extr.seco. En cambio, si se realiza una extracción con pretratamiento SFME, se produce una disminución de la extracción de este compuesto en un 70%, debido a la combinación de las altas temperaturas y la ausencia de disolvente en el pretratamiento.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Frankel E, Bakhouché A, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2013 Jun 5;61(22):5179–88. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf400806z>
2. Ministerio de Agricultura y Pesca. Alimentación y Medio Ambiente. (2017). Avance 2016. Anuario de estadística, Available from: <http://www.mapama.gob.es/>
3. Paini M, Aliakbarian B, Casazza AA, Lagazzo A, Botter R, Perego P. Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: A study of operative parameters. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2015;62(1):177–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.022>
4. Lesage-Meessen L, Navarro D, Maunier S, Sigoillot J. C, Lorquin J, Delattre M, Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem*. 2001;75(4):501–7.
5. Suárez M, Romero M.P, Ramo T, Macià A, Motilva M.J. Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *J Agric Food Chem*. 2009;57(4):1463–72.
6. Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillén R, Jiménez A. Production in Large Quantities of Highly Purified Hydroxytyrosol from Liquid–Solid Waste of Two-Phase Olive Oil Processing or “Alperujo.” *J Agric Food Chem* [Internet]. 2002 Nov 6;50(23):6804–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12405779>
7. Aliakbarian B, Casazza A.A, Perego P. Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor. *Food Chem* [Internet]. 2011 Oct;128(3):704–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.092>
8. Pérez-Serradilla J.A, Japón-Luján R, Luque de Castro M.D. Simultaneous microwave-assisted solid-liquid extraction of polar and nonpolar compounds from alperujo. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2007 Oct;602(1):82–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267007015140>
9. Sólyom K, Solá R, Cocero MJ, Mato R.B. Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food Chem* [Internet]. 2014 Sep;159(March):361–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.021>
10. Poejo J, Matias A.A, Duarte C.M, Álvarez A, Mato R. B. Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness. Effect on antioxidant bioactivity. :1–32.
11. Usaquen S. M. Aprovechamiento y valorización del alperujo tratado térmicamente como: fertilizante biológico y fuente de hidroxitirosol. Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
12. Roig A, Cayuela M.L, Sánchez-Monedero M.A. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manag* [Internet]. 2006 Jan;26(9):960–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X05002242>
13. Corpás-Iglesias F, Martínez-García T, Iglesia-Godino F. Residuos y subproductos.

- Oportunidad de negocio. Ejemplo de extracción del aceite de oliva en Andalucía (España). Universidad de Jaén. 2015.
14. Ministerio del Medio Ambiente. (2000). Producción de aceite de oliva. España. 2017. Available from: <http://www.mapama.gob.es//>
 15. García-Ortíz C, Fernández-Hernández A. Resultados de los ensayos de efecto de la aplicación de compost en el estado nutritivo de las parcelas de olivar. Córdoba.
 16. Albuquerque JA, Fuente C De, Bernal MP. Improvement of soil quality after “ alperujo ” compost application to two contaminated soils characterised by differing heavy metal solubility. *J Environ Manage* [Internet]. 2011;92(3):733–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.018>
 17. Oliveras López MJ. Calidad del aceite de oliva virgen extra. Antioxidantes y función biológica. Departamento de Nutrición y Bromatología. 2005.
 18. Albuquerque J, González D, García D, Cegarra J. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour Technol* [Internet]. 2004 Jan;91(2):195–200. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852403001779>
 19. Martínez F, Moyano MJ, Alba J, Ruiz MA, Hidalgo F, Heredia FJ. Método rápido de obtención de aceite de oliva virgen para determinación de acidez. *Grasas y Aceites* [Internet]. 1999 Apr 30;50(2):122–6. Available from: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/21968/1/657.pdf>
 20. Rinco B. Kinetic modelling of the hydrolysis , acidogenic and methanogenic steps in the anaerobic digestion of two-phase olive pomace (TPOP). 2005;40:1841–7.
 21. Raposo F, Borja R, Sánchez E, Martín M., Martín A. Inhibition kinetics of overall substrate and phenolics removals during the anaerobic digestion of two-phase olive mill effluents (TPOME) in suspended and immobilized cell reactors. *Process Biochem* [Internet]. 2003 Dec;39(4):425–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959203000955>
 22. Garrido Hoyos S.E, Martínez Nieto L, Camacho Rubio F, Ramos Cormenzana A. Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*. *Process Biochem* [Internet]. 2002 May;37(10):1169–76. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959201003326>
 23. Karapinar M, Worgan J.T. Bioprotein production from the waste products of olive oil extraction. *J Chem Technol Biotechnol* [Internet]. 2008 Apr 16;33(3):185–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.280330308>
 24. Montané D. High-temperature dilute-acid hydrolysis of olive stones for furfural production. *Biomass and Bioenergy* [Internet]. 2002 Apr;22(4):295–304. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953402000077>
 25. Debiasi Alberton M. Obtención de agentes antioxidantes a partir del alperujo para uso en la industria alimentaria . 2012.
 26. Rugolo M, Levin L, Lechner B.E. Flammulina velutipes: An option for “alperujo” use. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2016;(xx):6–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2015.12.001>
 27. Haagen F, Skiadas I V., Gavala HN, Ahring B.K. Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. *Biomass and Bioenergy* [Internet]. 2009 Nov;33(11):1643–51. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.08.006>
28. Borja R, Rincón B, Raposo F, Alba J, Martín A. A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature. *Process Biochem* [Internet]. 2002 Dec;38(5):733–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959202002029>
 29. Fiestas Ros de Ursinos J.A, Borja Padilla R. Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites* [Internet]. 1992 Apr 30;43(2):101–6. Available from: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1182/1188>
 30. Tortosa G, Antonio J, Ait-baddi G, Cegarra J. The production of commercial organic amendments and fertilisers by composting of two-phase olive mill waste (“ alperujo ”). *J Clean Prod* [Internet]. 2012;26:48–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.12.008>
 31. Sampedro I, Romero C, Ocampo JA, Brenes M, García I. Removal of Monomeric Phenols in Dry Mill Olive Residue by Saprobic Fungi. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2004 Jul;52(14):4487–92. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0400563>
 32. Morillo A, Granada G, Trabajo LOSDDEL, Cormenzana AR, Monteoliva M. Biorremediación del alpeorujo : estudio de la microbiota asociada y producción del exopolisacárido jamilano. Universidad de Granada; 2007.
 33. Cayuela M antoni., Sánchez-Monedero MA, Roig A. Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochem* [Internet]. 2006 Mar;41(3):616–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511305003442>
 34. Suárez. Obtención de extractos fenólicos a partir de subproductos de la oliva y aplicación en el desarrollo de un aceite de oliva enriquecido. Thesis. España. 2010. 397 p.
 35. García-Suarez M. Gestión de productos derivados: Obtención de compuestos beneficiosos para la salud. Thesis. España. 2013.
 36. Sannino F, De Martino A, Capasso R, El Hadrami I. Valorisation of organic matter in olive mill wastewaters: Recovery of highly pure hydroxytyrosol. *J Geochemical Explor* [Internet]. 2013;129:34–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.009>
 37. Felizón B, Fernández-Bolaños J, Heredia A, Guillén R. Steam-explosion pretreatment of olive cake. *J Am Oil Chem Soc* [Internet]. 2000 Jan;77(1):15–22. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11746-000-0003-y>
 38. Chavagnat AG. Diseño De Una Planta Industrial Para La Separación Y Concentración De Polifenoles a Partir De Alpechín, Utilizando Para Ello Técnicas No Convencionales De Separación Por Membranas. 2014;
 39. Visioli F, Bogani P, Grande S, Galli C. Olive oil and oxidative stress. *Grasas y Aceites* [Internet]. 2004 Mar 30;55(1):66–75. Available from: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/148/148>
 40. Pabán M .G. Extracción de Hidroxitirosol de alperujo de almazaras. Tesis doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. España; 2015.
 41. Manchón-Díez N. Métodos avanzados para el análisis, conservación y extracción de

- compuestos fenólicos en alimentos. Universidad de Valladolid; 2015.
42. Cioffi G, Sabina M, Caprariis P De, Braca A, Severino L, Tommasi N De. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania , Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem* [Internet]. 2010;121(1):105–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.013>
 43. Guntero V, Longo M, Ciparicci S, Martini R, Andreatta A. Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. Asociación Argentina de Ingenieros Quimicos. 2015.
 44. Romero C, Brenes M, Yousfi K, García P, García A, Garrido A. Effect of Cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2004 Feb 11;52(3):479–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759136>
 45. Wei-bao K, Yang L, Wan-ming B, Xiao-hui X, Ji Z, Li-zhen LU. Microwave Assisted Extraction of Ployphenols from Olive Processing Pomace Microwave Assisted Extraction of Ployphenols from Olive Processing ... 2016;2008–9.
 46. García E, Segovia F. Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación. Vol. 1, Universidad Pontificia de Valencia. 2012.
 47. Waterhouse A. Waterhouse Lab. Solutions. 1977;4–6.
 48. R. Julkunen-Tiito. Phenolic constituents in theleaves of Nothern willows: Methods for theanalysis of certain phenolics. *J ofAgricultural Food Chem*. 1985;33:213–7.
 49. Brenes M, García A, García P, Rios JJ, Garrido A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1999 Sep;47(9):3535–40. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf990009o>
 50. Castro MDL De. Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis – diode array detection Application to the characterisation of alperujo after ultrasound-assisted extraction. 2004;1045:239–46.
 51. Obied HK, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K, Stockmann R. Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2005 Feb;53(4):823–37. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf048569x>
 52. Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of Procyanidins in Cocoa (Theobroma cacao) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1999 Feb;47(2):490–6. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf980760h>
 53. Rincón B, Rodríguez-gutiérrez G, Bujalance L, Fernández-bola J, Borja R. Influence of a steam-explosion pre-treatment on the methane yield and kinetics of anaerobic digestion of two-phase olive mil solid waste or alperujo. 2016;2:361–9.
 54. Ryan D, Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Lavee S. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Sci Hortic (Amsterdam)* [Internet]. 2002 Jan;92(2):147–76. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423801002874>
 55. Soysal Y, Ayhan Z, Eştürk O, Arıkan MF. Intermittent microwave–convective drying of red pepper: Drying kinetics, physical (colour and texture) and sensory quality. *Biosyst Eng* [Internet]. 2009 Aug;103(4):455–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1537511009001809>

ABREVIATURAS

HPHT	High Pressure-High Temperature/ Alta presión- Alta temperatura
MAE	Microwave Assisted Extraction / Extracción Asistida por Microondas
SPE	Solid Phase Extraction/ Extracción en fase sólida
MW	Microondas
DMSO	Dimetilsulfóxido
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
CONV	Convencional
SFME	Extracción convencional con pretratamiento asistido por microondas sin disolvente
MAE.P	Extracción convencional con pretratamiento asistido por microondas presurizado
UV/VIS	Ultravioleta/Visible
RT	Tiempo de retención
S:L	Relación Sólido-Líquido
HT	Hidroxitirosol
OLEO	Oleuropeína
GAE	Ácido gálico equivalente

SÍMBOLOS

Símbolos	Descripción	Unidades
p/p	Porcentaje en peso	%
p/v	Porcentaje en peso-volumen	%
v/v	Porcentaje en volumen	%
V_T	Volumen total del recipiente	ml
V_a	Volumen de alperujo	ml
V_d°	Volumen de disolvente inicial	ml
V_d	Volumen de disolvente final	ml
V_n°	Volumen de nitrógeno inicial	ml
V_n	Volumen de nitrógeno final	ml
V_{de}	Volumen de disolvente evaporado	ml
P°	Presión de carga inicial de nitrógeno	atm
T°	Temperatura inicial	K
P	Presión final	bar
T	Temperatura final	°C
n_n°	Moles iniciales de nitrógeno	mol
n_{de}	Moles de disolvente evaporado	mol
MW_d	Masa molecular del disolvente	g/mol
P_d	Presión de vapor del disolvente	atm
Y_d	Fración molar del disolvente en el vapor	
V_e	Volumen de disolvente líquido evaporado	ml
V_{calc}	Volumen calculado	ml
H	Humedad	%
$Vial_{+MH}$	Peso del vial con muestra húmeda	gr
$Vial_{+MS}$	Peso del vial con muestra seca	gr
$Vial_s$	Peso vial vacío	gr
RS	Residuo Seco	mg extracto/L extracto húmedo
η	Rendimiento de extracción	mg GAE/g alperujo seco
C	Concentración	mg/L
$WL765$	Absorbancia medida a 765 nm	nm

Símbolos	Descripción	Unidades
$C_{\text{Hidroxitirosol}}$	Concentración de hidroxitirosol	<i>ppm</i>
$C_{\text{Oleuropeína}}$	Concentración de oleuropeína	<i>ppm</i>
A	Área del pico cromatográfico	<i>microV*s</i>
R^2	Coefficiente de correlación	
t	Tiempo	<i>minutos</i>
C_{var}	Coefficiente de variación	<i>%</i>
C_{teor}	Concentración teórica	<i>mg/g</i>
C_0	Concentración inicial	<i>mg/g</i>
k	Constante de velocidad	<i>min⁻¹</i>
C_{exp}	Concentración experimental	<i>mg/g</i>
N	Número de muestras	

ANEXOS
