



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

---

**Universidad de Valladolid**

## GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

### TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Cinéticas de extracción de polifenoles en la extracción asistida con  
microondas de alperujo**

Autor: Jaime Santiuste Martínez

Tutores: Rafael B. Mato Chaín

Ana Álvarez Martín

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Medio Ambiente

Valladolid a 18 de junio de 2018



## RESUMEN/ABSTRACT

### RESUMEN

El alperujo es un subproducto de la aceituna con escasas aplicaciones. Sin embargo, cuenta con un elevado contenido en polifenoles que pueden ser aprovechados. La aplicación de microondas logra incrementar la extracción de estos compuestos bioactivos. Con este estudio se pretende desarrollar un pretratamiento con microondas con el que se obtengan elevados rendimientos de extracción, facilitando el escalado posterior del proceso al reducir el tiempo de aplicación de las microondas. El pretratamiento logra incrementar el rendimiento de extracción hasta un 65% en las condiciones estudiadas. El aumento en la velocidad de extracción es superior al 400%, reduciendo el tiempo necesario para la extracción. Los principales compuestos polifenólicos presentan rendimientos de extracción superiores con el pretratamiento, alcanzando para el hidroxitirosol rendimientos de  $75\text{mg}_{\text{HT}}/\text{g}_{\text{DM}}$ . La aplicación de las microondas directamente sobre el alperujo, sin disolvente añadido, ha demostrado ser el pretratamiento más efectivo, lo cual facilita el escalado del proceso de extracción.

### Palabras clave

Pretratamiento con Microondas, Polifenoles, Rendimiento de Extracción, Alperujo, HPLC



## ABSTRACT

Olive pomace is a by-product with few applications. However, its high polyphenolic content could rise its value. Microwave application promotes an increase in bioactive compounds extraction. The aim of this study is to develop a microwave pretreatment to increase extraction yields, making it easier to scale-up the process by reducing the microwave-application time. Increases up to 65% in the extraction yield are achieved, within the studied conditions. The rise achieved in the extraction kinetics is greater than 400%, therefore, the extraction time is reduced. The extraction yield of the main polyphenolic compounds grows due to the pretreatment, achieving 75mg<sub>HT</sub>/g<sub>DM</sub> for hydroxytyrosol. Direct microwave application to the pomace, without added solvent, has proved to be the most effective method, which facilitates the process scale-up.

## Keywords

Microwave Pretreatment, Polyphenols, Extraction Yield, Olive Pomace, HPLC



## ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT .....	3
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	15
1.1. INTRODUCCIÓN .....	15
1.1.1. ¿POR QUÉ ES IMPORTANTE? .....	15
1.1.2. APLICACIONES .....	18
1.1.3. ¿POR QUÉ BUSCAR POLIFENOLES? ¿Y EN EL ALPERUJO?.....	21
1.1.4. PROBLEMAS A RESOLVER .....	24
1.1.5. TRABAJO PREVIO EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES .....	26
1.1.6. ¿POR QUÉ ES NOVEDOSO?.....	30
1.2. OBJETIVOS .....	35
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
2.1. EQUIPOS Y REACTIVOS.....	39
2.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN .....	41
2.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	45
2.4. DISEÑO DE EXPERIMENTOS .....	55
2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	58
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	63
3.1. CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN .....	63
3.2. FLAVONOIDES.....	80
3.3. ANÁLISIS COMPUESTOS FENÓLICOS. HPLC .....	82
4. CONCLUSIONES .....	93
BIBLIOGRAFÍA.....	99
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	109

ANEXO 1. PROCEDIMIENTOS .....	113
ANEXO 2. RESULTADOS RENDIMIENTO Y RIQUEZA.....	119
ANEXO 3. RESULTADOS ANÁLISIS FLAVONOIDES .....	123
ANEXO 4. RESULTADOS HPLC .....	124

## FIGURAS

Figura 1. Estructura de los principales compuestos polifenólicos en el aceite de oliva <sup>6</sup>	22
Figura 2. Recta de calibrado TPC .....	47
Figura 3. Recta de calibrado TF .....	48
Figura 4. Gradiente empleado .....	49
Figura 5. Recta de calibrado HT .....	50
Figura 6. Recta de calibrado T.....	51
Figura 7. Recta de calibrado OLE .....	52
Figura 8. Cinética de extracción CE 02 .....	64
Figura 9. Cinética de extracción SME 02 .....	64
Figura 10. Efectos principales CF .....	68
Figura 11. Interacciones binarias CF.....	68
Figura 12. Efectos principales Uo .....	71
Figura 13. Interacciones binarias Uo .....	71
Figura 14. Temperatura extracción con microondas.....	74
Figura 15. Rendimiento de extracción de flavonoides CE 04.....	80
Figura 16. Rendimiento de extracción de flavonoides y TPC SFME 03.....	80
Figura 17. Cromatograma CE 18.5.....	84
Figura 18. Cromatograma SFME 1.5.....	85
Figura 19. Procedimiento extracción convencional.....	114
Figura 20. Procedimiento extracción SFME .....	115
Figura 21. Procedimiento OWME .....	116
Figura 22. Procedimiento extracción SME .....	117
Figura 23. Procedimiento extracción MAE presurizado .....	118

## TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles .....	21
Tabla 2. Caracterización del alperujo .....	39
Tabla 3. Patrones HT.....	50
Tabla 4. Resultados patrones T.....	51
Tabla 5. Patrones OLE.....	52
Tabla 6. Experimentos extracción convencional.....	55
Tabla 7. Tabla ANOVA análisis Cf .....	67
Tabla 8. Tabla ANOVA análisis Uo.....	70
Tabla 9. Resultados rendimiento final de extracción MAE.....	75
Tabla 10. Resultados velocidad inicial de extracción MAE.....	76
Tabla 11. Tiempos de retención HPLC.....	83
Tabla 12. Rendimientos de extracción óptimos.....	88
Tabla 13. Resultados extracción convencional .....	120
Tabla 14. Resultados extracción MAE .....	121
Tabla 15. Resultados extracción flavonoides .....	123
Tabla 16. Resultados HPLC .....	124

## ECUACIONES

[1] .....	47
[2] .....	48
[3] .....	50
[4] .....	51
[5] .....	52
[6] .....	52
[7] .....	54
[8] .....	54
[7] .....	58
[10] .....	63
[11] .....	63
[12] .....	63
[13] .....	65
[14] .....	75
[15] .....	77
[16] .....	83



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



### 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

##### 1.1.1. ¿POR QUÉ ES IMPORTANTE?

El principal propósito de esta investigación es desarrollar un método sostenible para extraer compuestos bioactivos de interés a partir del residuo de aceituna que se genera durante la obtención de aceite, conocido como alperujo. Con el desarrollo de este método se logra, por un lado, obtener diversos polifenoles cuyas aplicaciones se detallan a continuación, y, por otro lado, revalorizar el residuo de aceituna.

En 2016 en España la producción de aceitunas ha sido de 6.6 millones de toneladas, un 10% más que en 2015. En Europa la producción durante 2016 fue de 11.8 millones de toneladas, con un incremento en torno al 5% respecto al año anterior<sup>1</sup>. Estos datos indican que, en Europa, y en especial en España, los cultivos de aceitunas se incrementan cada año, y que suponen una parte importante de la agricultura del país, por lo que revalorizar los residuos generados por el principal uso de estas cosechas, la producción de aceite, supondría una gran mejora. El alperujo supone un 73% del peso de las aceitunas procesadas para obtener aceite<sup>2</sup>, pudiendo ser incluso del 80%<sup>3</sup>. En España se generan en torno a 4 millones de toneladas de alperujo<sup>4</sup>. El alperujo es un residuo que se genera en los molinos de dos fases, empleados mayoritariamente en España y otros países frente a los molinos de tres fases por su mayor rendimiento<sup>5</sup>.

El orujo de aceituna supone muchos problemas de no ser tratado, entre los que se encuentran los siguientes<sup>3</sup>: elevado grado de contaminación orgánica, fuerte olor, pH ligeramente ácido (entre 3 y 5.9) y elevada cantidad de sólidos. Además, presenta un elevado contenido de polifenoles, los cuales presentan un gran interés, que no son fácilmente biodegradables y son tóxicos para muchos microorganismos. Por estas razones, no es posible depositar el alperujo directamente sobre el suelo de manera no controlada, ya que causaría eutrofización, debido al gran contenido de fósforo, y fitotoxicidad, dañando algunos cultivos. Este residuo contamina 100-200 veces más que los residuos domésticos, por lo que no debe tratarse junto con este tipo de residuos<sup>3</sup>. Al extraer los polifenoles, principales causantes de la toxicidad del alperujo, se logra reducir el impacto ambiental y reducir los costes de tratamiento del residuo. El hecho de que la

producción de aceite se realice durante únicamente 4 meses al año o menos, hace que durante estos meses sea necesario almacenar el alperujo para que sea tratado durante el resto del año.

El aceite de oliva, extraído mediante un molino de dos fases, cuenta únicamente con un 2% de los polifenoles inicialmente presentes en las aceitunas, mientras que el resto de los polifenoles pasan al alperujo<sup>4</sup>. Por esta razón se busca extraer estos compuestos, bien para añadirlos nuevamente al aceite, logrando obtener un aceite con un mayor contenido de compuestos bioactivos<sup>4</sup>, o bien para otros compuestos cosméticos, farmacéuticos, etc. que se mostrarán a continuación. Además, estos compuestos bioactivos han sido relacionados con efectos antioxidantes y antiinflamatorios, así como antibacterianos<sup>5</sup>. Estos compuestos fenólicos han sido relacionados con una disminución del riesgo de padecer cáncer<sup>6</sup> y con una baja mortalidad por CHD (Coronary Heart Disease, enfermedad coronaria) por la capacidad antioxidante que induce al plasma, así como la disminución del serum TXB<sub>2</sub><sup>7</sup>. Debido a la capacidad antioxidante de los polifenoles, estos compuestos presentan un gran interés, puesto que las especies reactivas del oxígeno han sido consideradas como una causa de enfermedades en el ser humano<sup>8</sup>.

Con este trabajo se pretende demostrar que la extracción de polifenoles del alperujo se puede potenciar por medio de un pretratamiento con microondas sobre la materia prima. Para extraer estos compuestos es necesario calentar el alperujo y el disolvente, para lo que se pueden emplear diversos métodos: calefacción convencional, microondas, horno, etc. Con este pretratamiento se busca degradar las paredes celulares del alperujo, de modo que los polifenoles que se encuentran dentro sean liberados al disolvente<sup>9</sup>. Como disolvente, la mezcla etanol/agua ha sido considerada la más efectiva para extraer estos compuestos de la materia orgánica, frente a otros como son el metanol, acetato de etilo, etc.<sup>10</sup>. El tratamiento con microondas se ve beneficiado por este disolvente, ya que, debido a sus buenas propiedades dieléctricas, convierte fácilmente la energía en calor<sup>11</sup>. El calentamiento con microondas presenta una gran ventaja frente al calentamiento convencional, y es que debido a que la energía emitida es absorbida tanto por el disolvente como por el alperujo, el calor se genera en el interior, en lugar de tener que emplearse calor para calentar las paredes del recipiente<sup>12</sup>. De este modo la temperatura es más homogénea en todo el medio de extracción, evitando un sobrecalentamiento

durante un tiempo prolongado del material que se encuentra junto a las paredes, pudiendo provocar la degradación de estos compuestos de interés<sup>13</sup>.

En trabajos previos<sup>9,14,15</sup> se realizó la extracción con la aplicación de microondas durante toda la extracción, lo cual supone un gasto energético elevado, que es necesario reducir para obtener un método menos costoso. El uso de microondas durante todo el proceso no es válido para fines industriales, sino que únicamente a escala de analítica en el laboratorio. De probarse que el pretratamiento es efectivo, supondría un proceso más sostenible, con un menor consumo energético, ya que el tiempo de aplicación de las microondas es mucho menor. Un pretratamiento dura unos pocos minutos, mientras que la extracción puede durar hasta 24 horas, aunque en esta investigación se realizaron extracciones de hasta 2 horas.

Otra ventaja de usar un pretratamiento con microondas es que el escalado es más sencillo. Las microondas permitidas para su uso industrial pueden ser de dos frecuencias, 915 MHz y 2450 MHz, para no causar interferencias con las ondas de comunicación<sup>12</sup>. Normalmente, a nivel industrial, se emplean las de frecuencia 2.45 GHz, que presentan una longitud de penetración que es función de las propiedades del medio, disolvente y materia prima<sup>16</sup>, que no es lo suficientemente grande como para poder escalar la extracción para su uso industrial. Esto implicaría que la extracción, de usar microondas durante todo el proceso, no podría realizarse en grandes recipientes, ya que solo afectaría a las capas más externas, mientras que aquellas que se encuentran lo suficientemente alejadas de la fuente de microondas no se verían afectadas. No obstante, de probarse que el pretratamiento es efectivo, supondría que se podría escalar el proceso, usando un pretratamiento en continuo con microondas.

Desde el punto de vista económico, la extracción de polifenoles puede resultar viable, debido a que este tipo de compuestos, de no ser obtenidos de productos naturales, son sintetizados por métodos químicos, encareciendo el producto<sup>17</sup>. El alperujo, de no ser revalorizado, no solo implica no sacar beneficio de su explotación, sino que además debe ser tratado antes de ser depositado. En algunos casos se usa como fertilizante por su alto contenido en nutrientes<sup>18</sup>, pero como se detalla anteriormente también causa problemas de toxicidad y eutrofización, por lo que es necesario un tratamiento previo.

### 1.1.2. APLICACIONES

Como se ha indicado anteriormente, los polifenoles son sustancias bioactivas que presenta numerosos beneficios para la salud de las personas. Los polifenoles son un grupo amplio de compuestos químicos que comparten un ciclo aromático unido a un grupo hidroxilo. En función de la posición de los grupos hidroxilo, así como de los sustituyentes del anillo aromático, así será su actividad biológica<sup>19</sup>. Las aplicaciones principales de los polifenoles se centran en tres categorías: farmacéutica, nutricional y cosmética.

#### **Farmacéutica**

Debido a la estructura química de estos compuestos, presentan una gran variedad de aplicaciones farmacológicas en función de los sustituyentes del anillo aromático y de los grupos hidroxilo que contienen. A continuación, se detallan algunos de los beneficios probados de estos compuestos bioactivos.

Los polifenoles, entre los que destaca el hidroxitirosol, son especies antioxidantes de origen natural. Gracias a estas propiedades antioxidantes, se ha demostrado que atacan a las especies reactivas del oxígeno (ROS), reduciendo y previniendo el daño que estas especies causan a las células y en particular al ADN<sup>20</sup>. Las ROS aparecen cuando las células, en este caso se estudiaron las células de melanoma humanas<sup>20</sup>, están expuestas a la radiación UV, mientras que el hidroxitirosol actúa atrapando estas especies y reduciendo su capacidad hasta en un 40%.

El estudio del efecto de los polifenoles en la reducción del CHD (coronary heart disease) revelan que favorecen la reducción de las posibilidades de sufrirla, gracias a una mejora de las condiciones cardiovasculares, favoreciendo la circulación<sup>7,21</sup>. No obstante, no se ha demostrado que induzcan un efecto antioxidante a la LDL (lipoproteína de baja densidad). Para que este efecto sobre sea significativo, la cantidad total de polifenoles absorbidos debe ser mayor que la que proporciona una dieta<sup>21</sup>.

Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva han demostrado poseer capacidad antiinflamatoria, lo cual los convierte en compuestos valiosos para prevenir patologías como el cáncer, la artritis o enfermedades neurodegenerativas, las cuales

están causadas por la inflamación crónica<sup>22</sup>. Se ha estudiado el efecto que tienen estos compuestos sobre indicadores de la inflamación, dando resultados positivos.

El hidroxitirosol y la oleuperina, dos de los compuestos fenólicos con mayor presencia en la aceituna y sus derivados, presentan actividad antimicrobiana ante diversas cadenas de bacterias, en especial frente a bacterias ATTC<sup>6</sup>.

Para poder obtener efectos significativos de estos polifenoles y poder usarlos como fármacos, es necesario obtener una concentración significativa de los mismos, por lo que es necesario purificarlos<sup>22,23</sup>. Una forma de obtener diversas fracciones de polifenoles diferenciadas es mediante una separación cromatográfica en fase sólida invertida, logrando obtener hidroxitirosol purificado<sup>8</sup>. Otra barrera para el desarrollo de estos posibles fármacos es la biodisponibilidad de estos compuestos para el cuerpo humano<sup>23</sup>. Cada compuesto puede ser absorbido en una parte distinta del cuerpo, o en algunos casos no ser absorbida.

### **Nutricional**

Según la regulación de la Unión Europea 432/2012, para que el aceite de oliva presente beneficios sobre la salud, este debe contener al menos 250 mg de hidroxitirosol y de sus polifenoles derivados por cada kg de aceite<sup>24</sup>. El aceite de oliva contiene una concentración de polifenoles de menos de 300 mg/kg, por lo que se podría incrementar el número de polifenoles añadiendo aquellos extraídos del alperujo, llegando a concentraciones de 900 mg/kg<sup>25</sup>. Con esto se logra obtener un aceite con mayor contenido en antioxidantes que tiene efectos positivos, como son un descenso de la lipoproteína de baja densidad, LDL, así como beneficios en la función endotelial en personas con hipertensión, frente al aceite de oliva no enriquecido. De este modo, se podría reducir la ingesta de aceite, manteniendo sus efectos positivos, logrando así reducir la ingesta de lípidos.

La posibilidad de usar estos compuestos fenólicos como ingrediente o aditivo en alimentos debido a su capacidad antioxidante presenta un amplio abanico de ventajas<sup>4</sup>. En primer lugar, el uso de polifenoles naturales sustituiría el uso de otros antioxidantes sintéticos, entre los que destacan el butil hidroxitolueno (BHT), el butil hidroxianisol (BHA) y el terc-butil hidroquinona (TBHQ), que han mostrado efectos secundarios<sup>4,19</sup>. Por otro

lado, estos antioxidantes presentan un gran número de beneficios para la salud, que van desde efectos antiinflamatorios, hasta acciones quimioprotectivas contra el cáncer. Aquellos compuestos que mayor capacidad antioxidante muestran son el hidroxitirosol, la oleuperina y sus derivados, algunos flavonoides, etc.<sup>4,22</sup>. Un inconveniente del uso de estos polifenoles como aditivo en alimentos y bebidas, es el hecho de que estos compuestos bioactivos inducen un sabor amargo y astringente<sup>25</sup>.

### **Cosmética**

Los polifenoles han sido testados en productos cosméticos debido a algunas de sus propiedades, con buenos resultados. La adición de compuestos fenólicos extraídos de la aceituna a cremas da como buenos resultados, bien sea para blanquear la piel, reduciendo el contenido en melanina, como reduciendo la edad de la piel, disminuyendo las manchas y arrugas<sup>26</sup>. El uso de estos compuestos sustituye el procesado de otros productos, como la hidroquinona, prohibida en Estados Unidos, al ser calificada como droga.

Los polifenoles obtenidos del alperujo pueden emplearse en cremas solares, debido a la protección contra los rayos UV de algunos polifenoles, entre los que destacan los flavonoides<sup>27,28</sup>. De este modo, la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species) se ve reducida, disminuyendo el daño sobre el ADN causado por la radiación UV. Además, determinados polifenoles reducen la actividad de algunas enzimas (proteinasas) que favorecen la degradación de proteínas de la piel. Estas proteínas son fundamentalmente el colágeno y la elastina.

### **Otros**

Estudios recientes han demostrado que los polifenoles también pueden tener aplicaciones en biomateriales<sup>29</sup>. Algunos polifenoles presentan interés para la formación de uniones cruzadas en el colágeno, principal proteína del cuerpo humano. De este modo, se lograría mejorar las propiedades mecánicas de prótesis y otros dispositivos médicos, empleando materiales biológicamente compatibles. Los tejidos sobre los que se podría aplicar esta tecnología son en tejido óseo, sobre la dentina, en válvulas cardiovasculares, mostrando en este último caso beneficios para la microcirculación permitiendo la relajación de las paredes.

### 1.1.3. ¿POR QUÉ BUSCAR POLIFENOLES? ¿Y EN EL ALPERUJO?

Lo que se busca con la extracción del alperujo de aceituna es potenciar el contenido de polifenoles en el extracto. Para estos se analizan el contenido total de polifenoles (TPC), y se calcula el rendimiento de la extracción como la cantidad de polifenoles extraídos por cada gramo de alperujo, tomando como base la cantidad de alperujo seco, ya que es más representativo debido a la variación de la humedad en función de la procedencia de la materia prima. Una vez conocidos los polifenoles extraídos, se analizaron qué compuestos se pueden extraer, ya que, en función de la estructura de cada polifenol, éste presenta unas propiedades y unas aplicaciones.

Como se ha descrito anteriormente, los polifenoles son compuestos con varias aplicaciones y beneficios. Los polifenoles se clasifican de manera simplificada en flavonoides y no-flavonoides<sup>23</sup>. En la Tabla 1 se muestran los principales grupos de polifenoles. La estructura de los principales compuestos polifenólicos en el aceite de oliva se muestran en la Figura 1. Estos compuestos se encuentran también en el alperujo, ya que tienen la misma procedencia.

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles

Categoría		Compuestos	
Flavonoides	Antocianinas		
	Flavonoles		
	Flavones	Quercitina	
	Flavanones	Leutolina	
	Isoflavonoides	Isoflavones	
		Isoflavanes	
	Flavanoles	Catequina	
No Flavonoides	Ácidos fenólicos	Derivados del ácido cinámico	Ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico
		Derivados del ácido benzoico	Ácido gálico, ácido vanílico
	Lignanos		
	Estilbenos	Resveratrol	

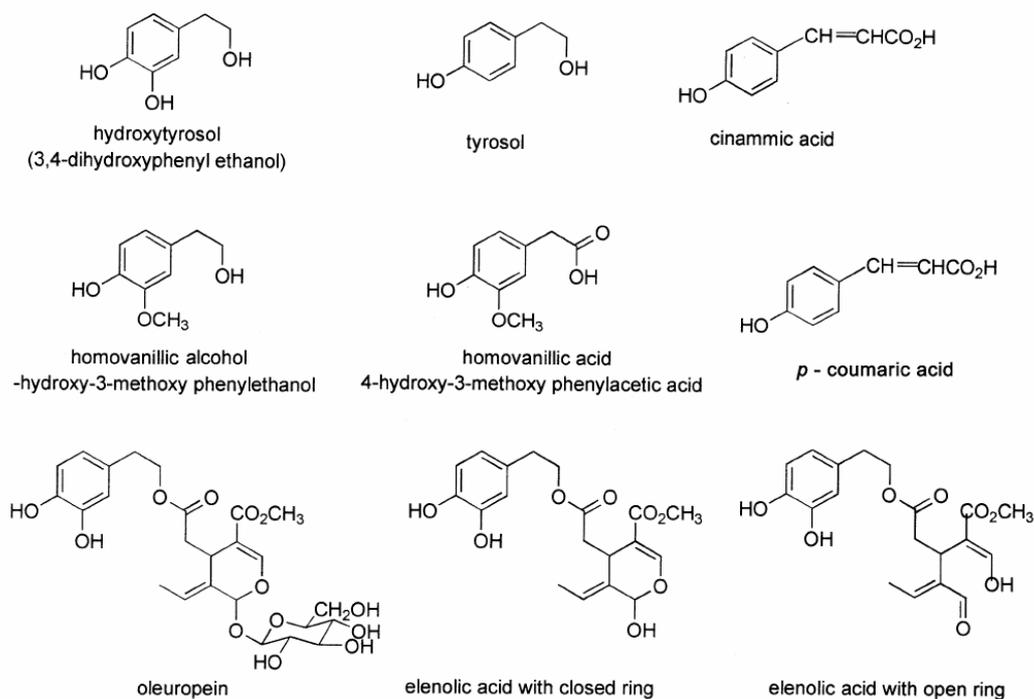


Figura 1. Estructura de los principales compuestos polifenólicos en el aceite de oliva<sup>6</sup>

Los polifenoles con mayor número de aplicaciones y que presentan más beneficios encontrados hasta la fecha son el hidroxitirosol, el ácido gálico y la oleuperina. Algunos compuestos pueden transformarse en otros polifenoles, como es el caso de la oleuperina, que bajo una incubación en medio ácido (ácido cítrico) se puede convertir en hidroxitirosol como se demuestra en la patente<sup>30</sup>. Los compuestos derivados de la aceituna contienen hidroxitirosol, oleuperina, tirosol y otros compuestos fenólicos, con numerosas aplicaciones.

Los polifenoles se encuentran en gran variedad de materias primas vegetales, entre las que destacan las uvas<sup>10,31–33</sup>, la linaza<sup>34</sup>, la ortiga<sup>35</sup>, el cardamomo<sup>36</sup> u otras como las manzanas, el té o el azafrán<sup>37</sup>. Los polifenoles son metabolitos secundarios que se forman en las plantas, especialmente en las partes de las mismas expuestas a la luz solar, como es el caso de las hojas, la piel, los tallos, etc.<sup>15</sup>. No todas las plantas presentan los mismos compuestos, ni las mismas cantidades de polifenoles. El principal interés que muestra el alperujo frente a otros compuestos, como los mencionados anteriormente, es su elevada producción, la falta de pretratamiento ya que se obtiene directamente como una mezcla húmeda, la presencia de polifenoles de gran interés como el hidroxitirosol y la oleuperina. Estos compuestos aparecen principalmente en partes externas, de modo que en los

huesos de aceituna que hay en el alperujo se encuentran pocos polifenoles<sup>38</sup>, lo cual tienen un impacto positivo que es el hecho de que no haya que romper la muestra, ahorrando energía que se consumiría en el pretratamiento.

Otros estudios se han centrado en la extracción de polifenoles de otros subproductos de la producción de aceite de oliva como son las hojas del olivo<sup>9,39,40</sup> o el agua residual de los molinos, empleando métodos similares. En el caso de las hojas de oliva, estas contienen más oleuperina, que se trata de su principal compuesto fenólico. No obstante, el principal problema de es la degradación que se produce a temperaturas mayores a 60°C<sup>39</sup>. En el caso del residuo que se genera en los molinos de tres fases, éste tiene un mayor contenido en humedad. Por esta razón, se requiere un pretratamiento, que puede ser una fase de secado, ósmosis inversa o filtrado<sup>41</sup>. No obstante, el alperujo presenta más ventajas frente a estas alternativas, ya que no es necesario ningún pretratamiento y además tienen mayor número de compuestos polifenólicos<sup>42</sup>.

Recientemente los estudios del alperujo se han potenciado, debido a su elevado contenido en polifenoles, la gran producción anual, sobre todo en los países del Mediterráneo y la facilidad de obtenerlo, ya que es un subproducto directo de la producción de aceite de oliva, sin necesidad de tratarlo. Los beneficios que presenta el aceite de oliva han hecho que se busquen las razones en algún compuesto que contiene, observándose que los polifenoles presentan algunas de estas ventajas y muchas otras. Además, únicamente el 2% de estos compuestos pasan al aceite, quedando el resto en el alperujo. Los polifenoles son compuestos polares, de modo que cuando se realiza la extracción del aceite de oliva, al mostrar mayor afinidad debido a su polaridad por el agua en lugar de la fase aceitosa, permanecen en el residuo, lo cual explica la gran concentración de polifenoles que presenta el alperujo.

El alperujo contiene gran variedad de polifenoles, encontrándose en mayor cantidad los siguientes: hidroxitirosol, tirosol, rutina, luteolina, ácido cumárico, ácido vinílico, ácido cafeico y los diversos glucósidos que estos compuestos forman<sup>8,43</sup>. Con los análisis de las extracciones llevadas a cabo se pretende encontrar estos compuestos, así como otros en menor concentración.

Con este trabajo se pretende analizar la extracción de polifenoles totales mediante extracción asistida por microondas, así como analizar en qué momento y bajo qué condiciones aparecen determinados compuestos. Para ello se realizaron otros dos análisis complementarios al TPC (Total Phenolic Content) que fueron el análisis de flavonoides totales y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). De este modo se conoció, cuantitativamente, qué compuestos están presentes en los extractos de los diversos experimentos, conociendo en qué modo se potencia la extracción de determinados compuestos, intentando lograr que estos compuestos sean aquellos de los que se conoce un mayor número de aplicaciones.

#### 1.1.4. PROBLEMAS A RESOLVER

Para lograr extraer los polifenoles es necesario emplear un disolvente que muestre afinidad por los polifenoles. Como disolventes se han estudiado acetato de etilo, metanol, etanol, acetona e isopropanol<sup>10</sup>. No obstante, el disolvente para extraer polifenoles que mejores resultados da es el etanol, siendo además un disolvente no tóxico, lo cual le hace más apropiado que otros como el metanol. El etanol se emplea mezclado con agua, ya que los compuestos fenólicos muestran afinidad por ambos compuestos polares, y así se reduce el consumo de etanol que tiene un coste mayor. Se pretende optimizar la concentración de la mezcla etanol/agua, determinado el rendimiento y qué compuestos muestran mayor afinidad por un disolvente u otro. Los datos optimizados se analizarán para comprobar la posible viabilidad económica, ya que cuanto mayor es la concentración de etanol, mayor es el coste en disolvente.

Los compuestos de interés se encuentran en su mayoría dentro del interior de las células, de modo que es necesario romper la pared celular para poder liberar estos compuestos. La resistencia de la pared celular es un problema a resolver, para lo cual se emplean microondas como método de liberar los polifenoles de la estructura celular, potenciando el rendimiento de extracción. La extracción se realiza en un baño termostático para poder extraer los polifenoles de manera más eficiente y aumentar así la solubilidad de los polifenoles en el disolvente. Con el pretratamiento con microondas se logra intensificar la extracción de los compuestos intracelulares. Se tomaron varias muestras en varios tiempos de extracción, siendo la primera en el tiempo cero para evaluar los polifenoles libres que no se encuentran en el interior de las células.

Otro inconveniente del alperujo es la elevada humedad que presenta, con valores cercanos al 70% de humedad en peso. El alperujo, al contener una elevada cantidad de agua, dificulta la extracción y la absorción de energía de las microondas por parte de la materia sólida. Esta humedad no puede ser eliminada de manera eficiente, ya que implicaría una etapa de secado en un horno, que no es viable debido al coste y a la posible degradación.

Otro problema a resolver de la extracción es el ratio sólido/líquido, ya que es un aspecto crítico de la misma. Cuando se aumenta la cantidad de líquido añadida para la extracción se han logrado mejores resultados, con respecto al rendimiento de extracción. No obstante, el aumento de la cantidad de disolvente implica un mayor coste, así como la generación de un residuo mayor con la extracción, ya que después de la extracción es necesario un proceso de purificación, separando los compuestos objetivo del disolvente, y separando luego las distintas fracciones de polifenoles<sup>8</sup>. Para alcanzar las condiciones óptimas de extracción, tanto ratio sólido/líquido, como composición del disolvente y temperatura, se empleó el método de superficie de respuesta, RSM (Response Surface Method). Con este procedimiento se busca obtener los valores que maximizan el rendimiento de extracción, observando las posibles interacciones entre las tres condiciones de operación.

Del pretratamiento con microondas surgen tres alternativas: realizarlo sin disolvente añadido, realizarlo añadiendo únicamente agua o realizarlo añadiendo todo el disolvente. Esta cuestión proviene del objetivo de adecuar el proceso a nivel industrial en un futuro. La posibilidad de realizarlo con la menor cantidad de disolvente implicaría grandes ventajas una vez realizado el escalado, debido a la consiguiente reducción tanto del tamaño de los equipos como del consumo energético asociado.

Los compuestos polifenólicos son susceptibles de degradarse, especialmente cuando están expuestos a temperaturas elevadas. La degradación térmica de estos compuestos de interés<sup>13</sup> se produce cuando son sometidos a elevadas temperaturas durante largos periodos de tiempo, por lo que la extracción se estudió a temperaturas moderadas, inferiores a 70°C. Con el pretratamiento con microondas se alcanzaron temperaturas superiores, pero durante cortos periodos de tiempo. Lo que se busca con la aplicación de este tipo de energía, en comparación con el empleo de un método de calentamiento

convencional, es una distribución más homogénea de la temperatura en toda la muestra, evitando que las partes pegadas a la superficie del recipiente se degraden con el objetivo de elevar la temperatura de la materia que se encuentra en el interior. Otro problema que surge de elevar la temperatura de la muestra durante largos periodos de tiempo es la aparición de compuestos no deseables, como los furfurales, por la pirolisis que se produciría.

Los polifenoles son compuestos antioxidantes, de modo que, si se encuentran en un medio oxidativo, estos se oxidan primero, protegiendo de esta manera al entorno. Tanto las muestras extraídas como la materia prima empleada son susceptibles de oxidarse en presencia de oxígeno. Para evitar la oxidación de los compuestos se aplicaron las siguientes medidas: atmósfera de nitrógeno y congelación. Durante las extracciones, y dado que se trabaja a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, se eliminó el aire de los matraces, una vez añadido el disolvente y el alperujo, introduciendo nitrógeno. De este modo las extracciones se llevaron a cabo en una atmósfera inerte evitando la oxidación de los compuestos objetivo. La muestra se conservó congelada, evitando así su oxidación. Antes de cada experimento se descongeló la materia prima para la extracción. Durante las extracciones, para parar la extracción y evitar la oxidación de los polifenoles, se guardaron las muestras tomadas en el congelador, evitando la posible degradación. Antes de congelar la materia prima se realizaron pruebas de extracción, comparando los resultados con los obtenidos de las extracciones sobre el alperujo descongelado, comprobando que la congelación no afecta a los polifenoles extraídos.

#### 1.1.5. TRABAJO PREVIO EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

##### Métodos de extracción de polifenoles

La extracción de los compuestos polifenólicos se ha llevado a cabo en la bibliografía por métodos variados: alta temperatura y alta presión, empleando ultrasonidos o microondas, etc. Lo que se busca con todos estos métodos es potenciar el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos de las diversas materias vegetales en las que se encuentran.

La extracción convencional de los compuestos fenólicos se divide entre las extracciones con disolvente y la extracción mediante métodos físicos. Los polifenoles se pueden

extraer mediante la filtración de la muestra, para separar los polifenoles por ósmosis inversa<sup>44,45</sup>. El método más empleado, ya que permite posteriormente el uso de tratamiento que incrementen el rendimiento de extracción, es la extracción con disolvente añadido. Dentro de los disolventes empleados, la extracción de polifenoles se ve favorecida por el uso de mezclas etanol/agua<sup>10</sup>. Previamente a la etapa de extracción se puede llevar a cabo un etapa de pretratamiento en la que se homogeniza la muestra o se elimina la humedad<sup>15</sup>. Esta etapa previa no es deseable, ya que supondría un encarecimiento del proceso de extracción.

La intensificación de la extracción mediante la aplicación de ultrasonidos a la muestra ha sido empleada para extraer compuestos fenólicos de diversas fuentes: hojas de olivo<sup>46</sup>, ortiga<sup>35</sup>, alperujo<sup>47</sup>, etc. Los ultrasonidos se aplican sobre la materia orgánica, a la que se ha añadido disolvente. De este modo se logra que los polifenoles difundan a la fase líquida. Una ventaja que presenta este método es que se puede emplear agua como disolvente en lugar de otros compuestos orgánicos que pueden presentar mayor impacto y coste<sup>47</sup>. Esta técnica se puede emplear junto con otros métodos de intensificación, como las microondas<sup>48</sup>.

La extracción de polifenoles en reactores de alta temperatura-alta presión (HTHP) ha sido desarrollada para el alperujo<sup>49</sup>. En este tipo de extracción se aplican elevadas temperaturas y presiones a la muestra, junto con el disolvente, de modo que la materia vegetal del alperujo se fraccione, liberando los compuestos al disolvente. Presenta elevados rendimientos de extracción, llegando un rendimiento máximo de 45 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DM</sub>, manteniendo la muestra durante 90 minutos a 180°C. Aunque los rendimientos de extracción sean elevados, los polifenoles son compuestos fácilmente degradables ante temperaturas elevadas, especialmente si están sometidos a estas condiciones durante elevados periodos de tiempo, afectando fundamentalmente a la capacidad antioxidante de dichos compuestos<sup>13,50</sup>.

Otras técnicas se han estudiado, como el caso de la extracción de polifenoles empleando como disolvente CO<sub>2</sub> supercrítico sobre alperujo<sup>39</sup>.

### Extracción de polifenoles con microondas

Dentro de los diferentes tipos de métodos de extracción cabe destacar aquellos en los que se emplearon microondas como método de intensificación de la extracción. La aplicación de microondas puede ser durante toda la extracción<sup>34,48,51,52</sup> o únicamente al principio<sup>53</sup>. Con la aplicación de un pretratamiento se pretende alcanzar rendimientos de extracción similares con un menor uso de las microondas, que supondría una reducción del consumo, así como de las necesidades de volumen una vez escalado el proceso de extracción. En las extracciones con microondas se emplean diversas materias vegetales como origen de los polifenoles, a las que se les añaden diversos tipos de disolventes, entre los que destaca el etanol/agua por sus propiedades dieléctricas, así como por su afinidad por los polifenoles. Dicho medio se introduce en un horno microondas en el que se le irradia energía, elevando la temperatura de la muestra. De este modo se logra incrementar la extracción de polifenoles de la materia inicial con respecto a la extracción convencional. En el caso de emplear las microondas como pretratamiento, la muestra se introduciría en el microondas durante el tiempo que dure el pretratamiento, para posteriormente continuar la extracción manteniendo el medio de extracción a temperatura constante.

Dentro de las extracciones con microondas, algunas emplean la técnica SFME (Solvent Free Microwave Extraction), en los que se calienta la muestra, recirculando el disolvente evaporado con un sistema de condensación<sup>36</sup>. Con este tipo de extracción se pretende potenciar la extracción sin añadir el disolvente, calentando la muestra y logrando que los compuestos se difundan a la humedad de la materia prima.

Dentro de los métodos de extracción hay dos métodos patentados, uno en el que se lleva a cabo aplicando dos métodos de intensificación, microondas y ultrasonidos<sup>48</sup> y otra en la que se realiza la extracción sin disolvente<sup>54</sup>. En la primera patente se añade etanol a la muestra y la mezcla se bombea en una cavidad en la que se aplica de manera simultánea ultrasonidos y microondas, de modo que los compuestos retenidos en la materia prima se difundan en el disolvente, recogándose los compuestos volátiles que se puedan evaporar por el calentamiento en un condensador. Posteriormente, la muestra extraída se separa del sólido agotado, analizándose la extracción. En el caso del sistema de extracción sin disolvente, la propia humedad de la materia prima a extraer, que, debido a su origen vegetal, tiene valores elevados, se recircula mediante la evaporación y

condensación en el horno microondas, logrando extraer los polifenoles. La fase líquida se separa posteriormente del sólido mediante centrifugación.

### Extracción de polifenoles con microondas del alperujo

La extracción de los polifenoles del alperujo con aplicación de microondas ha sido estudiada, analizando los compuestos que se logran extraer con este método de extracción, así como el aumento respecto a la extracción control que se realiza, empleando únicamente el disolvente<sup>14</sup>. En el estudio señalado, se emplean dos disolventes simultáneamente, que son inmiscibles, de modo que se logra extraer por un lado la fase lipídica con hexano y por otro lado los polifenoles con metanol/agua. Los disolventes se añaden al alperujo y se irradian con microondas. Se estudió el efecto de la relación de disolventes, el tiempo de tratamiento y la potencia de las microondas. Respecto al tiempo de tratamiento, la cinética de extracción resultó ajustarse a una cinética de primer orden. La extracción que se emplea como control para observar la diferencia entre ambos métodos consiste en la incubación de la muestra con el disolvente, logrando aumentar la extracción polifenoles empleando un menor tiempo de extracción. La extracción de todos los compuestos analizados se ve intensificada por este método, especialmente en el caso de la extracción de hidroxitirosol, un polifenol de gran interés por su capacidad antioxidante, así como por su biodisponibilidad<sup>21</sup>.

### Métodos de análisis de polifenoles

Los polifenoles extraídos se pueden analizar con diversas técnicas, que buscan conocer la concentración de determinados polifenoles, su capacidad antioxidante o la concentración total de polifenoles.

El análisis de la cantidad total de polifenoles se lleva a cabo por el método TPC<sup>55,56</sup>, “Total Phenolic Content”, empleado en la mayoría de los estudios como parámetro para medir la concentración de los polifenoles en el extracto<sup>40</sup>. Otro método empleado para conocer la cantidad de polifenoles extraídos es el TF<sup>34</sup>, “Total Flavonoid”, con el que se obtiene

por espectrometría la concentración de flavonoides, un tipo de polifenoles descrito anteriormente.

Para analizar la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos existen varios métodos, entre los que destacan los siguientes: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y el test DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). En el método ORAC es un método estándar que mide la capacidad de una muestra de atrapar las especies reactivas del oxígeno (ROS) <sup>57</sup>. En el caso del test DPPH emplea este compuesto, que, al entrar en contacto con los polifenoles de la muestra, lo inhiben, midiendo la absorbancia de la muestra resultante. Existen otros métodos que miden la capacidad antioxidante de las muestras, como son el método Racimat o la medida del valor peróxido <sup>10</sup>. La capacidad antioxidante de las muestras suele expresarse como equivalentes de trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-carboxylic acid).

Para determinar que compuestos están presentes, el método más empleado es el HPLC, con el que se obtienen el cromatograma de cada muestra. La identificación de los compuestos puede realizarse con la introducción de los patrones <sup>43,58</sup> obteniendo el tiempo de residencia de cada uno de los compuestos a detectar, o bien, analizar cada fracción de muestra que sale de la columna de cromatografía con un espectrómetro de masas<sup>14</sup>. Este último método supone un mayor tiempo de análisis a la vez que un mayor número de equipos, pero los resultados son más precisos. Cuando se inyecta un patrón de un compuesto, se realizan inyecciones de diversas concentraciones, obteniendo la relación entre la concentración de la muestra y el área del pico para el tiempo de residencia del compuesto, de modo que permite analizar de manera cuantitativa y cualitativa el contenido de cada polifenol en la muestra.

#### 1.1.6. ¿POR QUÉ ES NOVEDOSO?

Con el desarrollo de esta investigación se pretende encontrar un método para extraer los polifenoles del alperujo que logre un gran rendimiento de extracción de polifenoles totales, una gran riqueza y que se logren extraer aquellos compuestos más significativos. No obstante, también se intenta lograr estos objetivos con la mayor eficiencia posible. El proceso de extracción implica el uso de varios recursos: el disolvente, la energía necesaria para elevar la temperatura, el uso de microondas u otros sistemas de intensificación, etc.

El objetivo final es lograr obtener unas condiciones óptimas de extracción, de modo que se pueda escalar para que la extracción se lleve a cabo a nivel industrial.

El enfoque de realizar la extracción para que pueda ser escalado, primero a una planta piloto para su posterior escalado a nivel industrial, supone un punto de vista innovador, ya que los experimentos se tienen que llevar a cabo con condiciones menos agresivas, que supondrían un mayor coste. La extracción de polifenoles se ha estudiado con tratamientos a alta presión y alta temperatura, con ultrasonidos o con microondas<sup>31</sup>. La aplicación de estos tratamientos durante todo el proceso de extracción, y teniendo en cuenta que al escalar el proceso las cantidades a tratar son mucho mayores, supondría un consumo energético elevado. El gasto en equipamiento también es una restricción para aplicar estos tratamientos ya que para alcanzar altas temperaturas se requiere emplear materiales más costosos. Por estas razones es necesario encontrar un proceso que emplee condiciones menos agresivas y durante el menor tiempo posible centrandose la investigación en optimizar el pretratamiento con microondas de modo que se logre degradar las paredes celulares y que así se disuelvan los polifenoles en el disolvente añadido. Al ser únicamente un pretratamiento, éste se realiza durante poco tiempo, reduciendo el consumo de energía y el volumen requerido para el tratamiento, ya que, si es en continuo, únicamente se necesita aplicar las microondas en un volumen reducido y no en todo el sistema de extracción.

La aplicación de microondas se ha empleado en más ocasiones para potenciar la extracción de este tipo de compuestos de materia vegetal<sup>31,37,59</sup>. En algunos estudios se han empleado microondas para extraer aceites del alperujo con hexano<sup>60</sup>, aumentando el rendimiento de producción de aceite de oliva. No obstante, la extracción de polifenoles de alperujo aplicando microondas se ha desarrollado poco, destacando el estudio<sup>14</sup> en el que se realizó la extracción de polifenoles con etanol/agua y de ácidos grasos con hexano de manera simultánea, irradiando con microondas el recipiente en el que se realiza la extracción. Cabe destacar que, en este procedimiento, se analiza el efecto de las variables de extracción, como la potencia de extracción, el ratio disolvente/muestra y el tiempo de extracción. Se analizan las cinéticas de extracción de polifenoles, para optimizar el tiempo de extracción. Respecto a este estudio, lo novedoso de este proyecto es el uso de un

pretratamiento y compararlo con una muestra de control que se obtiene por extracción con el mismo disolvente en un baño termostático.

El empleo de microondas durante un corto periodo de tiempo se estudió como alternativa a realizar la extracción a altas temperaturas, de manera que se evitara la degradación de los polifenoles. Los polifenoles son sensibles a las altas temperaturas, en especial cuando están expuestos a éstas durante tiempos superiores a 1 minuto<sup>13</sup>. Los compuestos que más rápido se degradan, dentro de los polifenoles, son las antocianinas. Debido a estas limitaciones de los compuestos fenólicos, si se emplean tratamientos agresivos, el rendimiento de extracción de algunos compuestos objetivo se vería afectado. Para evitar esto, las extracciones se llevaron a cabo a temperaturas inferiores a los 70°C, y los pretratamientos alcanzaron picos de 175°C como valor máximo, durante periodos de tiempo muy breves.

Algunos estudios han analizado la extracción de compuestos mediante el tratamiento con microondas sin disolvente añadido, únicamente con la humedad de la propia materia prima. Principalmente se han analizado las extracciones de aceites esenciales de plantas<sup>36,54,61</sup>. También se analizó el efecto de intensificar con microondas la extracción añadiendo únicamente la fracción de agua del disolvente a añadir, añadiendo tras el pretratamiento el etanol necesario. Estos experimentos tenían como objetivo observar el efecto de aplicar las microondas únicamente sobre el agua, ya que presenta un mejor comportamiento frente a las microondas que el etanol. Con este método se lograría un efecto similar a no emplear disolvente, se lograría reducir la energía empleada, el tiempo de tratamiento y el volumen del recipiente.

Una ventaja del método propuesto es la ausencia de pretratamientos mecánicos y de etapas de secado, que encarecen el proceso y hacen que sea más difícil de realizar. En algunos estudios, antes de realizar la extracción se seca la materia prima, que contiene una humedad cercana al 70%<sup>5</sup>. Esta etapa implica no solo un coste de equipos y energía, sino que además algunos compuestos bioactivos de interés se degradan.

Para analizar la extracción se emplearon dos parámetros: el rendimiento y la riqueza. El rendimiento expresa la masa de polifenoles extraída por cada gramo de alperujo seco, de modo que este parámetro no dependa de la humedad de la materia prima ni del ratio

sólido/líquido que se emplea, a diferencia de la concentración en el extracto. El rendimiento informa del aprovechamiento conseguido en cantidad de polifenoles extraídos, midiéndose en miligramos de ácido gálico equivalente por cada gramo de alperujo seco. La riqueza expresa la masa de polifenoles por cada gramo de extracto seco, representando la calidad y el precio del producto final, en términos de concentración de polifenoles en el producto comercializado. Se mide en miligramos de ácido gálico equivalente por cada gramo de extracto seco. El rendimiento de extracción se emplea en otros estudios<sup>49</sup>.

Los parámetros descritos anteriormente de rendimiento y riqueza no se analizaron únicamente al final de la extracción, sino que se fueron analizando para determinar las cinéticas de extracción. Con esto se pretende analizar la concentración inicial de polifenoles, la concentración final y la evolución con el tiempo. El rendimiento se ajustó a una cinética de primer orden<sup>14,59</sup>.

Dentro de los principales compuestos que se encuentra en el alperujo, el estudio también se centra en detectar mediante HPLC los distintos compuestos que se logran extraer, analizando en que momento y bajo qué condiciones se potencia la extracción de los principales compuestos de interés, que son: hidroxitirosol, tirosol, rutina, oleuperina, ácido gálico, quercitina y ácido cumárico. De este modo no sólo se analizó la extracción de polifenoles totales, sino que además se evaluó la extracción de estos compuestos clave.

Con el desarrollo de esta tecnología de extracción se pretende minimizar el impacto ambiental que genera el alperujo y generar un beneficio económico, reduciendo el uso de recursos y revalorizando el alperujo de aceituna que, de no ser empleado para este método, necesita ser tratado. Estos principios coinciden con los principios de economía circular, que se basa en el aprovechamiento de residuos para obtener de ellos nuevos productos con un valor económico. Además, se pretende reducir el consumo de recursos, ampliando el beneficio de este método de extracción.

Con este estudio se alcanzan cuatro principios de la química verde, definidos como los principales objetivos que ha de tener la química para lograr la sostenibilidad<sup>62</sup>. Estos son los siguientes:

Objetivo 1. Reducir los residuos. Con este método se logra tratar y revalorizar el alperujo, que de no ser tratado supone un residuo ambiental.

Objetivo 5. Disolventes benignos. En los experimentos se emplean como disolventes agua y etanol, siendo ambos disolventes no perjudiciales, ya que no presentan riesgos ni para la salud ni para el medio ambiente. El etanol es uno de los ocho compuestos que figuran en la lista de disolventes a utilizar sin restricciones en el procesado de alimentos de la Directiva 2009/32/CE del Parlamento Europeo<sup>63</sup>.

Objetivo 6. Diseño energético eficiente. Lo que se pretende con este estudio es optimizar los parámetros de operación del microondas y de la extracción para reducir el coste y uso de recursos, tanto disolventes como de energía.

Objetivo 7. Uso de fuentes de materia renovables. El alperujo constituye un residuo natural de la producción de aceite de oliva, sin ningún tratamiento, siendo por lo tanto una fuente renovable.

### 1.2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar la extracción de polifenoles del alperujo de aceituna con la aplicación de microondas. Para el análisis de la extracción se determinó el rendimiento de extracción, “yield”, y la riqueza, “richness”. Con la aplicación de microondas se pretende incrementar el rendimiento final de extracción, la velocidad de extracción y la riqueza del extracto, aumentando la eficacia del proceso.

Para alcanzar estos objetivos se llevaron a cabo experimentos con diversas condiciones de operación, observando el incremento que se produce en las variables descritas anteriormente con la aplicación del pretratamiento con microondas. Las condiciones de operación que se estudiaron fueron las siguientes:

- Temperatura de extracción.
- Ratio sólido/líquido. Es la relación entre la masa de alperujo empleada y la cantidad de disolvente añadida.
- Concentración del disolvente. Como disolvente se empleó una mezcla de etanol agua, modificando la concentración de etanol.
- Disolvente en el pretratamiento. El pretratamiento con microondas se realizó sin disolvente, con agua y con una mezcla de etanol/agua.
- Temperatura y tiempo de pretratamiento.

Con el estudio de estos parámetros de la extracción se busca obtener aquellas condiciones que presenten un equilibrio entre rendimiento y riqueza de la extracción y consumo de recursos. Con la obtención de estos parámetros óptimos, se analizaría la extracción de polifenoles en un microondas continuo. El escalado de la operación de extracción implica una mayor limitación de condiciones como el ratio, que de ser muy pequeño supone una limitación por el elevado consumo de disolvente.

Los resultados obtenidos en este trabajo se utilizarán posteriormente en otro proyecto que aborda la investigación de la extracción asistida con microondas en continuo, ya que con este proyecto se pretende obtener un proceso fácilmente escalable.



# CAPÍTULO 2

## MATERIALES Y MÉTODOS



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. EQUIPOS Y REACTIVOS

#### Materia prima

El alperujo empleado para realizar los experimentos fue cedido por la “Almazara Oliduero” (Medina de Campo, Valladolid, España). El alperujo se almacenó congelado a -20°C y se descongeló el día antes de cada experimento a 4°C. La composición del alperujo puede variar en función de su procedencia. La composición del alperujo es de semillas de aceituna 15%<sub>w</sub>, pulpa de aceituna 20%<sub>w</sub> y agua 65%<sub>w</sub><sup>64</sup>. Estos valores pueden variar, por lo que el alperujo se caracterizó mediante varios experimentos. En la Tabla 2 se muestra el análisis del alperujo.

Tabla 2. Caracterización del alperujo

Compuestos	Húmedo	Seco
Agua	69,1%	-
Lípidos	2,8%	9,2%
Extractivos	7,1%	23,1%

La humedad se determinó secando la muestra a 80°C durante 48 horas, pesando la muestra antes y después. Para obtener el contenido en lípidos y extraíbles se empleó el método Soxhlet<sup>65</sup>, usando como disolventes hexano (lípidos) y agua y etanol (extraíbles).

#### Reactivos y compuestos químicos

El nitrógeno [Carburos metálicos] se empleó para evitar que durante las extracciones se produzca una oxidación de la muestra no deseada. El disolvente para las extracciones se preparó con agua MiliQ acidificada (pH 1) y etanol absoluto [PanReac]. Reactivos método TPC: reactivo de Folin-Ciocalteu [PanReac]; Carbonato sódico (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) [PanReac]. Reactivos método TF: nitrato sódico (NaNO<sub>2</sub>) [PanReac]; Cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) [PanReac]; Hidróxido sódico (NaOH) [PanReac]. Patrones HPLC: falta. En la columna de HPLC se empleó como diluyente metanol [Panreac].

#### - Equipos

Microcentrífuga Spectrofuge™ 24D Digital Lab

Velocidad máxima de giro 13300 rpm. 24 huecos para ependorf de hasta 2ml.

#### Microondas CEM Discover One

Microondas focalizado con una potencia de 0-300W. Cavity hasta 300 ml. Frecuencia de operación 2450MHz. Sistema de control Synergy™ Software.

#### Microondas Anton Paar Monowave 450

Potencia de 0-850W, cavidad de 30ml. Presión máxima de 30 bares y temperatura de 300°C. Termómetro infrarrojo (temperatura de pared) y de Ruby. Cuenta con un inyector automático de 24 posiciones. Enfriamiento con aire. Control incluido en el aparato, con posibilidad de tres pasos (calentamiento, mantenimiento de temperatura y enfriamiento).

#### Espectrofotómetro Shimadzu UV-2550

Longitud de onda 190-1100 nm (765 nm). Fuente de luz UV-2550. Detector: Photomultiplier R-928.

#### Equipo HPLC

Equipo Waters e2695 (Separation Module) con una columna Columna C18 (250 x 4.6 mm) de resina de intercambio iónico de 5µm de tamaño de partícula (SigmaAldrich), una precolumna OptiGuard de 1mm (SigmaAldrich) y un detector Waters 2998 PDA. El software empleado para registrar los resultados fue Water Empower 3.

#### Termómetro óptico

Termómetro óptico para una mayor precisión en la medida de la temperatura de la muestra con un rango de temperaturas de -80°C a 300°C

## 2.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Para extraer los polifenoles del alperujo se utilizó como disolvente una mezcla de etanol y agua, que ha sido probado como el mejor disolvente para la extracción de sustancias bioactivas<sup>10</sup>, y que además es menos tóxico que el metanol. Dentro de las extracciones se diferencia entre aquellas en las que se emplearon microonda para potenciar la extracción y aquellas en las que se realizó una extracción convencional. El procedimiento que se realizó para cada experimento se recogió en el ANEXO 1. PROCEDIMIENTOS.

### Extracción convencional

A modo de control, se realizaron una serie de experimentos en los que no se aplicó ningún pretratamiento. El objetivo principal de estos experimentos es determinar qué riqueza y qué rendimiento de extracción de polifenoles se puede obtener sin aplicar microondas, y una vez conocido ese valor, cuantificar la mejoría que se produciría al usar esta técnica, así como optimizar las condiciones de temperatura de extracción, ratio sólido-líquido y composición del disolvente.

El método seguido para todos los experimentos fue el siguiente:

- En primer lugar, se prepararon los disolventes con concentraciones de etanol del 25%<sub>w</sub>, 50%<sub>w</sub> y 75%<sub>w</sub>, se descongeló el alperujo, se preparó el baño termostático a la temperatura elegida para dicho experimento y se preparó el sistema de nitrógeno.
- Se pesó el alperujo en la balanza analítica. Para cada experimento se mantuvo constante el volumen de disolvente (70 ml). En función del ratio se calculó la masa necesaria y se pesó.
- Se añadió el imán, para la agitación magnética y el disolvente y se barrió el vapor de la superficie con nitrógeno. Se agitó durante 5 minutos y se tomó la primera muestra. A continuación, se introdujo el matraz redondo en el baño termostático y se tomaron tiempos.
- Se tomaron 7 muestras, una a tiempo cero (inicial) y las siguientes en 5', 10', 15', 30', 60' y 120'. Cada vez que se tomó muestra se llenó un ependorf de 2 ml, y además en los tiempos 5', 10', 30' y 120' se llenó otro, para medir el residuo seco en esos tiempos. Siempre que se abrió el matraz para tomar muestra se barrió con nitrógeno para evitar que se oxidaran los compuestos de interés. Las muestras extraídas se

enfriaron en el congelador y posteriormente se centrifugaron para obtener el extracto líquido.

### **Extracción con pretratamiento de microondas**

Se estudió el efecto del pretratamiento de microondas sobre la muestra de alperujo. Para ello se emplearon dos tipos de microondas, el microondas CEM discover, que opera a presión atmosférica, y el microondas Anton Paar, que opera a presión, descritos anteriormente.

Dentro de los pretratamientos se distinguen tres tipos:

- Pretratamiento sin disolvente (SFME, Solvent Free Microwave Extraction)
- Pretratamiento solo con agua (OWME, Only Water Microwave Extraction)
- Pretratamiento con disolvente (SME, Solvent Microwave Extraction)

A continuación, se detallan los procedimientos seguidos para ambos microondas, diferenciando entre los tres tipos de pretratamiento en función del disolvente utilizado durante el pretratamiento. La extracción realizada fue idéntica a la extracción convencional, con la única modificación de que se le añade una etapa de pretratamiento que se explica a continuación. No se incluyen los pasos previos de preparación de disolventes, ni del baño termostático ni la preparación del nitrógeno. Siempre que se abrieron los matraces se barrió con nitrógeno para evitar la degradación de los compuestos bioactivos que pretendemos extraer. Asimismo, las muestras se guardaron en el congelador (-20°C) hasta la realización de los análisis correspondientes.

#### **Microondas a presión atmosférica**

- En primer lugar, se encendió el microondas, los termómetros ópticos y se inicializó el programa de control del microondas desde el ordenador. Se introdujo un matraz con agua y se inicializó el programa de pre-heating (10 min).
- Se pesó en una balanza analítica la muestra descongelada y se introdujo en un matraz redondo y se añadió el imán.
- En el caso de SFME se omitió este paso. Para OWME se añadió la cantidad de agua que llevaría el disolvente y en el caso de SME se añadió la mezcla etanol:agua 50/50.

- Se introdujo el matraz redondo, junto con la precolumna (para evitar que salpicara) y los termómetros. Se inició el programa, preparado anteriormente en función de las características de cada experimento, modificando el tiempo de exposición.
- Una vez terminado el pretratamiento, se sacó el matraz del horno microondas y se añadió, en el caso de SFME el disolvente etanol:agua 50/50 y etanol en el caso de OWME. Se enfrió el matraz con agua y se agitó durante 5 min. Se tomo la muestra 0.
- Se introdujo el matraz en el baño a 70°C y se realizó la extracción convencional, tomando muestra en los siguientes tiempos: 5', 10', 15', 30' y 60'. En las muestras de tiempos 5', 10', 30' y 60' se tomaron 4 ml, en el resto (0' y 15') solo se tomaron 2ml.

### Microondas presurizado

- En primer lugar, se inició el microondas y se configuraron las características del tratamiento, configurándose el paso de calentamiento empleando una potencia constante de 100W hasta alcanzar la temperatura deseada.
- Se pesó la muestra en tres matraces G30.
- En el caso de SFME se omitió este paso. Para OWME se añadió la cantidad de agua que llevaría el disolvente y en el caso de SME se añadió la mezcla etanol:agua 50/50.
- Se introdujo el matraz en el horno, se inició el programa anteriormente configurado y se introdujo el termómetro de Ruby.
- Una vez terminado el pretratamiento, se sacó el matraz del horno microondas y se añadió, en el caso de SFME el disolvente etanol:agua 50/50 y etanol en el caso de OWME. Se agitó durante 5 min.
- El primer matraz se mide el rendimiento de extracción inicial, tomando la muestra una vez acabado el pretratamiento y añadido el disolvente. En los otros dos matraces se añade el disolvente y se introducen en el baño termostático, tomando la muestra una vez alcanzado el tiempo de extracción. Este procedimiento se realizó con el objetivo de que no se modificara la relación sólido/líquido.

### Preparación de disolventes

Para la extracción de polifenoles se empleó etanol y agua, mezclados en diferentes proporciones. Se emplearon mezclas con tres concentraciones diferentes: 25%<sub>v/v</sub>, 50%<sub>v/v</sub> y 75%<sub>v/v</sub>. Para prepara los disolventes se siguieron los siguientes pasos:

- Se desgasificó agua MilliQ mediante calentamiento a ebullición para eliminar los posibles gases disueltos, dióxido de carbono en su mayoría. Una vez desgasificada, se acidifica con ácido clorhídrico 1M, ya que se ha probado que favorece la estabilización de los polifenoles<sup>5</sup>.

Dado que los volúmenes no son aditivos, se midió el volumen necesario de etanol (25%, 50% o 75% del volumen total) y se posteriormente se añadió el agua preparada anteriormente hasta alcanzar el volumen total.

### 2.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Mediante la extracción con disolvente del alperujo, se consiguen extraer numerosos compuestos, desde azúcares, pectinas y lípidos hasta polifenoles<sup>66</sup>, que son los compuestos que mayor interés presentan y que constituyen el principal objetivo de los experimentos llevados a cabo.

Con el objetivo de conocer que compuestos y en qué cantidad se logran extraer mediante los diferentes métodos de extracción y pretratamiento descritos en el *apartado 3.2*, se emplearon tres métodos distintos, total phenolic content (TPC), total flavonoids (TF) y high performance liquid chromatography (HPLC), descritos a continuación.

Estos métodos se emplean para determinar el contenido en polifenoles de los extractos líquidos obtenidos tras cada experimentación. Con el TPC, se determina la cantidad total de polifenoles, con el TF la cantidad de los cuales son flavonoides, un tipo de polifenoles que presenta un especial interés, debido a que son los compuestos bioactivos que presentan más beneficios para la salud<sup>15</sup>. Mediante el HPLC, se logra determinar qué compuestos específicos han sido extraídos mediante la comparación de la muestra con un patrón en una columna de cromatografía líquida.

Dentro de la bibliografía se analizan las muestras de polifenoles con otros métodos, dentro de los cuales cabe destacar aquellos que miden la capacidad antioxidante de la muestra. Los métodos más empleados son el test DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)<sup>10,40</sup>, y el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)<sup>57</sup>, los cuales expresan la actividad antioxidante del extracto tomando como referencia el trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-carboxylic acid).

No obstante, la actividad antioxidante de las muestras obtenida mediante las extracciones llevadas a cabo puede ser caracterizada de manera completa mediante los tres análisis realizados, ya que proporcionarían la información de cuántos polifenoles hay en el líquido, cuántos de los cuales forman parte del grupo de los flavonoides, y mediante la cromatografía, qué cantidad de los polifenoles inyectados como patrones hay en cada una de las muestras analizadas.

### **Total Phenol Content, TPC (Folin-Ciocalteu)**

El contenido de polifenoles total de las muestras obtenidas se midió mediante el método de Folin-Ciocalteu, que se describe a continuación<sup>55,56</sup>. Los valores obtenidos se expresan en mg de ácido gallico equivalentes por litro de muestra (ppm).

#### Preparación de las muestras

1. En tubos separados colocar 40 µl de muestra y el disolvente en el tubo del blanco.
2. Adicionar 3000 µl de agua MiliQ.
3. Adicionar 200 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu.
4. Esperar entre 30 segundos y 8 minutos.
5. Adicionar 600 µl de carbonato sódico (20% saturado) y agitar.
6. Incubar los tubos a 40°C durante 30 minutos.

Absorbancia a 765 nm.

Medir contra el blanco la absorbancia de las muestras.

#### Curva de calibración con ácido Gallico

Preparar una disolución de 900 ppm de ácido gallico (estándar) y realizar 5 diluciones (900 ppm, 450 ppm, 225 ppm, 112.5 ppm y 56.25 ppm) cuya absorbancia es medida y representada frente a la concentración de cada patrón, obteniendo la curva de calibración. Si la absorbancia de una muestra está fuera del rango de la curva de calibración será necesario diluir o concentrar la muestra.

La muestra inicial de 900 ppm se prepara disolviendo 90 mg de ácido gallico en 100 ml de disolución buffer.

#### Error

En este método, el error del análisis viene dado por el error en la recta de calibrado (Figura 2). El error de la recta de calibrado es  $R^2$  0.9980. En la ecuación [1] se muestra el ajuste empleado para obtener la concentración del TPC.

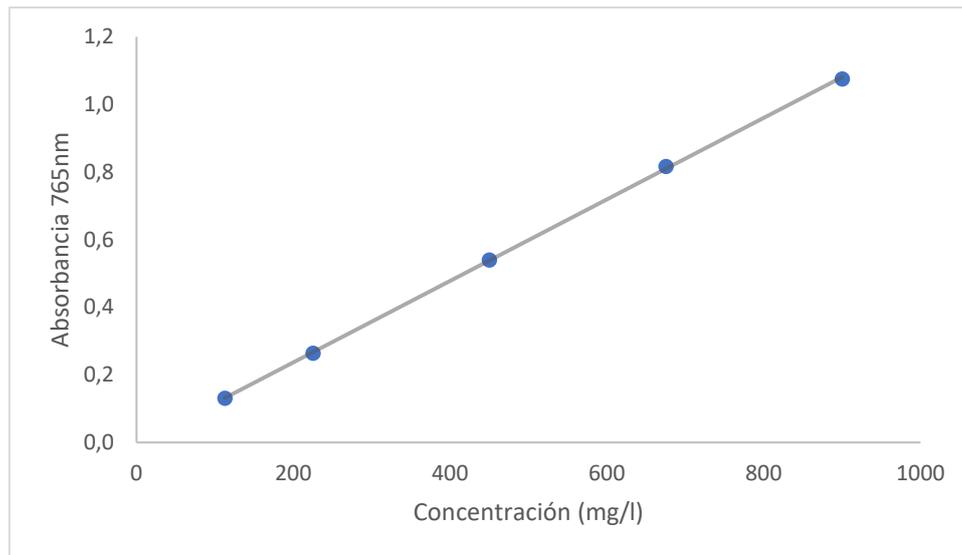


Figura 2. Recta de calibrado TPC

$$Abs = 0.001292 \cdot TPC \text{ (ppm)} + 0.019200 \quad [1]$$

### Total Flavonoids, TF

Los flavonoides de las se midieron mediante el método TF, como se describe a continuación.

#### Preparación de las muestras

1. Introducir 1000  $\mu$ l de cada muestra y del blanco en los tubos de ensayo.
2. Adicionar 300  $\mu$ l de  $\text{NaNO}_2$  5% y esperar 5 minutos.
3. Adicionar 500  $\mu$ l de  $\text{AlCl}_3$  2% y esperar 5 minutos.
4. Adicionar 500  $\mu$ l de  $\text{NaOH}$  y agitar fuertemente.
5. Adicionar 10000  $\mu$ l de agua MiliQ

#### Absorbancia a 510 nm

Medir la absorbancia a 510 nm sobre el blanco seleccionando el método Flavonoides en el espectrofotómetro.

#### Curva de calibrado

La curva de calibrado se realiza midiendo la absorbancia de patrones preparados con concentraciones de 0 ppm a 500 ppm. Si la concentración medida de flavonoides es superior a 500 ppm, es necesario diluir la muestra con el disolvente empleado para la extracción.

### Error

El error de la recta de calibrado (Figura 3) es de  $R^2$  0.9914, que representa el error en la medida de los flavonoides mediante este método y con este aparato empleado.

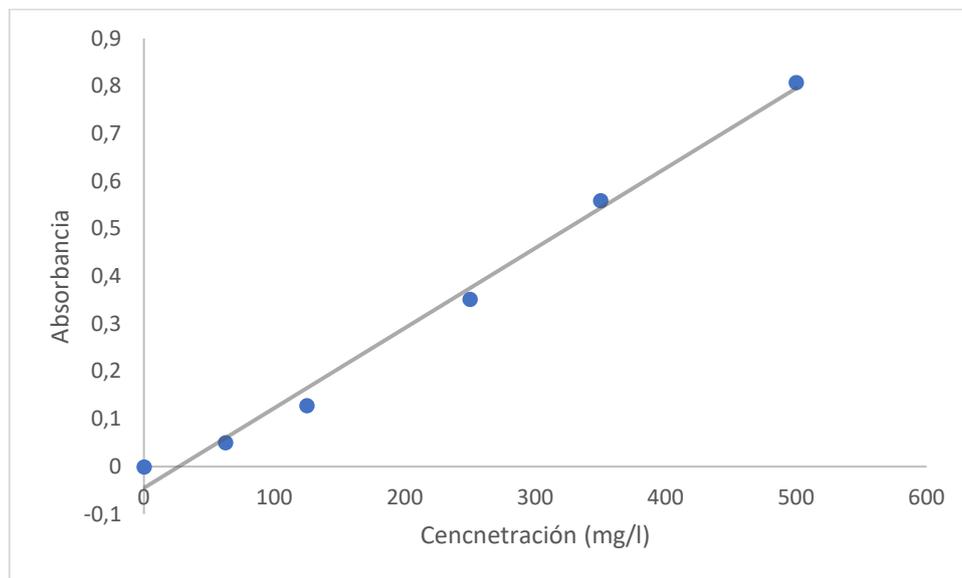


Figura 3. Recta de calibrado TF

$$Abs = 0.001681 \cdot TF(ppm) - 0.044996 \quad [2]$$

### HPLC

El método seleccionado para conocer que compuestos específicos tenemos en las muestras es el HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Este método a sido empleado por numerosos autores para determinar compuestos fenólicos<sup>43,58</sup>. A continuación, se describe el procedimiento seguido para realizar estos análisis.

#### Condiciones de operación

Columna C18 + OptiGuard

Temperatura 35°C

Eluyentes: (A) Agua pH=3 con ácido fosfórico; (B) Metanol

El gradiente empleado se muestra en la Figura 4<sup>67</sup>:

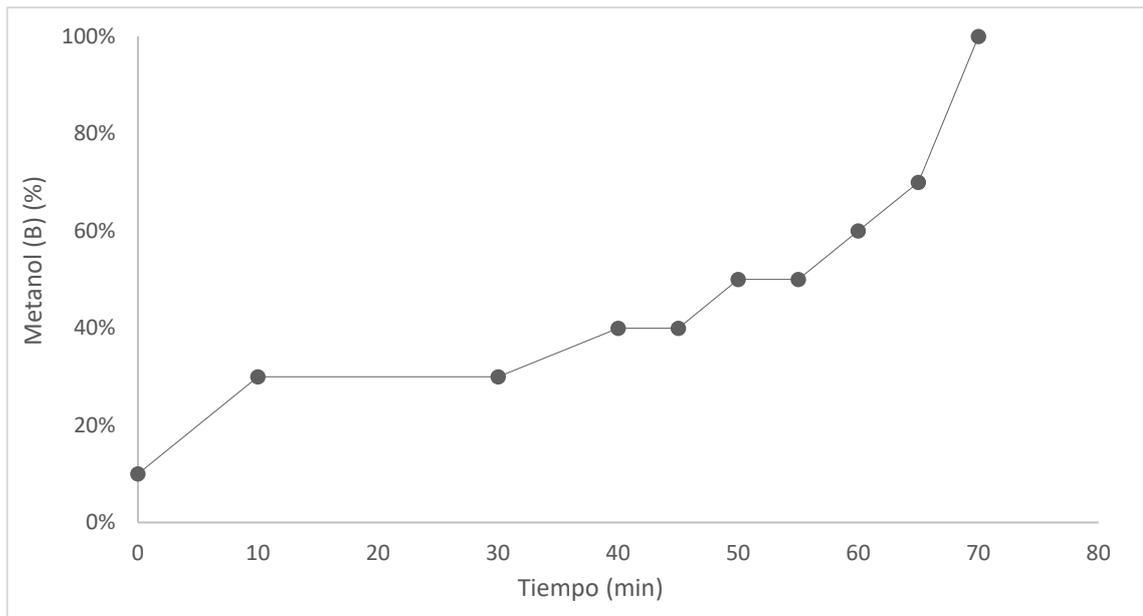


Figura 4. Gradiente empleado

Flujo 1 ml/min

Volumen de inyección 20  $\mu$ l

Método de análisis

Preparación de las muestras

1. Filtrar las muestras con un filtro de 22  $\mu$ m
2. Introducir 1.5 ml de muestra en los tubos de HPLC y cerrar con el tapón. Si no hay 1.5ml de muestra disponibles, diluir la muestra hasta llegar a 1.5 ml
3. Introducir los patrones en los tubos

Inyección de las muestras en el sistema (automático)

Para realizar el calibrado de los tres compuestos fenólicos básicos del alperujo (hidroxitirosol, HT, tirosol, T, y oleuperina, OLE) se inyectaron diferentes volúmenes de muestra cada uno correspondiente a una concentración, y se obtuvieron tanto el tiempo de retención, como el área para cada concentración de compuesto. El tiempo de retención sirve para identificar el compuesto, ya que cada compuesto, para unas mismas condiciones y columna, presenta un mismo tiempo de retención. Con el área y la concentración del patrón se elaboraron las rectas de calibrado, que se muestran a continuación, obteniendo la relación que da la concentración (ppm) de cada uno de estos tres compuestos en una muestra, en función del área del pico en el cromatograma.

En la ecuación [1] se muestra la concentración de cada patrón en función del volumen de inyección y del volumen de patrón inyectado. Para cada patrón la concentración de la muestra cambia, de modo que la concentración varía.

$$C \text{ (ppm)} = \frac{C_o \text{ (ppm)} * V_{inyectado} (\mu L)}{V_{inyección} (\mu L)} \quad [3]$$

### Hidroxitirosol

Para el HT se introdujeron seis volúmenes del patrón, obteniendo una recta al representa la concentración frente al área. El tiempo de retención del HT,  $t_{retención}$ , observado fue 9,95 s, de modo que aquellos picos que se observaron para este tiempo representan la presencia de este compuesto en la muestra.

Tabla 3. Patrones HT

$V_{inyctado} (\mu l)$	C (ppm)	Area ( $\mu V \cdot s$ )
0	0	0
10	15	245341
20	30	508288
40	60	1051264
60	90	1571121
80	120	2010326
100	150	2491948

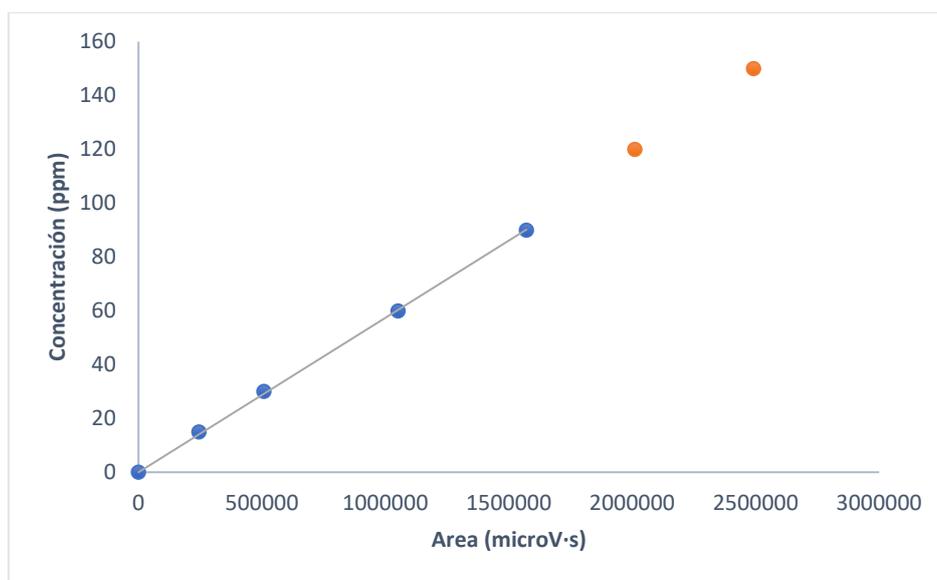


Figura 5. Recta de calibrado HT

Una vez ajustados los puntos experimentales, sin ajustar los dos últimos, ya que dan lugar a errores de ajuste mayores, se obtiene la ecuación [2]. Los ajustes de las tres rectas de calibrado para los tres compuestos se hicieron pasar por el origen, ya que, si se introdujera una muestra sin dicho compuesto, no existiría el pico y por lo tanto el área sería cero.

$$C_{HT} \text{ (ppm)} = 5.7399 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Area} \text{ (}\mu\text{V}\cdot\text{s)} \quad [4]$$

### Tirosol

Para el T se inyectaron tres volúmenes del patrón, como se muestra en la Tabla 5, de modo que la concentración del patrón es la que viene dada por la ecuación [1]. El tiempo de retención que se obtuvo para el tirosol en las condiciones dadas fue  $t_{\text{retención}} = 13,19$  s.

Tabla 4. Resultados patrones T

$V_{\text{inyctado}} \text{ (}\mu\text{l)}$	$C \text{ (ppm)}$	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
0	0	0
10	25	298752
20	50	603400
40	100	1209015

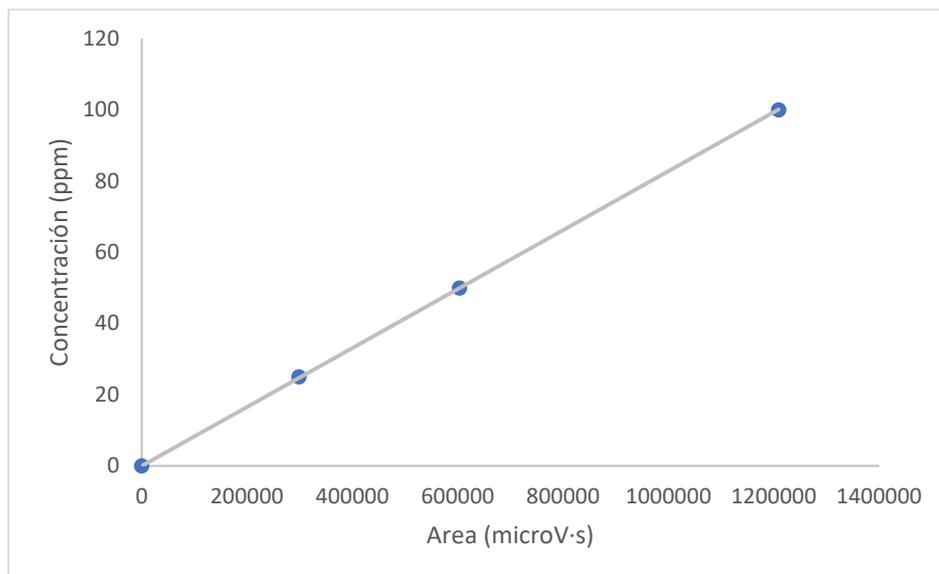


Figura 6. Recta de calibrado T

Del ajuste de los datos experimentales se obtiene la ecuación [3], que permite obtener la concentración de T en una muestra a partir del área del cromatograma.

$$C_T \text{ (ppm)} = 8.2786 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Area } (\mu\text{V} \cdot \text{s}) \quad [5]$$

### Oleuperina

Para la OLE se introdujeron 6 patrones, desde 7.5 ppm hasta 75 ppm. Para cada patrón se midió el área bajo el pico en el cromatograma y se ajustaron los resultados a una recta. El tiempo de retención de este compuesto,  $t_{\text{retención}}$ , fue de 48,71 s.

Tabla 5. Patrones OLE

$V_{\text{inyectado}} (\mu\text{l})$	C (ppm)	Area ( $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ )
0	0	0
10	7,5	43161
20	15	92561
40	30	186472
60	45	281322
80	60	364292
100	75	411168

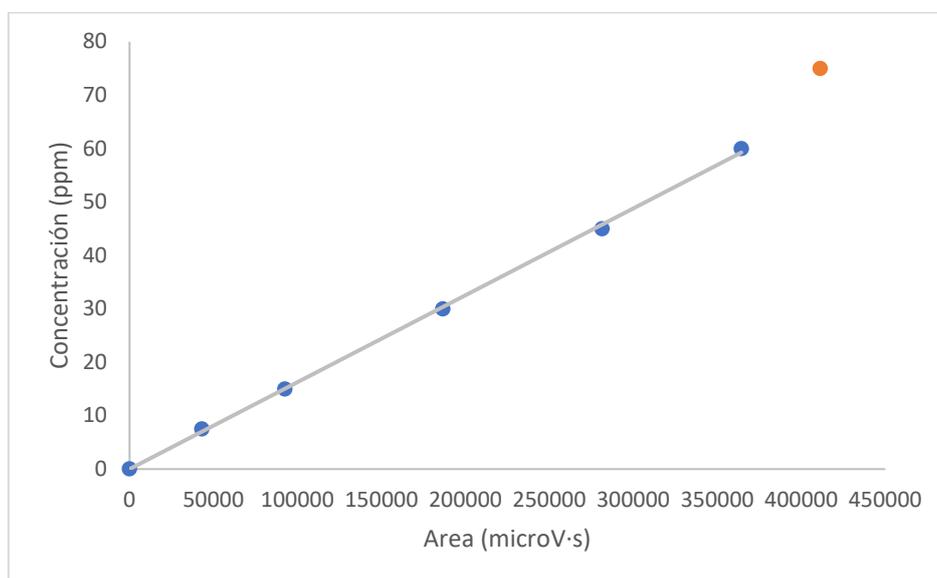


Figura 7. Recta de calibrado OLE

Al realizar el ajuste se observó que el último patrón no quedaba alineado con los valores anteriores, de modo que no se tuvo en cuenta para hacer la recta de calibrado. Con los patrones anteriores se obtuvo la ecuación [4].

$$C_{\text{OLE}} \text{ (ppm)} = 1.627 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Area } (\mu\text{V} \cdot \text{s}) \quad [6]$$

### Resultados

Una vez calibrados los tres compuestos de interés, se procedió a inyectar las muestras extraídas durante los experimentos en el HPLC, obteniendo el cromatograma de cada muestra. El software empleado recogió, para cada tiempo de retención, la altura del pico y el área bajo el pico. De este modo, de los resultados obtenidos para las muestras inyectadas, se escogieron los valores del área para los tiempos de retención observados en los patrones y que se han detallado anteriormente. Con estos valores de las áreas se calcularon con las ecuaciones [2, 3 y 4] la concentración de los tres compuestos en la muestra y se comprobó que estaban por debajo del valor más alto de la calibración, de modo que podamos asegurar que es posible emplear dicha recta de calibración. Una vez obtenida la concentración en la muestra inyectada, se multiplicó el valor obtenido por el factor de dilución empleado en cada muestra. Cada muestra tiene una dilución debido a las pérdidas en la centrifugación y en la filtración, que causaron que no todas las extracciones tuvieran el volumen necesario para poder ser filtradas y hubo que diluirlas con el disolvente.

En el cromatograma se observó que para todas las muestras había un pico para un tiempo de retención en torno a los 60 s. Este pico se observó también en una muestra en la que únicamente se inyectó disolvente (etanol:agua). Este pico es el mayor en todas las muestras, y es debido a los compuestos añadidos para la desnaturalización del etanol.

### Errores

Los errores de este método vienen dados por el ajuste de la recta de calibrado, obteniéndose para el HT una  $R^2$  de 0.99968, para el T  $R^2$  de 0.99999 y para la OLE  $R^2$  de 0.99945, siempre que la concentración se encuentra dentro del rango de la recta de calibrado. Para valores superiores sería necesario realizar otro ajuste, inyectando concentraciones superiores del patrón, o diluyendo la muestra inicial.

### **Residuo Seco**

El residuo seco ( $g_{\text{residuo sólido}}/l$ ) se mide por pesada diferencial de la muestra, dejándola secar durante 48 horas a 80°C, conociendo el volumen de muestra que se emplea. En la ecuación [5] se muestra cómo se calcularía el residuo seco.

$$R_s \left( \frac{g}{l} \right) = \frac{m_1(g) - m_2(g)}{V(l)} \quad [7]$$

### Error

El error asociado a la determinación del residuo seco se calcula con la ecuación [6], mediante las derivadas. El valor de  $\Delta V$  (error en la medida del volumen) lo tomamos como cero, ya que es mucho menor que el valor del error  $\Delta m = 10^{-4}$  g.

$$\begin{aligned} Error_{R_s} &= \sum_{x=i}^n \left| \frac{\partial R_s}{\partial x} \right| \cdot \Delta x = \left| \frac{\partial R_s}{\partial V} \right| \cdot \Delta V + \left| \frac{\partial R_s}{\partial m_1} \right| \cdot \Delta m_1 + \left| \frac{\partial R_s}{\partial m_2} \right| \cdot \Delta m_2 = \\ &= 2 \cdot \Delta m \cdot \frac{1}{V} = 0.2 \text{ g/l} \end{aligned} \quad [8]$$

## 2.4. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

### Extracción convencional

Para lograr optimizar las condiciones para las que el rendimiento de extracción es mayor se empleó el método de superficie de respuesta, RSM (Response Surface Method), dentro del software StatGraphics. Se empleó el método centrado en las caras, con tres repeticiones del punto central, de modo que la desviación en estos tres experimentos determine la desviación en todos los experimentos<sup>60,68</sup>. El diseño de experimentos se realizó para tres valores de cada variable a optimizar: temperaturas (40°C, 55°C y 70°C), ratios (1/20, 1/8 y 1/2) y composición del disolvente en etanol (25%<sub>w</sub>, 50%<sub>w</sub> y 75%<sub>w</sub>), de modo que se realizaron 17 experimentos con las condiciones que se muestran en la Tabla 6.

Las muestras se ordenaron del 0 al 6 según el tiempo en el que se extrajeron. Se tomó muestra hasta 2 horas de extracción, para analizar la cinética que tiene lugar durante la extracción.

Tabla 6. Experimentos extracción convencional

Exp.	Temperatura (°C)		Ratio S/L		Disolvente	
	°C	-1;0;+1	mg/L	-1;0;+1	%v/v	-1;0;+1
CE01	55	0	0.275	0	50	0
CE02	70	+1	0.275	0	50	0
CE03	40	-1	0.05	-1	25	-1
CE04	55	0	0.5	+1	50	0
CE05	70	+1	0.5	+1	75	+1
CE06	70	+1	0.05	-1	75	+1
CE07	40	-1	0.05	-1	75	+1
CE08	55	0	0.275	0	25	-1
CE09	40	-1	0.275	0	50	0
CE10	55	0	0.275	0	50	0
CE11	40	-1	0.05	-1	75	+1
CE12	55	0	0.275	0	50	0
CE13	55	0	0.05	-1	50	0
CE14	55	0	0.275	0	75	+1

Exp.	Temperatura (°C)		Ratio S/L		Disolvente	
	°C	-1;0;+1	mg/L	-1;0;+1	%v/v	-1;0;+1
CE15	70	+1	0.5	+1	25	-1
CE16	70	+1	0.05	-1	25	-1
CE17	40	-1	0.5	+1	25	-1

### Extracción con pretratamiento con microondas

Una vez se obtuvieron los resultados de los experimentos de extracción convencional, se analizaron en el capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN y se determinaron las condiciones de las extracciones con pretratamiento. De los resultados de rendimiento de extracción se obtuvo que la influencia del ratio es la más significativa, frente a la temperatura y el disolvente. La temperatura que se empleó fue de 70°C, para que no sea un parámetro limitante de la extracción. El disolvente que se empleó fue el de 50%<sub>v/v</sub>, de modo que se redujera el empleo de etanol en las extracciones, lo cual es conveniente, ya que se trata de un disolvente inflamable. El ratio S/L que mayor rendimiento dio como resultado fue el menor, lo cual supone un incremento en la cantidad de disolvente empleada. En este caso, aunque diera mejor resultado un ratio menor, se tomó la decisión de emplear un ratio de 0.5, de modo que se pudiera analizar la extracción cuando se emplea poco disolvente. Cuanto menos disolvente se añade, más favorecido se ve el proceso a mayor escala. Al aplicar las microondas se pretende liberar los polifenoles que se encuentran en el interior del alperujo, para lo que es necesario que la materia prima absorba la energía emitida. Esta energía absorbida es mayor cuanto menor es el volumen de disolvente, absorbiendo éste una menor cantidad de energía.

Inicialmente se realizaron los experimentos con el microondas atmosférico. Como condiciones de la extracción se tomaron inicialmente las siguientes: disolvente 50%<sub>v</sub> etanol, 70°C y ratio sólido/líquido 1/2. Estas condiciones se tomaron para observar el pretratamiento empleando poco disolvente (ratio más bajo) y con un disolvente con menor cantidad de etanol, que resultaría más barato que el más concentrado. Dentro del pretratamiento se empleó siempre la potencia máxima 300W, modificando el tiempo en saltos de 30 s, desde 30 s hasta 180 s.

Con el microondas presurizado se hicieron experimentos con las mismas condiciones de extracción (70°C, ratio S/L 1/2 y disolvente 50%<sub>v</sub>). Del pretratamiento se mantuvo la

potencia constante en 100W y se modificaron las temperaturas alcanzadas. Se hicieron 3 experimentos para cada tipo de pretratamiento (SFME, OWME y SME) alcanzado tres temperaturas: 125°C, 150°C y 175°C. La potencia se mantuvo constante, y dado que los matraces empleados tenían un volumen de la tercera parte, se empleó una potencia de una tercera parte de la empleada en el pretratamiento atmosférico, de modo que los resultados obtenidos se puedan comparar.

## 2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos realizados, que se diseñaron siguiendo el método de diseño de experimento cúbico centrado en las caras, se analizaron con el software Statgraphics. Los resultados se analizaron con el fin de obtener los parámetros estadísticos que ajustan el método de extracción en función de las variables de operación, de modo que se obtienen los parámetros de la ecuación [7], y el p-valor de cada uno de ellos, que representa la influencia de cada uno de ellos sobre la variable de respuesta. El ajuste realizado es de segundo orden, obteniéndose el término de orden cero, los términos de orden uno, que representan el efecto de cada una de las tres variables y los términos de orden dos, que representan las interacciones entre dos variables, distinguiendo entre aquellos que muestran el efecto de una sola variable ( $\beta_{ii}$ ) de aquellos que muestran el efecto de la interacción de dos variables ( $\beta_{ij}$ ),

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_3 \cdot x_3 + \beta_{11} \cdot x_1^2 + \beta_{22} \cdot x_2^2 + \beta_{33} \cdot x_3^2 + \beta_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + \beta_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + \beta_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 \quad [9]$$

, donde  $y$  es la variable de respuesta,  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$  son las variables de entrada o condiciones de los experimentos,  $\beta_0$  el coeficiente de regresión de orden cero,  $\beta_i$  los coeficientes de regresión de primer orden y  $\beta_{ij}$  los coeficientes de regresión de segundo orden<sup>69</sup>.

Del análisis de la varianza (ANOVA) se obtienen el p-valor de cada una de las tres variables y de las diferentes combinaciones de ellas. Este valor representa el efecto de esta variable sobre la variable de respuesta. Cuanto menor sea el p-valor, mayor es la influencia de la variable sobre la respuesta del sistema. Normalmente se considera un valor por debajo del cual se asume que la influencia de dicho parámetro, ya sea una variable (orden uno) como la combinación de dos (orden dos), es significativa sobre la variable a estudiar. En nuestro caso consideramos que un valor inferior a 0.05 del p-valor es suficientemente significativo.

Para obtener un estudio más detallado de la variable de respuesta frente a las variables, se representaron los efectos principales de las variables sobre la respuesta. Para observar las posibles interacciones entre las diferentes condiciones de operación se representaron las curvas de interacción binaria, que demuestran la evolución de la respuesta del sistema frente a dos únicas variables. De existir una interferencia entre ambas se mostraría en esta gráfica un corte entre las curvas para una pareja de variables, mostrando una

evolución distinta. Si las dos rectas de la interacción binaria muestran la misma pendiente, esto significa que no muestran interferencias entre ellas.

La superficie de respuesta es la representación tridimensional de la variable de respuesta, obteniéndose de este modo el punto óptimo. Este valor viene dado directamente por el software empleado, que calcula de manera automática el valor óptimo, mostrando las condiciones que favorecen que el valor de la variable de respuesta sea lo mayor posible. De este modo obtienes el máximo valor de esa variable que puedes obtener trabajando con valores dentro de los límites de las variables de entrada.

No todas las variables de las ecuaciones cinéticas se pueden estudiar con este método, sino que existen limitaciones. Con el estudio ANOVA se obtiene un valor de  $R^2$  que nos permite estimar el ajuste de los parámetros obtenidos a la respuesta real obtenida. Si este valor no es lo suficientemente alto, no es posible asegurar que el modelo estimado sirva para representar la evolución de la variable de respuesta en función de las variables de entrada o condiciones. Existe otro término,  $R^2$  ajustada, que representa la fiabilidad del ajuste de la variable de respuesta al modelo estimado, pero en este caso considerando únicamente las variables que muestran un efecto significativo. Si el valor de este segundo término es lo suficientemente elevado, se puede considerar que ajusta el modelo tomando únicamente aquellas variables e interacciones cuyo p-valor sea menor que 0.05.



# CAPÍTULO 3

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las extracciones se dividen en dos apartados: el análisis de las cinéticas de extracción referidas a los polifenoles totales y el análisis de los compuestos que se obtienen en cada extracción mediante HPLC. Por un lado, se pretende maximizar la extracción de polifenoles, comparando la extracción convencional con la extracción tras un pretratamiento con microondas, y a la vez conocer que compuestos se extraen en mayor concentración con cada conjunto de condiciones.

#### 3.1. CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN

Durante los experimentos de extracción, se tomaron muestras en varios tiempos para observar la evolución temporal de los polifenoles totales mediante el método TPC. De cada muestra se obtuvo la concentración de polifenoles totales y se evaluó el residuo seco, siguiendo los procedimientos anteriormente descritos. Para analizar los resultados se emplearon dos términos: rendimiento de extracción y riqueza. El rendimiento se emplea para medir la cantidad de polifenoles extraídos por cada gramo de alperujo, como se expresa en [8]. La riqueza, sin embargo, expresa la cantidad de polifenoles extraídos por cada gramo de extracto seco en la muestra, dando una idea de la calidad del extracto obtenido. Se calcula con la ecuación [9].

$$\text{Rendimiento} \left( \frac{\text{mg}_{GAE}}{\text{g}_{alperujo,seco}} \right) = \frac{\text{concentración} \left( \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right)}{1000 \cdot \frac{S}{L} \cdot \left( 1 - \% \frac{\text{humedad}}{100} \right)} \quad [10]$$

$$\text{Riqueza} \left( \frac{\text{mg}_{GAE}}{\text{g}_{extracto,seco}} \right) = \frac{\text{concentración} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{\text{residuo seco} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right)} \quad [11]$$

El análisis de las cinéticas se realizó únicamente para los valores de rendimiento, ajustando la velocidad de extracción a una cinética de primer orden. De este modo, el rendimiento se ajustó a la ecuación [10],

$$C = C_0 + C_{INF} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad [12]$$

, donde C es el rendimiento de extracción para un tiempo t, C<sub>0</sub> es el rendimiento inicial, C<sub>INF</sub> es la diferencia entre el rendimiento final y el rendimiento inicial, ambas en mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DM</sub> y k es la constante de tiempo, en s<sup>-1</sup>.

En la Figura 8 se muestra la evolución del rendimiento en un experimento de extracción convencional y en la Figura 9 el rendimiento de una extracción asistida con microondas. En ambas gráficas se ajustan los datos experimentales a la ecuación [10]. En azul se muestran los puntos experimentales y en naranja la curva de ajuste.

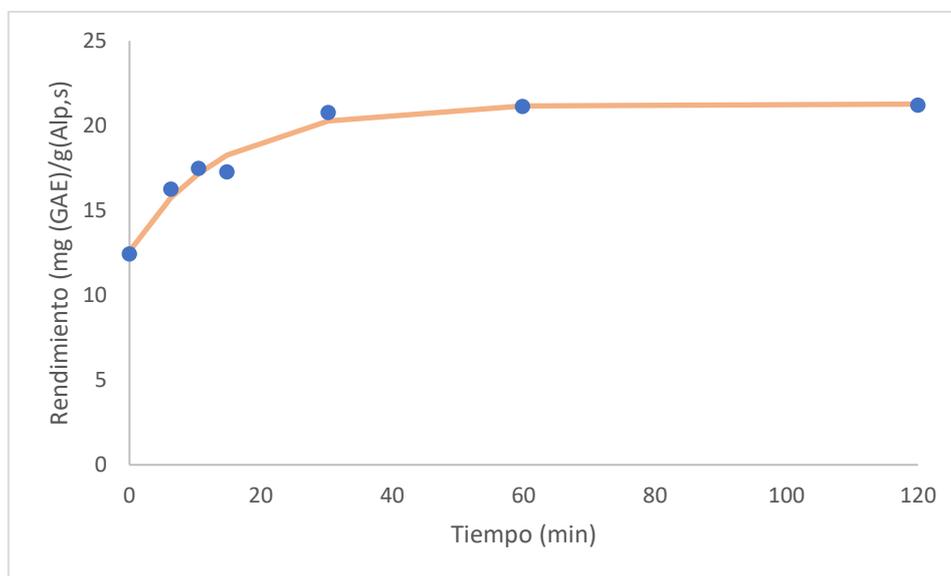


Figura 8. Cinética de extracción CE 02

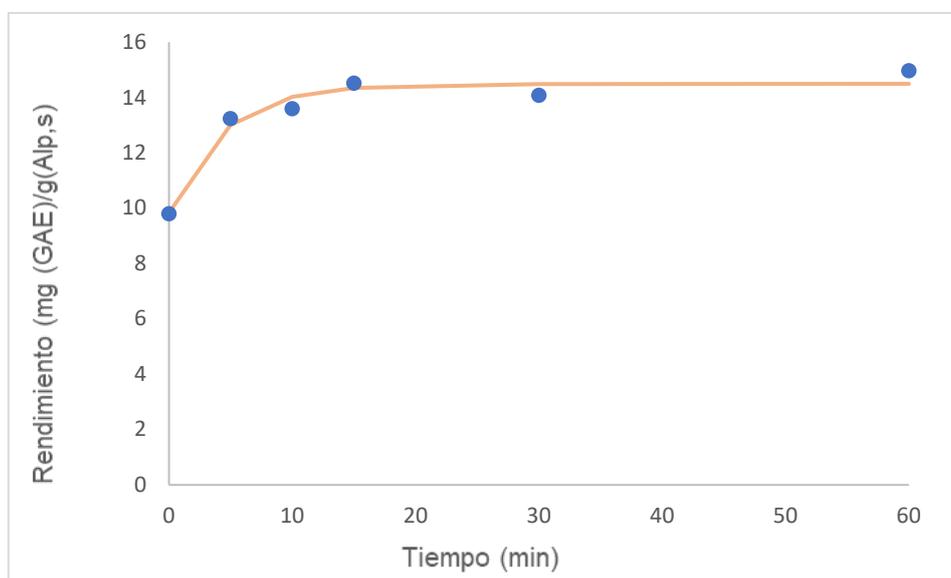


Figura 9. Cinética de extracción SME 02

Con las extracciones se pretende aumentar el valor de  $C_{INF}$ , que indica el rendimiento de la extracción posterior. Cuanto mayor es este valor, mayor es la cantidad de polifenoles extraídos en el tiempo que dura la extracción. En cuanto a la constante de tiempo,  $k$ , cuanto mayor es su valor indica que se alcanza más rápido el rendimiento final, mientras

que, si es pequeña, puede que no se haya alcanzado el valor final del rendimiento, quedando todavía polifenoles por extraer. En cuanto a  $C_0$ , este rendimiento indica la cantidad de polifenoles que no se encuentran ligados a la materia vegetal, sino que se encuentran libres en la humedad, y que, por lo tanto, se pueden extraer sin necesidad de incrementar la temperatura, sino simplemente mezclando el alperujo con el disolvente. A partir de la ecuación [10] se obtiene la velocidad inicial,  $u_0$ , que representa la derivada del rendimiento cuando  $t = 0$  s.

$$u_0 = \left. \frac{dC}{dt} \right|_{t=0} = C_{INF} \cdot k \quad [13]$$

La velocidad inicial representa la pendiente del rendimiento, de modo que cuanto mayor es el valor que toma, más rápido se alcanza el agotamiento de la extracción de polifenoles. Es un parámetro que se pretende optimizar con el pretratamiento con microondas, acelerando la extracción de polifenoles.

En los experimentos realizados, se tomaron muestras para varios tiempos de extracción. En el tiempo cero se tomó una muestra para analizar los polifenoles libres. Posteriormente se tomaron muestras. En el caso de la extracción convencional fueron seis, hasta 2 horas de extracción, en el caso de emplear el microondas atmosférico cinco, hasta 1 hora de extracción, y en el caso del microondas presurizado tres, hasta media hora de extracción. El tiempo de extracción se redujo debido a que, a la vista de los resultados experimentales, en la última hora de extracción no se modificaba el rendimiento final. En el último caso, debido al volumen de los recipientes de extracción, únicamente se podía extraer una muestra de cada matraz, por lo que se redujo el número de muestras, tomando una en tiempo cero, otra a los 10 minutos y otra a la media hora. Una vez representados los resultados se comprobó que la extracción estaba finalizada analizando las cinéticas.

### **Resultados Extracción Convencional**

El análisis de la extracción se realizó inicialmente sobre los experimentos de extracción convencional, que sirven como muestras de control y observar los cambios generados por los pretratamientos aplicados.

Una vez hechos los experimentos, se analizaron las muestras extraídas y se calcularon los parámetros de rendimiento y riqueza. Los valores de rendimiento se representaron gráficamente los valores frente al tiempo y se ajustaron por el método de mínimos cuadrados a la ecuación [3], obteniendo los valores que se muestran en el *anexo xx*, junto con la varianza de cada ajuste.

Los datos de la riqueza del extracto obtenido también se representaron frente al tiempo, observando la evolución temporal. Estos resultados obtenidos no muestran una tendencia con el tiempo, sino que se mantienen en valores cercanos, aumentando o disminuyendo con el tiempo. Esto se debe a que la velocidad de extracción de los polifenoles y del resto de compuestos es similar, por lo que no aparece una clara evolución de la riqueza. Esto no sucede en otras materias primas distintas del alperujo, como el orujo de uva<sup>53</sup>. De este modo, el único modo de analizar la riqueza es tomando el valor medio en cada extracción de los cuatro valores de cada experimento, ya que el residuo seco solo se analizó en cuatro muestras. El objetivo de las extracciones es observar la evolución de la riqueza de modo que, si a partir de determinado tiempo de extracción, el valor disminuye, sería necesario parar la extracción antes y de este modo obtener un valor mayor. Posteriormente, habría que analizar, de manera conjunta con el rendimiento, las condiciones que favorecen que ambas sean mayores y el tiempo de extracción a partir del cual no se observa un aumento de ambas dos.

Los resultados obtenidos de las extracciones se analizaron por el método de superficie de respuesta (RSM) con el software Statgraphics. Con este método se obtuvieron las interacciones existentes entre las tres variables a estudiar: el ratio sólido/líquido, la composición del disolvente y la temperatura de la extracción. Con este método se analizaron tanto los tres parámetros de la expresión cinética del rendimiento [3], como el valor medio de la riqueza de las extracciones. Del análisis RSM se obtuvo el valor-p con el análisis ANOVA de las variables de entrada y sus interacciones, indicando la influencia de dichas variables sobre la variable de respuesta. Con este método se analizaron las dos principales del rendimiento final y de la velocidad inicial. Adicionalmente, se obtuvieron las gráficas de interacción binaria, las gráficas de los efectos principales, la superficie de respuesta y el valor óptimo para cada una de las variables de respuesta estudiadas.

Los dos parámetros fundamentales de la extracción son el rendimiento final y la velocidad inicial, ya que con ellos se obtiene una idea de la extracción máxima que se puede obtener en esas condiciones y de la rapidez con la que se alcanza.

#### Análisis rendimiento final

El modelo desarrollado para evaluar la respuesta del rendimiento final  $C_F$  frente a las tres condiciones de extracción da como resultado que las variables cuyo efecto sobre el rendimiento final es significativo son la temperatura (p-valor = 0.0094), el ratio S/L (p-valor = 0.0000), el disolvente (p-valor = 0.0043), el ratio de segundo orden (BB, p-valor = 0.0321) y la interacción entre el ratio S/L y el disolvente (BC, p-valor = 0.0090), ya que su p-valor es menor que 0.05. De estas variables, el ratio S/L es la que presenta un p-valor menor, lo que indica que es la que mayor influencia presenta sobre el rendimiento final. El modelo de regresión se puede simplificar, empleando únicamente estas variables descritas anteriormente, obteniéndose un modelo que ajusta la respuesta de  $C_F$  en un 96% ( $R^2=0.9612$ ). De este modo, se podría simplificar el modelo, reduciendo el número de parámetros necesarios.

A continuación, se muestra la tabla ANOVA y las gráficas principales para el rendimiento final de extracción.

Tabla 7. Tabla ANOVA análisis  $C_f$

Fuente	Suma de	Gl	Cuadrado	Razón-F	Valor-P
	Cuadrados		Medio		
A: Temperatura	12,3113	1	12,3113	12,58	0,0094
B: Ratio S/L	342,765	1	342,765	350,23	0,0000
C: Disolvente	16,7942	1	16,7942	17,16	0,0043
AA	2,18407	1	2,18407	2,23	0,1789
AB	0,577238	1	0,577238	0,59	0,4676
AC	0,728744	1	0,728744	0,74	0,4168
BB	6,96279	1	6,96279	7,11	0,0321
BC	12,5469	1	12,5469	12,82	0,0090
CC	4,9306	1	4,9306	5,04	0,0597
Error total	6,85079	7	0,978684		
Total (corr.)	403,97	16			

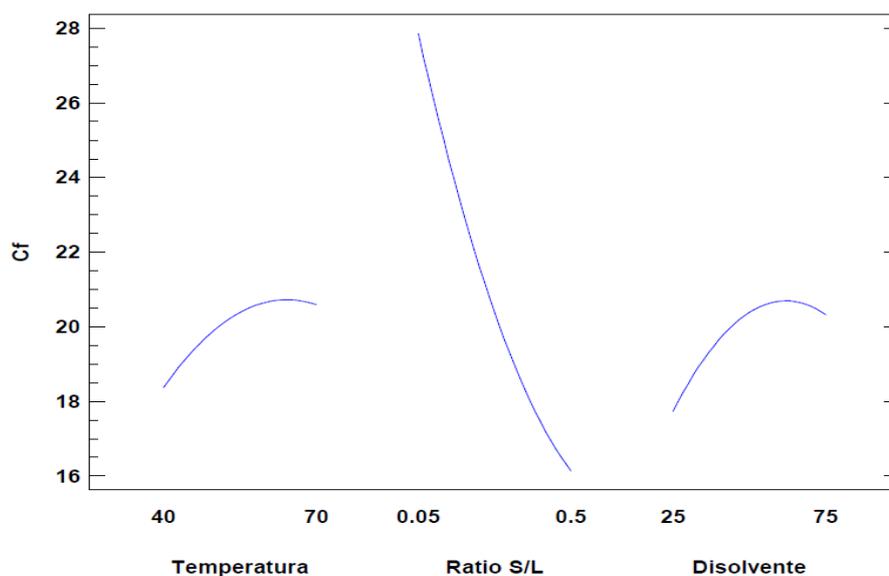


Figura 10. Efectos principales  $C_f$

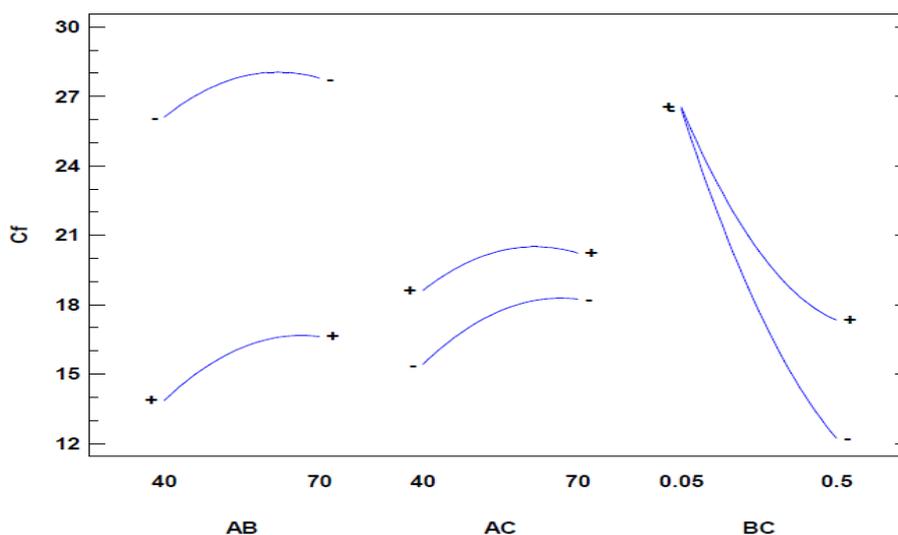


Figura 11. Interacciones binarias  $C_f$

De estas gráficas podemos deducir el comportamiento que presenta  $C_f$  en función de las variables principales (Figura 8) y en función de las interacciones entre ellas (Figura 9). En la Figura A observamos como el rendimiento de extracción aumenta según lo hace la temperatura (A), obteniendo un punto máximo, así como el disolvente (C), que también presenta un valor máximo dentro de los límites estudiados. Sin embargo, para el ratio S/L (B) se observa como el valor que maximiza el rendimiento es 0.05, el extremo inferior. Esto indica que con valores inferiores del ratio S/L se podrían obtener rendimientos mayores. No obstante, no interesa estudiar esa posibilidad ya que un ratio de 0.05 g/ml

ya es suficientemente pequeño, ya que implica que para cada gramo de alperujo es necesario añadir 20ml de disolvente.

En cuanto a las interacciones binarias, en el caso de las parejas AB (temperatura-ratio S/L) y AC (temperatura-disolvente), muestran la misma evolución ambas curvas, de modo que se puede extraer que no se producen interferencias entre ambas parejas de condiciones. Respecto al par de variables ratio S/L y disolvente, se observa como cuando el valor del ratio es bajo, la influencia de la composición del disolvente no influye, ya que se observa que el rendimiento que se obtendría sería igual para una concentración de 25%<sub>v/v</sub> (-) que para una concentración de 75%<sub>v/v</sub> (+). No obstante, cuando el ratio es de 0.5, el rendimiento se ve incrementado cuanto mayor es la concentración de etanol en el disolvente.

La influencia predominante del ratio S/L se debe a que al aumentar el volumen de disolvente que añadimos por cada gramo de alperujo, los gradientes de concentración son mayores, favoreciendo una cinética de extracción más rápida. Cuanto mayor es la cantidad de disolvente por cada gramo de alperujo, mayor superficie de contacto entre materia y disolvente, explicando el incremento observado en el rendimiento final.

La composición del disolvente influye debido a la afinidad que presentan ante ambos disolventes los compuestos fenólicos. Los polifenoles son compuestos polares, de modo que para su extracción conviene emplear disolventes que también sean polares<sup>10</sup>. Con compuestos apolares, como el hexano, se logra extraer los aceites residuales que puedan quedar en el alperujo<sup>60</sup>. La composición de etanol del disolvente influye de manera que cuanto mayor es dicha concentración, mayor es el rendimiento. No obstante, muestra un máximo para una concentración menor al 75%<sub>v/v</sub>.

La temperatura es el factor que menos influye de los tres, como muestra el estudio de la varianza. No obstante, cuanto mayor es la temperatura, mayor es  $C_F$ , hasta una temperatura en torno a los 65°C, en el que se estabiliza. La temperatura es, por lo tanto, un factor poco determinante. No presenta interferencias con ninguna de las otras variables, que podrían modificar la decisión de la temperatura de extracción. Si que se puede apreciar que a temperaturas por debajo de los 50°C la extracción es demasiado baja. La influencia de la temperatura se debe a la degradación de las paredes por el

aumento de la temperatura, el incremento de la transferencia de materia favorecido por mayores temperaturas y por el incremento de la solubilidad de los polifenoles en el disolvente a temperaturas mayores. La temperatura empleada presenta un máximo, debido a la descomposición y degradación de algunos compuestos de interés<sup>13</sup>.

Por último, se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción con objeto de maximizar la extracción de polifenoles, obteniendo un rendimiento máximo de 28.05 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DM</sub> para valores dentro de los límites estudiados. Las condiciones para obtener dicho valor son: temperatura de extracción 62°C, ratio S/L de 0.05 g/ml y 49%<sub>v/v</sub> de etanol en el disolvente.

#### Análisis de la velocidad inicial de extracción

La velocidad inicial de extracción, [11], es un parámetro fundamental de la cinética de extracción, de manera que se pretende optimizar dicho parámetro, de manera que se logre una misma extracción en el menor tiempo posible. El modelo de ajuste realizado se ajusta en un 77% a la respuesta de la variable ante las condiciones de experimentación. A continuación, se muestran los principales resultados del estudio estadístico.

Tabla 8. Tabla ANOVA análisis Uo

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A: Temperatura	0,27774	1	0,27774	8,32	0,0235
B: Ratio S/L	0,111041	1	0,111041	3,33	0,1109
C: Disolvente	0,0732142	1	0,0732142	2,19	0,1821
AA	0,00847907	1	0,00847907	0,25	0,6297
AB	0,00636591	1	0,00636591	0,19	0,6755
AC	0,245171	1	0,245171	7,35	0,0302
BB	0,00383577	1	0,00383577	0,11	0,7445
BC	0,0174971	1	0,0174971	0,52	0,4925
CC	0,00910515	1	0,00910515	0,27	0,6176
Error total	0,233633	7	0,0333762		
Total (corr.)	0,983366	16			

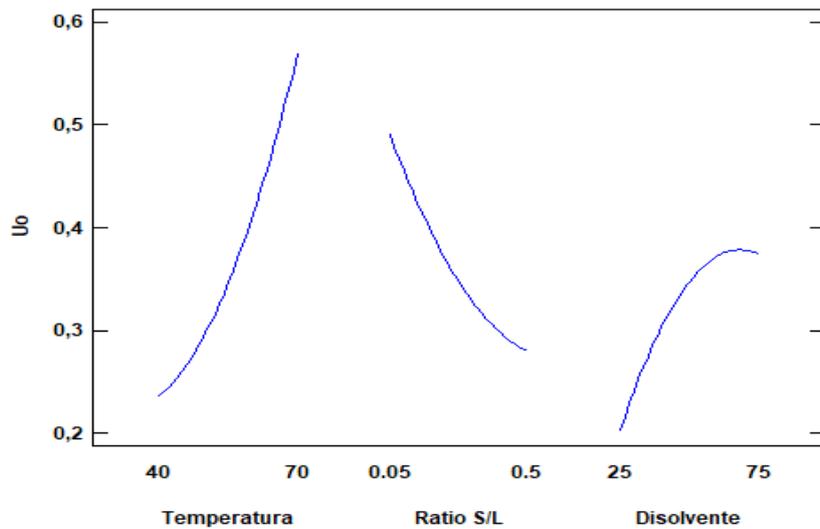


Figura 12. Efectos principales  $U_o$

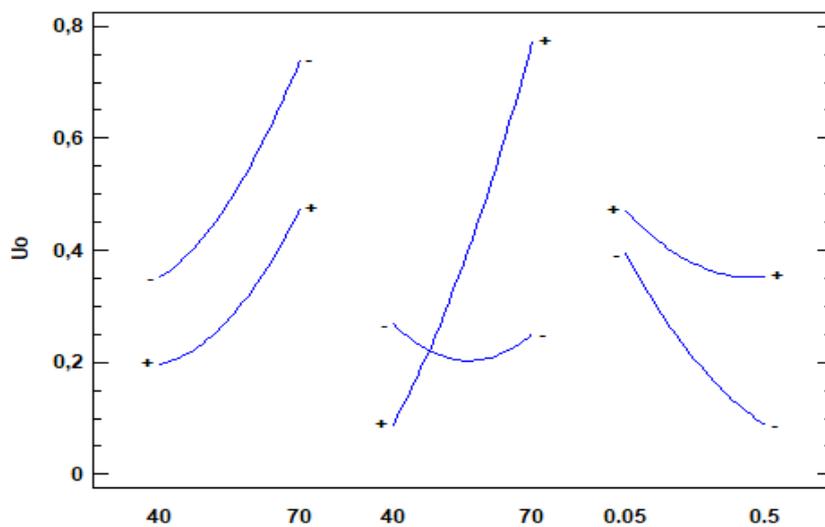


Figura 13. Interacciones binarias  $U_o$

El estudio ANOVA de la velocidad inicial dio como resultado que los parámetros que mayor influencia presentan sobre la variable de respuesta son la temperatura ( $p$ -valor = 0.0235) y la interacción entre la temperatura y el disolvente ( $p$ -valor = 0.0302). No obstante, el modelo no puede ser explicado únicamente por la influencia de estos dos parámetros.

El efecto de las tres variables de extracción sobre la velocidad inicial es el mismo que sobre el rendimiento final, aumentando cuando aumenta la temperatura y la concentración del disolvente y cuando disminuye el ratio S/L. Sin embargo, en el caso de la velocidad inicial, la variable que mayor pendiente muestra en la Figura 10 es la

temperatura en lugar del ratio S/L, de modo que si se quiere obtener una velocidad inicial superior, es más efectivo incrementar la temperatura. Esto se debe a que al aumentar la temperatura lo hace la constante de transferencia de materia, aumentando la velocidad, y a la vez que se degrada la pared celular, liberando los polifenoles al disolvente. El reducir el ratio S/L se consigue que la concentración de polifenoles en el disolvente sea menor, haciendo que el gradiente de concentraciones sea mayor, y con ello la velocidad de extracción. En el caso del disolvente, hay un máximo de velocidad para una concentración superior al 50%, y para valores superiores disminuye la velocidad. Dado que la velocidad es mayor cuanto mayor es la concentración de etanol, esto muestra que la afinidad de estos compuestos es mayor por el etanol que por el agua.

Respecto a la interacción entre las distintas variables, dentro de los límites de dichas variables, la única interacción que se observa en la Figura 11 es la interacción entre la temperatura y el disolvente. Fuera de los límites, para muestras más diluidas, se produciría una interacción entre el ratio y el disolvente, de modo que la influencia del disolvente sobre la velocidad fuera nula. Según disminuye el ratio, así lo hace la influencia del disolvente sobre la variable de respuesta. La interacción entre temperatura y disolvente implica que para concentraciones elevadas de etanol, la influencia de la temperatura es predominante, aumentando la velocidad cuando lo hace la temperatura, mientras que, cuando la concentración es baja, la velocidad se mantiene en un mismo valor dentro del rango de temperaturas.

El valor óptimo para la velocidad inicial de extracción que devuelve el estudio estadístico viene dado por las siguientes variables: 70°C, 0.05 g/ml y 75%<sub>V/V</sub> etanol. El valor óptimo de la velocidad es 0.897 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>alp,seco</sub>·s. Con la extracción con microondas se pretende incrementar tanto el rendimiento final como esta variable.

En el caso del análisis de la riqueza el modelo desarrollado con el método ANOVA resultó con un valor de R<sup>2</sup> de 0.6311. El valor es demasiado pequeño como para poder sacar conclusiones sobre el valor medio de la riqueza en los experimentos realizados. Estos resultados no son sorprendentes, debido a la reducida variación que presenta en todos los experimentos, oscilando en torno a un valor, pero sin observarse una evolución temporal. Del análisis de la riqueza no se pueden obtener resultados claros, de modo que

no se puede obtener el punto óptimo para obtener el extracto con una mayor riqueza, lo cual implica una mayor calidad del producto obtenido.

Del análisis de los parámetros cinéticos de la extracción convencional, se obtuvieron aquellas condiciones más favorables para la extracción, que luego se adaptaron en función de los objetivos para realizar la extracción con microondas. La temperatura influyó de manera positiva, tanto para el rendimiento como para la velocidad inicial, de modo que las temperaturas elevadas favorecen la extracción. Como el incremento de la temperatura de extracción no supone una limitación, la extracción con pretratamiento se realizará a esta temperatura. Respecto al disolvente, el incremento de la concentración favorece ambos parámetros a optimizar. No obstante, respecto al rendimiento final, presenta un valor máximo, por encima del cual el rendimiento disminuye. Dado que el etanol es un líquido inflamable, la reducción de la concentración en el disolvente empleado es deseable, empleando en los experimentos posteriores el disolvente con la concentración 50%<sub>v/v</sub>. Respecto al ratio S/L, la reducción de dicho parámetro incrementa ambas variables cinéticas. Sin embargo, para el pretratamiento, cuanto menor sea la cantidad de disolvente por gramo de alperujo más fácil es el escalado del proceso y menor es el consumo, de energía y de disolvente, de modo que para los siguientes experimentos se empleó un ratio 0.5 g/ml.

#### **Resultados Extracción con microondas**

Los experimentos con pretratamiento con microondas se compararon con los resultados del experimento CE 18, en el que se realizó la extracción convencional con las mismas condiciones de extracción. Dentro de los pretratamientos se estudió el empleo de disolvente etanol/agua, agua o la ausencia de disolvente con el objetivo de ver bajo qué condiciones se maximiza la extracción.

La aplicación de microondas se realizó en dos medios distintos. En primer lugar, el microondas atmosférico, en el que se aplican las microondas sobre el medio de extracción, estando éste sin cerrar, pudiendo evaporarse parte del disolvente y de la humedad. Por otro lado, el microondas Anton Paar, se emplea para aumentar la intensificación, ya que no sólo se calienta la muestra, sino que además se alcanzan presiones en torno a 10bar, que pueden favorecer la extracción.

Respecto al tiempo de pretratamiento, en el microondas atmosférico, para cada conjunto de condiciones de operación se realizaron varios experimentos, modificando el tiempo de pretratamiento, anotando la temperatura máxima alcanzada. En el microondas presurizado, por el contrario, se controló la temperatura máxima alcanzada, anotando el tiempo de tratamiento. La potencia se mantuvo constante en ambos casos, empleando una potencia de 300W para el microondas atmosférico y de 100W para el presurizado. Se emplearon dos potencias distintas porque en el microondas presurizado el volumen del medio de extracción es una tercera parte del empleado en el atmosférico, de modo que al igualar la relación potencia/volumen los resultados sean comparables.

En la Figura 12 se muestra la evolución de la temperatura en los experimentos en los que se aplica el pretratamiento.

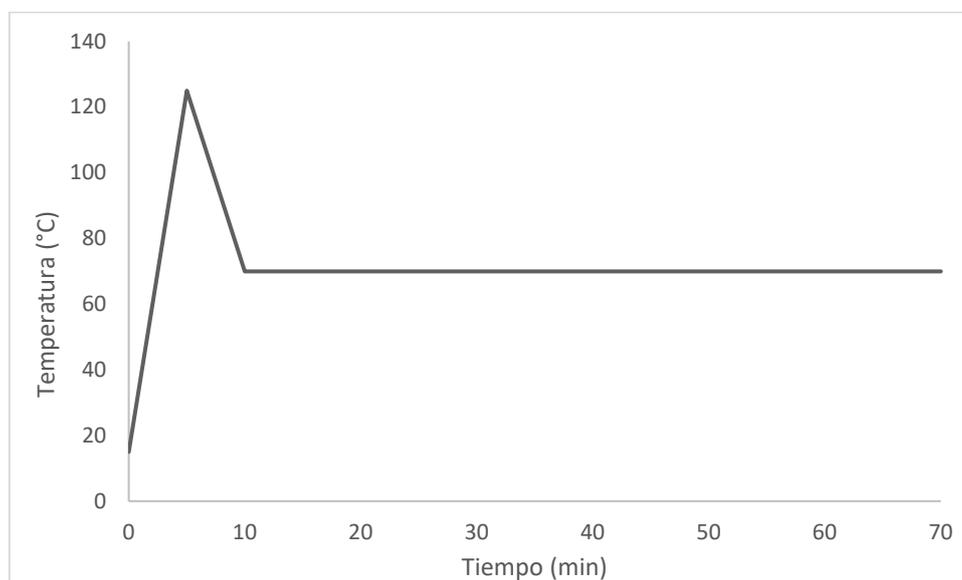


Figura 14. Temperatura extracción con microondas

Dado que el análisis de la riqueza, para las extracciones convencionales, no fue concluyente, dando valores alternos sin una clara evolución, en estos experimentos no se consideró su cálculo. Esto se debe a que las velocidades de extracción de otros compuestos son similares a la velocidad de extracción de polifenoles, de modo que la riqueza se mantiene en torno a unos valores.

#### Rendimiento final

En primer lugar, se analizó el efecto de la aplicación de microondas sobre el rendimiento final de la extracción, comparando los resultados obtenidos en los experimentos

En la Tabla 9 se muestran los resultados de aquellas extracciones de cada tipo de en las cuales se obtuvieron los mayores rendimientos finales de extracción. También se muestra el incremento relativo del rendimiento,  $\Delta C_{\infty}$ , con respecto a la extracción de control (CE 18).

Tabla 9. Resultados rendimiento final de extracción MAE

<b>Tipo extracción</b>	<b>Exp.</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b><math>C_{\infty}</math> (mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DM</sub>)</b>	<b><math>\Delta C_{\infty}</math> (%)</b>
Convencional	CE 18	-	-	11,08	-
MW atmosférico	SFME 05	150	101,1	18,33	65%
MW atmosférico	OWME 03	90	95.7	16,47	49%
MW atmosférico	SME 04	120	83.5	15,76	42%
MW presurizado	SFME 03	110	175	15,14	37%
MW presurizado	OWME 03	45	175	16,01	44%
MW presurizado	SME 03	150	175	17,86	61%

El rendimiento final de cada experimento,  $C_{\infty}$ , se analizó con la ecuación [12], calculando el incremento relativo del rendimiento final de cada extracción con respecto a la extracción convencional.

$$\Delta C_{\infty} = \frac{C_{\infty}|_{MAE} - C_{\infty}|_{CE}}{C_{\infty}|_{CE}} \cdot 100 \quad [14]$$

Como se muestra en la Tabla 9, los experimentos en los que se observa un mayor incremento del rendimiento final fueron aquellos en los que el pretratamiento se realiza sin disolvente, SFME, cuando se opera a presión atmosférica, y aquellos en los que se añadió tanto el etanol como el agua, SME, en el caso del microondas presurizado. Se obtiene un rendimiento final 65% y 61% superior, respectivamente.

Para el microondas atmosférico, los resultados óptimos vienen dados para el tratamiento sin disolvente, logrando que la humedad del alperujo se caliente y evapore, con lo que se consigue que los polifenoles se extraigan con mayor facilidad. Las extracciones sólo con agua, OWME, dieron resultados similares a aquellas que se realizaron con etanol/agua, con rendimientos de extracción de 16.47 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DM</sub> y 15.76 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DM</sub>, respectivamente.

En el caso del microondas presurizado, los resultados óptimos vienen dados para el tratamiento con etanol/agua, obteniendo un rendimiento máximo de 17.86 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DM</sub>. Los experimentos que peor resultado dieron fueron las extracciones SFME a presión, incrementando únicamente el rendimiento final un 37%. En el caso del microondas presurizado, al tener una etapa de refrigeración con aire, la extracción con disolvente se ve favorecida, ya que dicha extracción comienza en esta etapa, mientras que en los experimentos SFME, al no haber disolvente, la extracción no comienza hasta que se añade. La extracción con disolvente se ve favorecida, frente a la extracción con agua, en estas condiciones, debido a la mayor volatilidad de la mezcla etanol/agua.

Los óptimos para todos los tipos de extracción aparecen para tiempos de tratamiento con microondas elevados, en los que se alcanzan las temperaturas superiores. De este modo se puede concluir que la extracción se ve favorecida por altas temperaturas y altos tiempos de tratamiento con microondas. No obstante, los experimentos se realizaron para tiempos de pretratamiento inferiores a 3 minutos, ya que tiempos de residencia mayores no son viables, tanto por la posible degradación de los polifenoles, como por la limitación que supone a nivel industrial un tiempo de residencia elevado.

#### Velocidad inicial de extracción

Por otro lado, la velocidad inicial se analizó únicamente para las extracciones con pretratamiento en el microondas atmosférico. Las extracciones en el microondas presurizado, debido a la etapa de enfriamiento, no se pudo obtener el rendimiento inicial de manera instantánea, por lo que la velocidad inicial no se analizó.

Tabla 10. Resultados velocidad inicial de extracción MAE

<b>Tipo extracción</b>	<b>Exp.</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>u<sub>0</sub> (mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DM</sub>·s)</b>	<b>Δu<sub>0</sub> (%)</b>
Convencional	CE 18	-	-	0,62	-
MW atmosférico	SFME 05	150	101,1	3,35	440%
MW atmosférico	OWME 03	90	95.7	2,11	240%
MW atmosférico	SME 04	120	83.5	1,56	151%

Al igual que en el apartado anterior, se calculó el incremento relativo de la variable con respecto a la extracción control, mediante la ecuación [13].

$$\Delta u_0 = \frac{u_0|_{MAE} - u_0|_{CE}}{u_0|_{CE}} \cdot 100 \quad [15]$$

El experimento que mayor velocidad inicial mostró fue el experimento SFME 05, con una velocidad inicial 440% superior a la velocidad inicial de extracción del experimento CE 18. Esto se debe a que la aplicación de las microondas directamente sobre el alperujo libera los polifenoles, de modo que, al añadir el disolvente, estos pasan al disolvente con mayor rapidez. En los experimentos con disolvente y agua, la energía de las microondas es absorbida por el alperujo, pero también por el disolvente, de modo que los polifenoles no se liberan tan rápidamente, dando velocidades de extracción inferiores a la extracción sin disolvente, pero superiores un 240% (OWME) y 150% (SME) a la extracción convencional.

Al igual que para el rendimiento final de extracción, la velocidad inicial se ve favorecida por tiempos de pretratamiento elevados.

#### Riqueza

Con la ecuación [9] se calcularon los valores de la riqueza para cada experimento de extracción asistida con microondas, empleando el valor del residuo seco calculado.

Al igual que en las extracciones convencionales, los valores de la riqueza obtenidos no manifiestan variaciones significativas que puedan derivar en un análisis más detallado.

#### **Conclusiones de las cinéticas de extracción**

Con la aplicación del pretratamiento con microondas se pretende intensificar la extracción de polifenoles del alperujo, tomando como objetivo incrementar el rendimiento final de extracción, que representa los polifenoles totales extraídos, y la velocidad inicial.

A la vista de los resultados, con los experimentos de extracción asistida con microondas se logra incrementar la extracción de polifenoles de manera considerable, empleando únicamente de 30-180 s de pretratamiento, que supone un gran impacto respecto al tiempo global de extracción. El rendimiento de extracción máximo obtenido es de 18.33mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DM</sub>, un 65% superior al rendimiento de la extracción convencional.

Respecto a la velocidad inicial de extracción, se logra incrementarla en mayor medida que el rendimiento. Se obtienen velocidades hasta un 440% superior a la velocidad de la extracción CE 18. El incremento de la velocidad se debe a que, el alperujo, al absorber la energía de las microondas, libera los polifenoles, que durante la extracción difunden al disolvente con una velocidad mayor. Dado que la velocidad de extracción es superior aplicando el pretratamiento, el tiempo total de extracción se puede reducir, facilitando el posterior escalado de la extracción.

El pretratamiento que mejores resultados dio de velocidad de extracción y rendimiento final alcanzado fue el pretratamiento sin disolvente (SFME) a presión atmosférica. La aplicación de las microondas sobre la materia prima directamente resulta más efectiva que aplicar la energía sobre la mezcla de materia prima y disolvente, lo cual resulta beneficioso para el proceso a nivel industrial, reduciendo el volumen sobre el que se aplican las microondas para tratar un mismo volumen, y sin introducir disolventes inflamables que compliquen la seguridad del proceso.

El pretratamiento con agua tiene como objetivos reducir el disolvente añadido a la materia prima, reduciendo el consumo energético, a la vez que se reduce la temperatura alcanzada por el etanol, que es un compuesto inflamable. Los resultados atmosféricos dieron valores de rendimiento similares y velocidades de extracción superiores. No obstante, dado que los valores óptimos alcanzados se obtuvieron para los experimentos sin disolvente, estos últimos siguen siendo los más adecuados.

La extracción con disolvente en el microondas presurizado dio un rendimiento de extracción final similar al obtenido en los experimentos SFME atmosféricos. No obstante, esta extracción requiere un mayor consumo y una mayor complejidad, debido a la necesidad de equipos que soporten presiones elevadas.

El análisis de la riqueza, en los experimentos de extracción convencional, no permitió obtener un tiempo de extracción óptimo, en el cual la riqueza de la extracción fuera óptima, como se observa en la extracción de polifenoles de la uva<sup>53</sup>. Es la extracción de polifenoles del residuo de uva se observa que la riqueza disminuye para tiempos de extracción elevados, mientras que el rendimiento se mantiene. Esto se debe a que las velocidades de extracción de los polifenoles y del resto de compuestos son distintas. Para

el alperujo no se observa esta evolución, por lo que no podemos afirmar que las velocidades de extracción sean distintas.

En el ANEXO 2. RESULTADOS RENDIMIENTO Y RIQUEZA se recogen los datos obtenidos del ajuste de los resultados experimentales a la ecuación [10] de las extracciones asistidas con microondas.

### 3.2. FLAVONOIDES

El análisis de los flavonoides es el mismo que el análisis que se realiza a los polifenoles totales, obteniendo el rendimiento de extracción y la riqueza con las ecuaciones [8] y [9] respectivamente. La cinética de extracción demostró ser también de primer orden, siguiendo la ecuación [10].

En la Figura 12y en la Figura 13 se muestran dos cinéticas de extracción de flavonoides, la primera correspondiente al experimento CE 04 y a segunda al SFME 03.

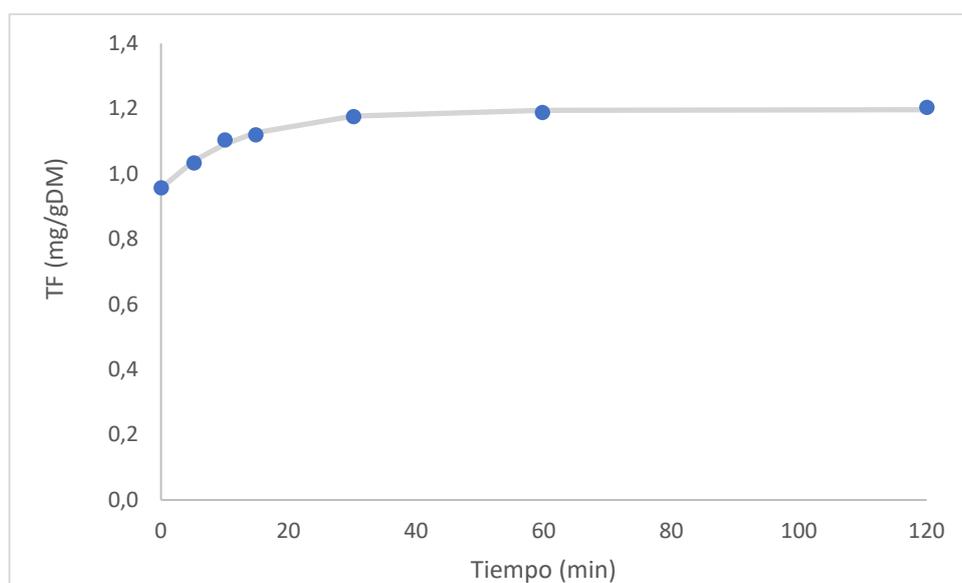


Figura 15. Rendimiento de extracción de flavonoides CE 04

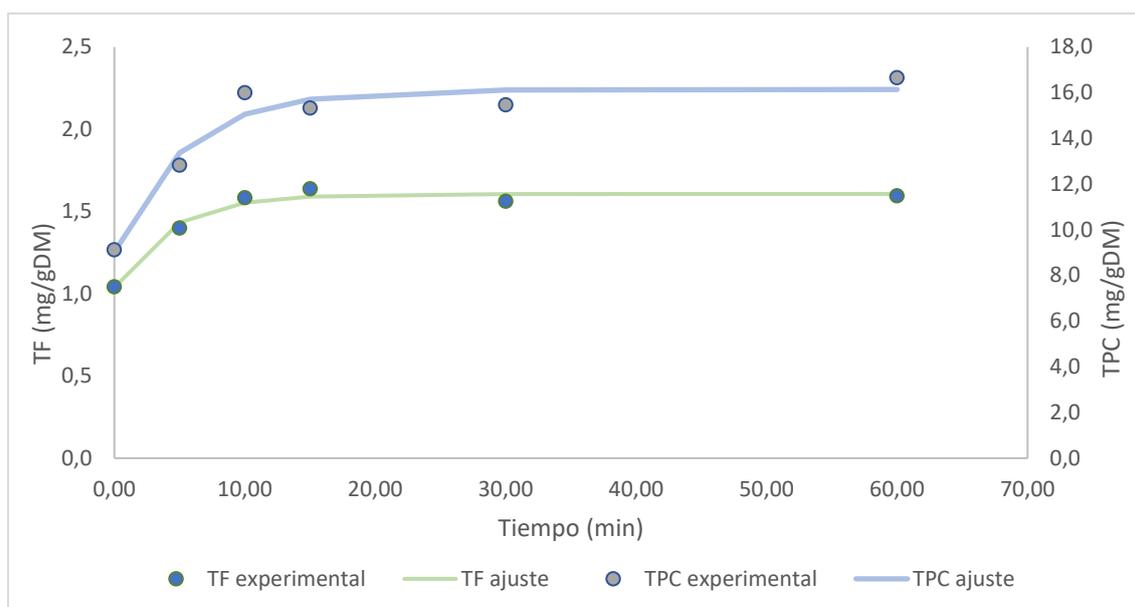


Figura 16. Rendimiento de extracción de flavonoides y TPC SFME 03

En estas gráficas se observa como la extracción de flavonoides es proporcional a la de polifenoles totales. La cinética de extracción es también de primer orden, mostrando una velocidad inicial similar. La velocidad inicial de extracción también se incrementa en la extracción de estos compuestos. En la Figura 13 se observan las cinéticas de extracción del experimento SFME 03 de flavonoides (verde) y de polifenoles (azul), donde se muestra que ambas extracciones presentan la misma evolución.

El porcentaje que representan los flavonoides extraídos respecto del total de compuestos fenólicos se mantiene constante en cada experimento. Los flavonoides representan un 10-16% de los polifenoles detectados en los experimentos realizados, en función de las condiciones.

Los valores óptimos obtenidos vienen dados para condiciones de extracción similares, incrementándose la extracción para mayores temperaturas y menores ratios. Respecto al efecto de la intensificación con microondas, no se observa el mismo incremento que para los polifenoles totales. En la Figura 12y Figura 13 se observa como el uso de microondas influye en la velocidad inicial, aumentando su valor.

Los resultados obtenidos del ajuste de los rendimientos de extracción se muestran en el ANEXO 3. RESULTADOS ANÁLISIS FLAVONOIDES.

### 3.3. ANÁLISIS COMPUESTOS FENÓLICOS. HPLC

Una vez se analizó la cinética de extracción bajo las diferentes condiciones, se analizó que compuestos se han extraído. Para ello se empleó la cromatografía líquida de alta resolución, inyectando las muestras y los patrones, de modo que se obtiene el cromatograma de cada muestra, en el que se pueden identificar los compuestos comparando el tiempo de retención de los picos con el que muestran los patrones y se pueden cuantificar el HT, T y OLE, compuestos para los cuales se realizó una recta de calibrado.

De las muestras obtenidas por los diferentes métodos, se seleccionaron varias muestras para analizar la concentración que tenían de los tres compuestos fenólicos principales en los derivados de la aceituna: hidroxitirosol, HT, tirosol, T, y oleuperina, OLE. Las muestras que se inyectaron en la columna se muestran en el ANEXO 4. RESULTADOS HPLC.

Con este análisis se busca obtener bajo qué condiciones se logran obtener los compuestos mencionados anteriormente, de modo que además de obtener un elevado rendimiento de extracción, que es lo que se busca con el análisis de la cinética de extracción, obtener unas condiciones bajo las que se potencie la extracción de estos compuestos de interés.

Además de estos tres compuestos, se introdujeron otros compuestos en la columna para conocer su tiempo de retención y así poder identificar la presencia de dichos compuestos sin cuantificar su concentración en la muestra. Estos compuestos son el ácido gálico, el ácido cumárico, la rutina y la quercitina. En la Tabla 7 se muestran los tiempos de retención de los distintos polifenoles. El tiempo de retención puro es el tiempo de retención que muestra el compuesto cuando se inyecta puro y el tiempo de retención real el tiempo que tarda en salir cuando se inyecta este compuesto junto con otros compuestos e impurezas. La diferencia entre ambos tiempos de retención se debe a la presencia de impurezas, así como la presencia de un compuesto no identificado de tiempo de retención 60 min, presente en el disolvente.

Tabla 11. Tiempos de retención HPLC

Compuestos	Tiempo de retención puro (min)
Ácido Gálico	7,56 ± 0,756
Hidroxitirosol	9,95 ± 0,995
Tirosol	13,19 ± 1,32
Ácido Cumárico	26,477 ± 2,65
Rutina	47,621 ± 4,76
Oleuperina	48,705 ± 4,87
Quercitina	56,404 ± 5,64

### Resultados extracción convencional

El análisis de las muestras extraídas mediante el proceso de extracción convencional se emplea para determinar qué compuestos se extrajeron en estas condiciones y que sirva a modo de control para estimar en qué modo se potencia la extracción de determinados compuestos bajo el pretratamiento de los microondas. Debido a que cada experimento se lleva a cabo con un ratio S/L diferente, es necesario expresar la concentración, obtenida en ppm, como un rendimiento de extracción de ese compuesto, empleando la fórmula [11].

$$C_{comp} \left( \frac{mg_{comp}}{100g_{alperujo}} \right) = c_{comp} \left( \frac{mg_{comp}}{l} \right) \cdot \frac{1l}{10^3ml} \cdot \frac{1}{Ratio \frac{S}{L} \left( \frac{g_{alpe}}{ml} \right)} \cdot \frac{1 g_{alpe}}{(1-w) g_{alpe,seco}} \cdot 100 \quad [16]$$

Del análisis de los resultados, se obtuvo que la extracción del HT se ve favorecida por tiempos de extracción bajos, obteniéndose los rendimientos más altos para las primeras muestras de la extracción, lo que señala una posible degradación durante la extracción. Para las condiciones de ratio S/L de 0.5, 70°C y disolvente 50%<sub>v/v</sub> (experimento CE18) se obtuvo un rendimiento de 27 mg<sub>HT</sub>/100 g<sub>DM</sub>.

En la Figura 12 se muestra el cromatograma de una extracción convencional, en el que se identifican los picos que corresponden a los compuestos. El pico que aparece para un

tiempo de retención de 60 s corresponde a al disolvente, ya que se comprobó inyectando una muestra con únicamente disolvente.

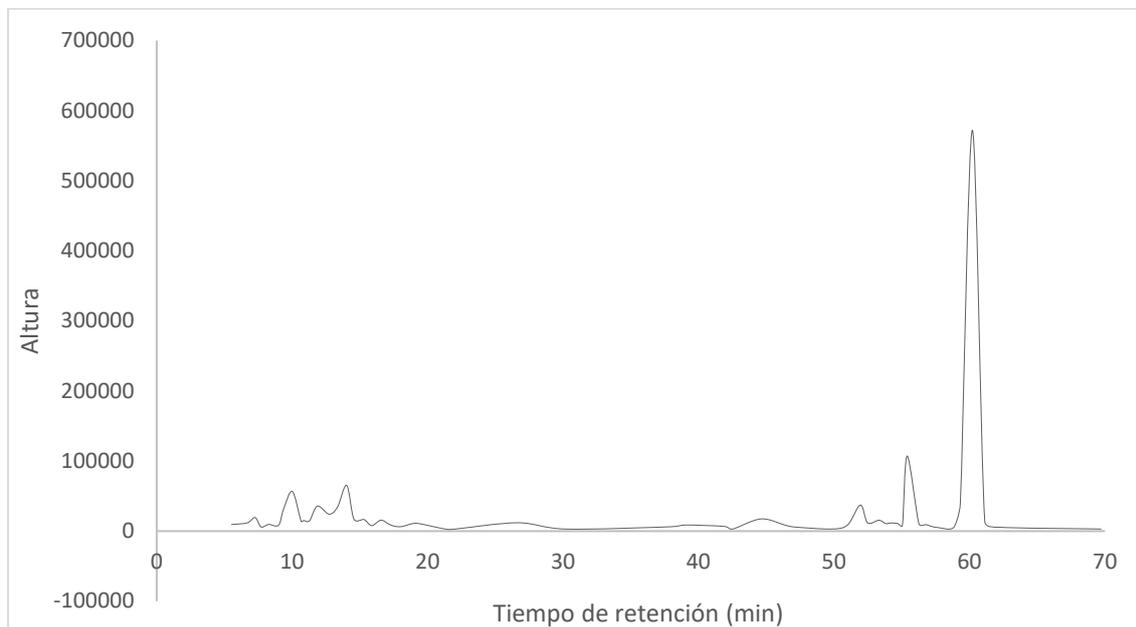


Figura 17. Cromatograma CE 18.5

En el caso del T se observó que el rendimiento aumentó cuando lo hizo el tiempo de extracción, incrementándose la extracción de dicho compuesto. Como control se comprobó que, para las condiciones anteriores, el experimento CE18, la extracción de este compuesto dio un rendimiento de  $69 \text{ mg}_T/100 \text{ g}_{DM}$ .

Para la OLE, el otro compuesto cuya concentración se estudió, presentó un pico de concentración para tiempos de extracción intermedios, de manera que el rendimiento aumento con el inicio de la extracción y disminuyó al avanzar la extracción. El rendimiento máximo obtenido para la OLE fue de  $106 \text{ mg}_{OLE}/100 \text{ g}_{DM}$ .

Como conclusión, para la extracción sin pretratamiento con microondas, se obtuvieron unos rendimientos de extracción que, de ser incrementados, darían como resultado concentraciones superiores de estos compuestos estudiados, probando la eficacia del pretratamiento. En estos análisis se detectó la presencia de otros compuestos como el ácido gálico y el ácido cumárico.

### Resultados pretratamiento microondas atmosférico

En estos resultados también se analizó el rendimiento de extracción de los compuestos, empleando la ecuación [11]. En la Figura 13 se representa el cromatograma de una

extracción que se realizó con pretratamiento en el microondas atmosférico, con los picos de los compuestos identificados señalados.

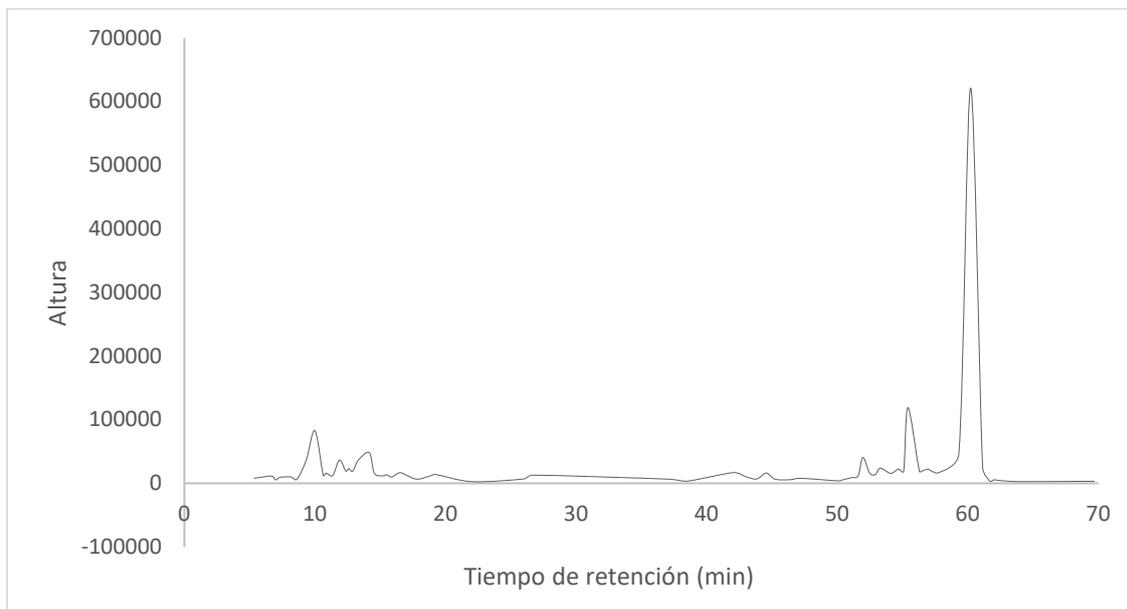


Figura 18. Cromatograma SFME 1.5

Dentro de los experimentos con pretratamiento, se realizaron tres tipos de retratamiento en función del disolvente empleado durante el pretratamiento. Los resultados de cada pretratamiento se analizaron por separado para conocer las condiciones óptimas para cada pretratamiento, comparando finalmente los valores óptimos de cada experimento para conocer las mejores condiciones.

En los experimentos con pretratamiento con microondas sin disolvente añadido (SFME) se observó que el HT presenta un pico en el rendimiento para tiempos de extracción entre los 15-30 minutos cuando se analiza la evolución en un mismo experimento, tomando valores entre 22 y 34,2 mg<sub>HT</sub>/100 g<sub>DM</sub>. Entre varios experimentos, cuanto mayor es la exposición de la muestra al pretratamiento, su valor disminuye de manera sensible, salvo para el experimento SFME 5.4, en el que se observa un pico de extracción de 88,7 mg<sub>HT</sub>/100 g<sub>DM</sub>. Para el T no se observó un incremento del rendimiento de extracción, sino que el rendimiento se mantuvo en torno a 63 mg<sub>T</sub>/100 g<sub>DM</sub>. Su evolución con el tiempo de intensificación con microondas presenta un pico en el experimento SFME 5.4, con un valor de 131 mg<sub>T</sub>/100 g<sub>DM</sub>, que fue el experimento con mayor tiempo de pretratamiento. En el resto de experimentos no se obtuvo un incremento notable. Para la OLE se obtuvo un pico de extracción para tiempos intermedios de extracción. En cuanto al incremento

del tiempo de pretratamiento, este llevó a un incremento de la extracción, llegando a un rendimiento  $445 \text{ mg}_{\text{OLE}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$ , para el experimento SFME 5.4. Como conclusión, el mayor rendimiento de extracción se obtuvo con el experimento que mayor tiempo, lo cual muestra que estos compuestos no presentan una sensibilidad elevada a la aplicación de las microondas, y que para lograr incrementar la extracción es necesario aumentar el pretratamiento con objeto de lograr romper las paredes celulares y liberar los compuestos, a la vez que se elimina el exceso de agua del alperujo. En el caso de aplicar un pretratamiento con microondas sin añadir disolvente, sería beneficioso reducir el tiempo de extracción, ya que, en el caso de estos compuestos de interés, la extracción presenta rendimientos mayores con tiempo menores de extracción, aunque el rendimiento global de extracción sea mayor.

En el caso de los experimentos en los que se añadió agua para el pretratamiento (OWME), se observó que el HT también presenta un pico de rendimiento para tiempo de extracción intermedios. Sin embargo, en el caso del T y la OLE, el rendimiento fue mayor a medida que la extracción avanzaba. El análisis del tiempo de pretratamiento mostró que únicamente la OLE se ve favorecida por un incremento del tiempo de pretratamiento en estas condiciones. Los valores óptimos que se obtuvieron fueron,  $20 \text{ mg}_{\text{HT}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  (HT),  $73 \text{ mg}_{\text{T}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  (T) y  $64 \text{ mg}_{\text{OLE}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  (OLE).

Cuando el pretratamiento se realizó sobre la muestra añadiendo todo el disolvente (SME), la evolución del HT fue similar a la de los otros pretratamientos, alcanzando un máximo antes de acabar la extracción y disminuyendo posteriormente. Para el T, el rendimiento se mantuvo en valores similares, decreciendo en las últimas extracciones. En el caso de la OLE no se observó un incremento de la extracción de dicho compuesto con el tiempo. Esto se puede deber a que, al realizar el pretratamiento con el disolvente, durante dicho pretratamiento estos compuestos se solubilizan directamente, de modo que según avanza la extracción se degradan debido a la temperatura, reduciendo su concentración en la muestra obtenida. Las condiciones óptimas se obtuvieron para un tiempo de pretratamiento intermedio (90 s, SME 3.5), obteniéndose un rendimiento  $26 \text{ mg}_{\text{HT}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  (HT),  $76 \text{ mg}_{\text{T}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  (T) y  $93 \text{ mg}_{\text{OLE}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  (OLE).

De los datos obtenidos podemos concluir que, para un mismo tiempo de pretratamiento, los experimentos en los que no se empleó disolvente durante la aplicación de las

microondas, presentaron rendimientos superiores de extracción de los tres compuestos estudiados. Esto se debe a que, al no haber disolvente, toda la radiación es absorbida por el alperujo, logrando una extracción más eficiente. Cuando se incrementa la intensificación, se logra obtener un mayor rendimiento de extracción de OLE, no obstante, en el caso de HT y T no se logra incrementar la extracción. Esto se debe a la menor estabilidad que presentan estos compuestos, degradándose de manera más rápida. En función de la fracción de polifenoles que se quiera obtener, sería necesario emplear unas condiciones específicas, logrando una mayor selectividad en el proceso de extracción.

#### **Resultados pretratamiento microondas presurizado**

Para los experimentos SFME se obtuvo que el HT y el T se vieron favorecidos por tiempos superiores de extracción, alcanzando el máximo a los 30 minutos. La extracción de la OLE dio rendimientos similares a los 10 y a los 30 minutos. Los valores óptimos obtenidos fueron  $75 \text{ mg}_{\text{HT}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  (HT),  $70 \text{ mg}_{\text{T}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  (T) y  $210 \text{ mg}_{\text{OLE}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  (OLE).

En los experimentos OWME, se obtuvieron los siguientes rendimientos de extracción para cada uno de los compuestos estudiados:  $45 \text{ mg}_{\text{HT}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$ (HT),  $62 \text{ mg}_{\text{T}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$ (T) y  $240 \text{ mg}_{\text{OLE}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$ (OLE).

En el caso de SME, la extracción de HT que dio como resultado un valor óptimo al inicio de la extracción, mientras que el T y la OLE incrementaron su rendimiento con el tiempo de extracción.  $30 \text{ mg}_{\text{HT}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$ (HT),  $172 \text{ mg}_{\text{T}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$ (T) y  $428 \text{ mg}_{\text{OLE}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$ (OLE). Adicionalmente se estudió el efecto de variar los ratios, obteniendo que únicamente el HT incrementa su rendimiento de extracción cuando se emplea un ratio menor, mientras que para la OLE el rendimiento disminuye de manera significativa.

Cuando se emplea el microondas a presión, se observa que la extracción de T y OLE se ve favorecida por la adición del disolvente para el pretratamiento, mientras que el HT presenta un mayor rendimiento cuando la intensificación se lleva a cabo sin disolvente. Esto se debe a que el HT presenta una mayor dificultad para ser extraído del interior celular, de modo que la extracción SFME favorece que se rompan las paredes celulares en mayor medida que el resto de métodos, al absorber la mayor parte de la energía la propia materia y no el disolvente.

### Análisis comparativo

Para estudiar el efecto del pretratamiento con microondas como método de intensificación de la extracción, se tabularon en la Tabla 8 los resultados óptimos de cada tipo de experimento, con el objetivo de ver qué condiciones favorecen el rendimiento de extracción de cada uno de los compuestos. Se compararon los resultados con pretratamiento con el experimento CE 18 de extracción convencional, ya que se realizó con idénticas condiciones (temperatura, ratio S/L y disolvente).

Tabla 12. Rendimientos de extracción óptimos

# Exp	Rendimientos		
	mg <sub>compuesto</sub> /100 g <sub>DM</sub>		
	HT	T	OLE
<b>CE 18</b>	27	69	106
<b>SFME</b>	63	131	445
<b>OWME</b>	20	73	64
<b>SME</b>	26	76	93
<b>SFME.P</b>	75	70	210
<b>OWME.P</b>	45	62	240
<b>SME.P</b>	30	172	428

De los resultados obtenidos para el HT, se observó que le mayor rendimiento viene dado por las extracciones con pretratamiento SFME, un 180% superior al rendimiento del HT en la muestra control para el pretratamiento presurizado y un 130% superior en el caso del atmosférico, mientras que para aquellas extracciones en las que se añadió únicamente agua durante la aplicación de las microondas se observaron los valores menores. Para la extracción de este compuesto, la utilización de la técnica SFME descrita anteriormente es la más recomendable, ya que requiere menos recursos. Entre la utilización de un dispositivo presurizado o no, la opción de realizarlo a presión atmosférico implica un menor coste, a pesar de que el rendimiento sea menor. Esto puede deberse a que se trata de un compuesto que se encuentra más ligado a la materia prima, necesitando una mayor energía absorbida para ser liberado.

En el caso del T, la extracción con mayor rendimiento se obtuvo para el pretratamiento con disolvente y a presión, un 150% superior a la muestra control óptima obtenida, no

obstante, la extracción SFME atmosférica da como resultado un rendimiento elevado, un 90% superior, requiriendo menos recursos. El resto de experimentos dieron como resultados rendimientos similares a los de la muestra control.

Para la OLE el valor máximo del rendimiento se obtuvo también para los pretratamientos SFME y SME.P, con valores 300 % superiores que los obtenidos para la extracción control (CE 18). Los experimentos presurizados dieron resultados (SFME.P y OWME.P) dieron rendimientos un 100% superiores.

Estos valores de rendimiento de extracción son superiores a los encontrados en los trabajos previos, en los que se alcanzan rendimientos de  $89 \text{ mg}_{\text{HT}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  en el caso del HT y de  $21 \text{ mg}_{\text{OLE}}/100 \text{ g}_{\text{DM}}$  para la OLE<sup>14</sup>. Una de las razones por las que se obtienen rendimientos superiores es por el uso de metanol como disolvente en una concentración elevada<sup>10</sup>.

Los métodos que mejor resultado de rendimiento muestran son SFME, SME.P y SFME.P. En función del polifenol que más interese obtener se debe utilizar uno u otro método. El SFME implica más ventajas ya que no se emplea disolvente, lo cual facilita el escalado, presenta un elevado rendimiento de extracción de HT, así como de T y OLE, y no requiere el equipo empleado para soportar la presión. Los experimentos con el microondas presurizado dieron resultados superiores, excepto en el caso del SFME. Esto se debe a que, durante el pretratamiento, debido al incremento de la temperatura y a que no hay disolvente, la humedad de la muestra se evaporó, permitiendo un mayor rendimiento debido al aumento del contacto disolvente-alperujo, así como la intensificación de la ruptura de las paredes celulares al absorber estas la mayor parte de la energía emitida.

En el ANEXO 4. RESULTADOS HPLC se muestra los resultados obtenidos de este análisis de los compuestos descritos anteriormente.



# CAPÍTULO 4

## CONCLUSIONES



#### 4. CONCLUSIONES

Con este estudio se busca potenciar la extracción de los polifenoles del alperujo de aceituna. Dentro de los polifenoles, aquellos que mayor interés muestran son el hidroxitirosol, el tirosol y la oleuperina. Con los resultados obtenidos del estudio de la extracción convencional se obtienen aquellas condiciones que optimizan la extracción sólido-líquido del alperujo con etanol/agua. Una vez se tienen dichas condiciones óptimas, se obtienen las condiciones de operación de la extracción, llegando a un compromiso entre rendimiento de extracción y consumo de recursos. Partiendo de los resultados del estudio estadístico del rendimiento y la velocidad de extracción, se consideró que aquellas condiciones de operación que satisfacían dicho compromiso eran 70°C como temperatura de extracción, 0.5g/ml de ratio sólido/líquido y 50%<sub>V/V</sub> de concentración de etanol en el disolvente. En cuanto a la temperatura, se seleccionó el valor más elevado por la influencia que presenta este parámetro sobre la velocidad inicial de extracción. La temperatura no supone una limitación para la extracción a nivel industrial, ya que se trata de una temperatura moderada, por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente. Respecto al disolvente, la influencia de dicha variable no es crítica para ninguno de los parámetros a optimizar, por lo que se selecciona un disolvente con una concentración intermedia, de modo que no suponga una limitación para la extracción de ningún compuesto que muestra una mayor afinidad por el agua. El ratio mostró una gran influencia con respecto al rendimiento final de extracción, siendo la variable más crítica. No obstante, la selección de un ratio S/L bajo implicaría grandes cantidades de disolvente, suponiendo una limitación para la extracción. El ratio también mostró una gran influencia en la velocidad de extracción, aumentando ésta cuando el ratio disminuye. De cara al escalado del proceso, la selección de ratios bajos supondría un elevado consumo de disolvente, a la vez que implicaría un mayor coste de calentamiento, para tratar una misma cantidad de alperujo, aparte del considerable coste de concentrar el extracto final.

Una vez se consideraron las condiciones más favorables para la extracción de polifenoles, se realizaron los posteriores experimentos con pretratamiento. Inicialmente se realizaron los experimentos con el microondas atmosférico, empleando las condiciones de extracción mencionadas anteriormente. Respecto a la aplicación de microondas, se

controló el tiempo de pretratamiento, manteniendo constante la potencia. Con los resultados de estos experimentos se obtuvo aquellas condiciones que favorecen la extracción de polifenoles. En cuanto al disolvente, los mejores resultados, tanto de rendimiento como de velocidad, se obtuvieron para los experimentos sin disolvente, ya que las microondas fueron absorbidas por la materia prima, liberando los polifenoles de manera más eficiente que cuando dichas microondas son absorbidas por el disolvente. Respecto al tiempo de pretratamiento, cuanto mayor es su valor, mayor es el rendimiento de extracción. Sin embargo, tiempos de pretratamiento elevados suponen una limitación para el proceso a escala industrial, requiriendo tiempo de residencia elevados en el interior del horno microondas. La temperatura alcanzada, al operar a presión atmosférica, depende de la temperatura de ebullición del disolvente. Para las extracciones sin disolvente se alcanzaron temperaturas próximas a los 100°C, temperatura a la que se empieza a evaporar la humedad interior del alperujo. Estas temperaturas no implican limitaciones para el proceso.

Con el microondas presurizado se obtuvieron valores del rendimiento de extracción similares a los obtenidos con el microondas abierto. La extracción con disolvente dio mejores resultados, obteniendo rendimientos un 61% superiores a los de la extracción convencional. El tratamiento con microondas a presión se ve favorecida por la presencia del disolvente, que al calentarse se evapora a menor temperatura, elevando la presión en mayor medida que en el resto de experimentos.

El uso del microondas atmosférico es preferible frente al uso del microondas presurizado, ya que para alcanzar presiones elevadas se requiere de recipientes específicos, que dificultan el escalado de la operación. A la vista de los resultados, el empleo de microondas y presión de manera simultánea no supone un gran incremento respecto al empleo de microondas sin presurizar, únicamente para el pretratamiento con disolvente, obteniendo rendimientos similares a los que se obtuvieron con el pretratamiento sin disolvente a presión atmosférica.

Respecto a los distintos compuestos fenólicos, analizados con el HPLC, la extracción sin disolvente es aquella que favorece la extracción de los tres compuestos, hidroxitirosol, tirosol y oleuperina. Además, con esta extracción se obtiene el máximo rendimiento de extracción de oleuperina, 445mg<sub>OLE</sub>/g<sub>DM</sub>. Para el tirosol, se obtienen mayores

rendimientos con la extracción presurizada con disolvente, no obstante, la extracción sin disolvente de rendimientos de extracción considerables. La intensificación del rendimiento de extracción del hidroxitirosol con microondas se obtiene únicamente para aquellas extracciones sin disolvente, por lo que es el único método con el que se logra extraer este compuesto. Con el resto de métodos se obtienen rendimientos similares a los de extracción convencional.

Con los resultados de las extracciones asistidas con microondas se obtuvo que aquel pretratamiento con el que se logra intensificar todos los aspectos de la extracción, como son el rendimiento final, la velocidad inicial y el rendimiento de extracción de los tres compuestos estudiados, es la extracción SFME, sin disolvente y a presión atmosférica. Con estas condiciones se logra obtener un rendimiento máximo de extracción de  $18.33\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DM}}$ , que supone un incremento del 65% respecto a la extracción control, una velocidad máxima de  $3.35\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DM}}$ , un 440% superior a la velocidad inicial de la extracción convencional, y rendimientos máximos de  $63\text{mg}_{\text{HT}}/100\text{g}_{\text{DM}}$  para el HT,  $131\text{mg}_{\text{T}}/100\text{g}_{\text{DM}}$  para el T y  $445\text{mg}_{\text{OLE}}/100\text{g}_{\text{DM}}$  para la OLE. Con estos resultados se obtiene que el método más adecuado para la extracción, dentro de los límites estudiados, es la aplicación de microondas sobre el alperujo, para posteriormente extraerlos polifenoles con etanol/agua. La extracción con disolvente añadido en el microondas presurizado también da lugar a rendimientos elevados de extracción, no obstante, la extracción SFME es aquella que combina los rendimientos óptimos con el consumo de recursos.



# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- 1 FAO 2018, Statistical Data Base of 2014, 2015 and 2016.
- 2 AAE Agencia Andaluza de la Energía, La biomasa en Andalucía. Informe técnico. Diciembre 2017.
- 3 E. Tsagaraki, H. N. Lazarides and K. B. Petrotos, Olive Mill Wastewater Treatment, 2004, 133–157.
- 4 M. Suárez, M. Romero, T. Ramo, A. Macia and M. Motilva, Methods for Preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants  
Methods for Preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants, 2009, 1463–1472.
- 5 R. Delisi, R. Ciriminna, S. Arvati, F. Meneguzzo and M. Pagliaro, Olive biophenol integral extraction at a two-phase olive mill, *J. Clean. Prod.*, 2018, **174**, 1487–1491.
- 6 K. L. Tuck and P. J. Hayball, Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, *J. Nutr. Biochem.*, 2002, **13**, 636–644.
- 7 F. Visioli, D. Caruso, S. Grande, R. Bosisio, M. Villa, G. Galli, C. Sirtori and C. Galli, Virgin Olive Oil Study (VOLOS): Vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients, *Eur. J. Nutr.*, 2005, **44**, 121–127.
- 8 E. De Marco, M. Savarese, A. Paduano and R. Sacchi, Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters, *Food Chem.*, 2007, **104**, 858–867.
- 9 R. Japón-Luján, J. M. Luque-Rodríguez and M. D. Luque de Castro, Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1136**, 185–191.
- 10 T. I. Lafka, V. Sinanoglou and E. S. Lazos, On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes, *Food Chem.*, 2007, **104**, 1206–1214.
- 11 Q. Guo, D. W. Sun, J. H. Cheng and Z. Han, Microwave processing techniques and their recent applications in the food industry, *Trends Food Sci. Technol.*, 2017, **67**,

236–247.

- 12 V. Gude, P. Patil, E. Martinez-Guerra, S. Deng and N. Nirmalakhandan, Microwave energy potential for biodiesel production, *Sustain. Chem. Process.*, 2013, **1**, 5.
- 13 K. Sólyom, R. Solá, M. J. Cocero and R. B. Mato, Thermal degradation of grape marc polyphenols, *Food Chem.*, 2014, **159**, 361–366.
- 14 J. A. Pérez-Serradilla, R. Japón-Luján and M. D. Luque de Castro, Simultaneous microwave-assisted solid-liquid extraction of polar and nonpolar compounds from alperujo, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **602**, 82–88.
- 15 W. Routray and V. Orsat, Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review, *Food Bioprocess Technol.*, 2012, **5**, 409–424.
- 16 C. M. Liu, Q. Z. Wang and N. Sakai, Power and temperature distribution during microwave thawing, simulated by using Maxwell's equations and Lambert's law, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2005, **40**, 9–21.
- 17 E. Garcia-Castello, A. Cassano, A. Criscuoli, C. Conidi and E. Drioli, Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system, *Water Res.*, 2010, **44**, 3883–3892.
- 18 T. Chatzistathis and T. Koutsos, Olive mill wastewater as a source of organic matter, water and nutrients for restoration of degraded soils and for crops managed with sustainable systems, *Agric. Water Manag.*, 2017, **190**, 55–64.
- 19 N. Balasundram, K. Sundram and S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.*, 2006, **99**, 191–203.
- 20 S. D'Angelo, D. Ingrosso, V. Migliardi, A. Sorrentino, G. Donnarumma, A. Baroni, L. Masella, M. A. Tufano, M. Zappia and P. Galletti, Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells, *Free Radic. Biol. Med.*, 2005, **38**, 908–919.
- 21 M. Vissers, P. Zock and M. Katan, Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: A review, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2004, **58**, 955–965.

- 
- 22 L. Parkinson and S. Cicerale, The health benefiting mechanisms of virgin olive oil phenolic compounds, *Molecules*, 2016, **21**, 1–12.
- 23 A. Ebrahimi and H. Schluesener, Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls, *Ageing Res. Rev.*, 2012, **11**, 329–345.
- 24 European Regulation EU 432/2012 Establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health.
- 25 R. M. Valls, M. Farràs, M. Suárez, S. Fernández-Castillejo, M. Fitó, V. Konstantinidou, F. Fuentes, J. López-Miranda, M. Giralt, M. I. Covas, M. J. Motilva and R. Solà, Effects of functional olive oil enriched with its own phenolic compounds on endothelial function in hypertensive patients. A randomised controlled trial, *Food Chem.*, 2015, **167**, 30–35.
- 26 A. M. Lueder and Q. Ag, Active Ingredients The Active Ingredients Mixture of Olives Provides Skin Whitening and Age Spot Reduction, 2011, 1–6.
- 27 O. V. Zillich, U. Schweiggert-Weisz, P. Eisner and M. Kersch, Polyphenols as active ingredients for cosmetic products, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2015, **37**, 455–464.
- 28 J. A. Nichols and S. K. Katiyar, Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms, *Arch. Dermatol. Res.*, 2010, **302**, 71–83.
- 29 A. Shavandi, A. E.-D. A. Bekhit, P. Saeedi, Z. Izadifar, A. A. Bekhit and A. Khademhosseini, Polyphenol uses in biomaterials engineering, *Biomaterials*, 2018, **167**, 91–106.
- 30 PERKINS COIE LLP, California, US. Method of obtaining a Hydroxytyrosol-Rich composition from vegetation water. Crea, Roberto. US2002058078A1. 16 May 2002.
- 31 A. A. Casazza, B. Aliakbarian, S. Mantegna, G. Cravotto and P. Perego, Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques, *J. Food Eng.*, 2010, **100**, 50–55.

- 32 G. Spigno and D. M. De Faveri, Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts, *J. Food Eng.*, 2007, **78**, 793–801.
- 33 F. J. Barba, Z. Zhu, M. Koubaa, A. S. Sant’Ana and V. Orlien, Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review, *Trends Food Sci. Technol.*, 2016, **49**, 96–109.
- 34 S. S. Teh, B. E. Niven, A. E. D. A. Bekhit, A. Carne and J. Birch, Optimization of polyphenol extraction and antioxidant activities of extracts from defatted flax seed cake (*Linum usitatissimum* L.) using microwave-assisted and pulsed electric field (PEF) technologies with response surface methodology, *Food Sci. Biotechnol.*, 2015, **24**, 1649–1659.
- 35 A. E. Ince, S. Sahin and G. Sumnu, Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle, *J. Food Sci. Technol.*, 2012, **51**, 2776–2782.
- 36 M. E. Lucchesi, J. Smadja, S. Bradshaw, W. Louw and F. Chemat, Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil, *J. Food Eng.*, 2007, **79**, 1079–1086.
- 37 G. Spigno and D. M. De Faveri, Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study, *J. Food Eng.*, 2009, **93**, 210–217.
- 38 C. D. Stalikas, Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *J. Sep. Sci.*, 2007, **30**, 3268–3295.
- 39 L. Baldino, G. Della Porta, L. S. Osseo, E. Reverchon and R. Adami, Concentrated oleuropein powder from olive leaves using alcoholic extraction and supercritical CO<sub>2</sub> assisted extraction, *J. Supercrit. Fluids*, 2018, **133**, 65–69.
- 40 C. Goldsmith, Q. Vuong, C. Stathopoulos, P. Roach and C. Scarlett, Optimization of the Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves, *Antioxidants*, 2014, **3**, 700–712.
- 41 A. Serrano, F. G. Feroso, B. Alonso-Fariñas, G. Rodríguez-Gutierrez, J. Fernandez-

- Bolaños and R. Borja, Phenols recovery after steam explosion of Olive Mill Solid Waste and its influence on a subsequent biomethanization process, *Bioresour. Technol.*, 2017, **243**, 169–178.
- 42 D. Ryan and K. Robards, Critical Review. Phenolic compounds in olives, *Analyst*, 1998, **123**, 31R.
- 43 W. Yakhlef, R. Arhab, C. Romero, M. Brenes, A. de Castro and E. Medina, Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products, *Lwt*, 2018, **93**, 323–328.
- 44 G. La Scalia, R. Micale, L. Cannizzaro and F. P. Marra, A sustainable phenolic compound extraction system from olive oil mill wastewater, *J. Clean. Prod.*, 2017, **142**, 3782–3788.
- 45 A. M. Goula and D. Gerasopoulos, Integrated olive mill waste (OMW) processing towards complete by-product recovery of functional components, *Olives Olive Oil as Funct. Foods Bioactivity, Chem. Process.*
- 46 M. Cabrera-Bañegil, T. Schaide, R. Manzano, J. Delgado-Adámez, I. Durán-Merás and D. Martín-Vertedor, Optimization and validation of a rapid liquid chromatography method for determination of the main polyphenolic compounds in table olives and in olive paste, *Food Chem.*, 2017, **233**, 164–173.
- 47 C. D. Goldsmith, Q. V. Vuong, C. E. Stathopoulos, P. D. Roach and C. J. Scarlett, Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2018, **89**, 284–290.
- 48 Mihaela Teodorescu & partners intellectual property office S.R.L. (RO), WO 2016/118034 A2, 2016.
- 49 B. Aliakbarian, A. A. Casazza and P. Perego, Valorization of olive oil solid waste using high pressure-high temperature reactor, *Food Chem.*, 2011, **128**, 704–710.
- 50 S. Y. Kim, S. M. Jeong, W. P. Park, K. C. Nam, D. U. Ahn and S. C. Lee, Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed

- extracts, *Food Chem.*, 2006, **97**, 472–479.
- 51 Z. He, Y. Chen, Y. Chen, H. Liu, G. Yuan, Y. Fan and K. Chen, Optimization of the microwave-assisted extraction of phlorotannins from *Saccharina japonica* Aresch and evaluation of the inhibitory effects of phlorotannin-containing extracts on HepG2 cancer cells, *Chinese J. Oceanol. Limnol.*, 2013, **31**, 1045–1054.
- 52 M. D. L. de Castro and L. S. Castillo-Peinado, *Microwave-Assisted Extraction of Food Components*, Elsevier Ltd, 2016.
- 53 A. Álvarez, J. Poejo, A. A. Matias, C. M. M. Duarte, M. J. Cocero and R. B. Mato, Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity, *Food Bioprod. Process.*, 2017, **106**, 162–170.
- 54 Milestone S.r.l. Solvent-free microwave extraction of volatile natural compounds. Chemta, F. Smadja, J. Lucchesi, M. EP 1439218 A1. 21 July 2004.
- 55 N. Cicco, M. T. Lanorte, M. Paraggio, M. Viggiano and V. Lattanzio, A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts, *Microchem. J.*, 2009, **91**, 107–110.
- 56 A. L. Waterhouse, Determination of total phenolics, *Wiley Online Libr.*, 2002, 1–8.
- 57 D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan and R. L. Prior, High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 4437–4444.
- 58 G. Cioffi, M. S. Pesca, P. De Caprariis, A. Braca, L. Severino and N. De Tommasi, Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity, *Food Chem.*, 2010, **121**, 105–111.
- 59 F. Amarni and H. Kadi, Kinetics study of microwave-assisted solvent extraction of oil from olive cake using hexane. Comparison with the conventional extraction, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2010, **11**, 322–327.
- 60 D. K. Yanik, Alternative to traditional olive pomace oil extraction systems:

- Microwave-assisted solvent extraction of oil from wet olive pomace, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2017, **77**, 45–51.
- 61 C. H. Chan, R. Yusoff, G. C. Ngoh and F. W. L. Kung, Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 6213–6225.
- 62 P. T. Anastas and J. C. Warner, Green Chemistry: Theory and Practice, *Green Chem. Theory Pract. Oxford Univ. Press. New York*, 1998, 30.
- 63 DIRECTIVA 2009/32/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL 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 fabricación de productos alimenticios y de sus in.
- 64 F. Rubio-Senent, S. Martos, A. Lama-Muñoz, J. G. Fernández-Bolaños, G. Rodríguez-Gutiérrez and J. Fernández-Bolaños, Isolation and identification of minor secoiridoids and phenolic components from thermally treated olive oil by-products, *Food Chem.*, 2015, **187**, 166–173.
- 65 Us Epa, Selected Analytical Methods for Environmental Remediation and Recovery (SAM) – 2012.
- 66 F. Priego-Capote, J. Ruiz-Jiménez and M. D. Luque De Castro, Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis-diode array detection: Application to the characterisation of alperujo after ultrasound-assisted extraction, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1045**, 239–246.
- 67 M. Brenes, A. García, P. García, J. J. Rios and A. Garrido, Phenolic compounds in Spanish olive oils, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3535–3540.
- 68 C. D. Goldsmith, Q. V. Vuong, C. E. Stathopoulos, P. D. Roach and C. J. Scarlett, Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2018, **89**, 284–290.
- 69 M. Ahmadi, F. Vahabzadeh, B. Bonakdarpour, E. Mofarrah and M. Mehranian, Application of the central composite design and response surface methodology to

the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation, *J. Hazard. Mater.*, 2005, **123**, 187–195.

# SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS



## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ANOVA	Método estadístico de análisis de la varianza, ANalysis Of VAriance
C	Rendimiento de extracción, $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DM}}$
c	Concentración, $\text{mg}/\text{l}$
HT	Hidroxitirosol
k	Constante de tiempo
MAE	Extracción asistida con microondas, Microwave Assisted Extraction
OLE	Oleuperina
ORAC	Análisis de la capacidad antioxidante, Oxygen Radical Absorbance Capacity
OWME	Pretratamiento con microondas solo con agua, Only Water Microwave Extraction
ppm	Concentración en partes por millón, $\text{mg}/\text{l}$
SFME	Pretratamiento sin disolvente añadido, Solvent Free Microwave E
SME	Pretratamiento con disolvente, Solvent Microwave Extraction
T	Tirosol
TF	Análisis de los flavonoides totales, Total Flavonoids
TPC	Análisis de los compuestos fenólicos totales, Total Phenolic Compounds

### Subíndices

0	Inicial, tiempo cero
DM	Alperujo seco, dry matter
F	Final
HT	Hidroxitirosol
Inf	Diferencia entre el rendimiento final y el inicial
OLE	Oleuperina
T	Tirosol
$\infty$	Final, rendimiento máximo alcanzado



# ANEXOS



## ANEXO 1. PROCEDIMIENTOS

Los pasos que se siguieron para realizar las extracciones de polifenoles del alperujo bajo las distintas condiciones y pretratamientos se recogen en las hojas de procedimientos que se muestran a continuación.

Extracción convencional																																			
Referencia	CE 00	Fecha																																	
Temperatura		°C																																	
Ratio S/L		g/ml	Humedad																																
Disolvente		%v/v																																	
<p>0. Comprobar</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disolventes preparados (agua desgasificada y pH =1)</li> <li>- Baño termostático preparado (agua e imán)</li> </ul> <p>1. Encender la placa</p> <p>2. Medir el volumen de disolvente necesario</p> <p><math>V_{\text{disolvente}} =</math> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">70</span> ml</p> <p>3. Pesar la cantidad de alperujo necesaria (ratio S/L). Barrer con N<sub>2</sub></p> <p><math>M_{\text{calculada}} =</math> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;"></span> g</p> <p><math>M_{\text{real}} =</math> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;"></span> g</p> <p>4. Verter el disolvente sobre el sólido y agitar (5')</p> <p>Tomamos la muestra 0, barremos con N<sub>2</sub> e introducimos el matraz en el baño</p> <p>5. Toma de muestras</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>5.1. Extraer el volumen necesario</li> <li>5.2. Barrer con N<sub>2</sub></li> <li>5.3. Verter las muestras en un ependorf, enfriar (hielo) y guardar en el congelador</li> <li>5.4. Centrifugar las muestras</li> </ul>																																			
<p>Tabla de muestras</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Nº</th> <th style="width: 20%;">Tiempo (min)</th> <th style="width: 20%;">Tiempo real</th> <th style="width: 20%;">Volumen necesario (ml)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td><td></td><td>1</td></tr> <tr><td>1</td><td>5</td><td></td><td>3</td></tr> <tr><td>2</td><td>10</td><td></td><td>3</td></tr> <tr><td>3</td><td>15</td><td></td><td>1</td></tr> <tr><td>4</td><td>30</td><td></td><td>3</td></tr> <tr><td>5</td><td>60</td><td></td><td>1</td></tr> <tr><td>6</td><td>120</td><td></td><td>3</td></tr> </tbody> </table>				Nº	Tiempo (min)	Tiempo real	Volumen necesario (ml)	0	0		1	1	5		3	2	10		3	3	15		1	4	30		3	5	60		1	6	120		3
Nº	Tiempo (min)	Tiempo real	Volumen necesario (ml)																																
0	0		1																																
1	5		3																																
2	10		3																																
3	15		1																																
4	30		3																																
5	60		1																																
6	120		3																																
<p>Notas:</p>																																			

Figura 19. Procedimiento extracción convencional

Solvent Free Microwave Extraction			
Referencia	SFME 00	Fecha	
Temperatura	°C	Tiempo	
Ratio S/L	g/ml	Humedad	0.6911
Disolvente	%v/v		

0. Comprobar

- Disolventes preparados (agua desgasificada y pH =1)
- Baño termostático preparado (agua e imán)

Encender programa de precalentamiento

1. Pesar la cantidad de alpeorujos necesaria (ratio S/L)

$M_{calculada} =$       g

$M_{real} =$       g

2. Medir el volumen de disolvente

$V_{disolvente} =$       70 ml

3. Introducir la muestra en el microondas y seleccionar el tiempo de tratamiento

Medir  $T_{inicial}$  y  $T_{final}$

$T_{INICIAL} =$       °C       $T_{FINAL} =$       °C

4. Sacar la muestra, añadir el disolvente (barrer con  $N_2$ ) y enfriar con agua

5. Agitar (5') y tomar muestra cero. Barrer con  $N_2$

6. Introducir el matraz en el baño termostático y tomar muestras

7. Toma de muestras

5.1. Extraer el volumen necesario

5.2. Barrer con  $N_2$

5.3. Verter las muestras en un ependorf, enfriar (hielo) y guardar en el congelador

5.4. Centrifugar las muestras

Tabla de muestras

Nº	Tiempo (min)	Tiempo real	Volumen necesario (ml)
0		0	1
1		5	3
2		10	3
3		15	1
4		30	3
5		60	1

Notas:

Figura 20. Procedimiento extracción SFME

Only Water Microwave Extraction			
Referencia	OWME 00	Fecha	
Temperatura	°C	Tiempo	
Ratio S/L	g/ml	Humedad	0.6911
Disolvente	%v/ v		

0. Comprobar

- Disolventes preparados (agua desgasificada y pH =1)
- Baño termostático preparado (agua e imán)

Encender programa de precalentamiento

1. Pesar la cantidad de alperujo necesaria (ratio S/L)

$M_{calculada} =$  [ ] g

$M_{real} =$  [ ] g

2. Medir el volumen de agua y etanol

$V_{agua} =$  [ ] ml       $V_{etanol} =$  [ ] ml

3. Añadir el agua e introducir la muestra en el microondas y seleccionar el tiempo de tratamiento

Medir  $T_{inicial}$  y  $T_{final}$

$T_{INICIAL} =$  [ ] °C       $T_{FINAL} =$  [ ] °C

4. Sacar la muestra, añadir el etanol (barrer con N<sub>2</sub>) y enfriar con agua

5. Agitar (5') y tomar muestra cero. Barrer con N<sub>2</sub>

6. Introducir el matraz en el baño termostático y tomar muestras

7. Toma de muestras

5.1. Extraer el volumen necesario

5.2. Barrer con N<sub>2</sub>

5.3. Verter las muestras en un ependorf, enfriar (hielo) y guardar en el congelador

5.4. Centrifugar las muestras

Tabla de muestras

---

Nº	Tiempo (min)	Tiempo real	Volumen necesario (ml)
0	0	0	1
1	5	5	3
2	10	10	3
3	15	15	1
4	30	30	3
5	60	60	1

---

Notas:

Figura 21. Procedimiento OWME

Microwave Extraction			
Referencia	SME 00	Fecha	
Temperatura	°C	Tiempo	
Ratio S/L	g/ml	Humedad	0,6911
Disolvente	%v/v		

0. Comprobar

- Disolventes preparados (agua desgasificada y pH =1)
- Baño termostático preparado (agua e imán)

Encender programa de precalentamiento

1. Pesar la cantidad de alperujo necesaria (ratio S/L)

$M_{calculada} =$  [ ] g

$M_{real} =$  [ ] g

2. Medir el volumen de disolvente

$V_{disolvente} =$  [ ] 70 ml

3. Introducir la muestra en el microondas y seleccionar el tiempo de tratamiento

Medir  $T_{inicial}$  y  $T_{final}$

$T_{INICIAL} =$  [ ] °C       $T_{FINAL} =$  [ ] °C

4. Sacar la muestra, añadir el disolvente (barrer con N<sub>2</sub>) y enfriar con agua

5. Agitar (5') y tomar muestra cero. Barrer con N<sub>2</sub>

6. Introducir el matraz en el baño termostático y tomar muestras

7. Toma de muestras

5.1. Extraer el volumen necesario

5.2. Barrer con N<sub>2</sub>

5.3. Verter las muestras en un ependorf, enfriar (hielo) y guardar en el congelador

5.4. Centrifugar las muestras

Tabla de muestras

Nº	Tiempo (min)	Tiempo real	Volumen necesario (ml)
0	0		1
1	5		3
2	10		3
3	15		1
4	30		3
5	60		1

Notas:

Figura 22. Procedimiento extracción SME

Pressurized Microwave Extraction																			
Referencia		Fecha																	
Temperatura	°C	Tiempo																	
Ratio S/L	g/ml	Humedad	0,6911																
Disolvente	%v/v																		
<p>0. Comprobar</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disolventes preparados (agua desgasificada y pH =1)</li> <li>- Baño termostático preparado (agua e imán)</li> </ul> <p>Encender programa de precalentamiento</p> <p>1. Pesar la cantidad de alperujo necesaria (ratio S/L) 3 veces e introducirla en tres matreces G30</p> <p><math>M_{calculada} =</math>      g</p> <p><math>M_{real} =</math>      g</p> <p>2. Medir el volumen de disolvente. Añadirlo antes del pretratamiento para la extracción SME.P. En el caso de la extracción OWME.P medir el volumen correspondiente de agua. Barrer con N<sub>2</sub>.</p> <p><math>V_{disolvente,p} =</math>      ml</p> <p>3. Introducir la muestra en el microondas y establecer la temperatura a alcanzar con una potencia constante de 100W. Enfriamiento hasta 70°C.</p> <p><math>T_{FINAL} =</math>      °C</p> <p>2'. Añadir el disolvente para la extracción SFME.P y OWME.P (solo etanol). Barrer con N<sub>2</sub>.</p> <p><math>V_{disolvente,e} =</math>      ml</p> <p>3. El matraz 1, una vez acabado el pretratamiento, se agita y se toma la muestra 0.</p> <p>4. Los matraces 2 y 3 se introducen en el baño termostático y se mantienen durante 10' y 30' respectivamente. Una vez alcanzado el tiempo de extracción se extrae la muestra.</p> <p>Tabla de muestras</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Nº</th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Tiempo (min)</th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Tiempo real</th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Volumen necesario (ml)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td></td> <td>3</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">5</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">30</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;"></td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">3</td> </tr> </tbody> </table> <p>Notas:</p>				Nº	Tiempo (min)	Tiempo real	Volumen necesario (ml)	0	0		1	1	10		3	5	30		3
Nº	Tiempo (min)	Tiempo real	Volumen necesario (ml)																
0	0		1																
1	10		3																
5	30		3																

Figura 23. Procedimiento extracción MAE presurizado

## ANEXO 2. RESULTADOS RENDIMIENTO Y RIQUEZA

Los resultados de las extracciones llevadas a cabo se ajustaron con la ecuación [10], obteniendo tres parámetros:  $C_0$ ,  $C_F$  y  $k$ , además de la varianza del ajuste, representando la fiabilidad con la que el ajuste realizado representa los datos experimentales obtenidos. El ajuste se realizó por mínimos cuadrados. La riqueza se obtuvo con la ecuación [9], y dado que no mostró ninguna tendencia, se calculó el valor medio de los cuatro valores obtenidos en cada extracción.

Tabla 13. Resultados extracción convencional

Experimento	Condiciones			Rendimiento extracción					
	Temperatura (°C)	Ratio S/L (g/ml)	Disolvente (%v/v)	C <sub>0</sub> (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>DM</sub> )	C <sub>F</sub> (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>DM</sub> )	k (min <sup>-1</sup> )	Riqueza (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>ext,seco</sub> )	U <sub>0</sub> (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>DM</sub> ·s)	σ <sup>2</sup>
CE 01	55	0,275	50	16,07	20,18	0,1116	80,93	0,4586	0,0714
CE 02	70	0,275	50	12,60	21,28	0,0714	78,75	0,6194	1,6177
CE 03	40	0,05	25	21,26	25,29	0,0848	78,76	0,3411	4,1037
CE 04	55	0,5	50	11,54	15,79	0,0254	60,40	0,1081	0,1104
CE 05	70	0,5	75	13,33	16,63	0,2380	76,39	0,7854	1,1390
CE 06	70	0,05	75	18,35	26,55	0,1038	61,73	0,8518	1,2598
CE 07	40	0,05	75	21,00	24,37	0,0310	63,30	0,1043	1,3907
CE 08	55	0,275	25	14,01	17,41	0,0996	73,47	0,3393	1,1437
CE 09	40	0,275	50	14,65	17,70	0,0967	67,23	0,2951	0,3065
CE 10	55	0,275	50	18,51	19,81	0,1020	80,06	0,1325	0,1745
CE 11	40	0,5	75	13,81	16,25	0,0662	75,47	0,1615	1,4369
CE 12	55	0,275	50	19,15	21,14	0,1181	88,06	0,2359	0,3143
CE 13	55	0,05	50	21,70	28,22	0,1179	146,51	0,7696	2,6770
CE 14	55	0,275	75	17,92	20,66	0,1266	88,72	0,3461	1,0971
CE 15	70	0,5	25	12,69	13,74	0,1283	73,48	0,1349	0,3817
CE 16	70	0,05	25	20,13	25,79	0,0667	102,96	0,3776	12,3925
CE 17	40	0,5	25	7,43	9,27	0,1089	46,88	0,2005	0,3018
CE 18	70	0,5	50	9,08	11,08	0,3094	43,32	0,6207	0,0049

Tabla 14. Resultados extracción MAE

Experimento	Pretratamiento		Rendimiento extracción			
	Temperatura final (°C)	C <sub>0</sub> (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>alp,seco</sub> )	C <sub>∞</sub> (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>alp,seco</sub> )	k (min <sup>-1</sup> )	U <sub>0</sub> (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>alp,seco</sub> *s)	σ <sup>2</sup>
SFME 01	88,5	10,14	14,43	0,1998	2,8821	0,3232
SFME 02	92,6	10,43	15,20	0,1572	2,3900	0,1675
SFME 03	99,6	9,04	16,14	0,1883	3,0388	2,0187
SFME 04	100,5	10,64	15,83	0,1666	2,6361	1,2516
SFME 05	101,1	8,68	18,33	0,1829	3,3536	1,8531
SFME 06	103,3	9,19	18,30	0,1401	2,5652	5,1849
OWME 01	58	10,37	15,25	0,3114	1,4069	0,4603
OWME 02	81,5	10,15	14,76	0,2811	1,2962	0,0378
OWME 03	95,7	12,16	16,47	0,4886	2,1085	0,3533
SME 01	344	12,39	16,11	0,2634	0,9805	1,0570
SME 02	59,1	9,84	14,50	0,2288	1,0657	0,6590
SME 03	80,1	10,12	15,09	0,1835	0,9122	0,5170
SME 04	83,5	9,62	15,76	0,2538	1,5570	0,0010
SFME.P 01	125	11,19	14,01	0,2505	-	-
SFME.P 02	150	11,86	14,56	0,2280	-	-

Experimento	Pretratamiento		Rendimiento extracción			
	Temperatura final (°C)	$C_0$ (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>alp,seco</sub> )	$C_\infty$ (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>alp,seco</sub> )	k (min <sup>-1</sup> )	$U_0$ (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>alp,seco</sub> *s)	$\sigma^2$
SFME.P 03	175	13,89	15,14	0,1891	-	-
OWME.P 01	125	13,22	15,49	0,0538	-	-
OWME.P 02	150	14,59	15,48	0,1368	-	-
OWME.P 03	175	15,53	16,01	0,2933	-	-
SME.P 01	125	13,95	15,06	0,0668	-	-
SME.P 02	150	14,83	16,44	0,2759	-	-
SME.P 03	175	15,20	17,86	0,1346	-	-

## ANEXO 3. RESULTADOS ANÁLISIS FLAVONOIDES

Tabla 15. Resultados extracción flavonoides

Experimento	Rendimiento extracción			
	$C_0$ (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>alp,seco</sub> )	$C_\infty$ (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>alp,seco</sub> )	k (min <sup>-1</sup> )	$\sigma^2$
CE 01	1,55	1,73	0,1111	0,0051
CE 02	1,47	2,21	0,0218	0,0107
CE 03	3,29	3,72	0,0509	0,0132
CE 04	0,96	1,21	0,0761	0,0008
CE 10	1,90	2,44	0,0217	0,0273
CE 11	1,69	1,81	0,1687	0,0034
CE 12	2,06	2,59	0,0176	0,0240
CE 16	3,07	3,70	0,0789	0,0640
CE 17	1,00	1,07	1,0654	0,0006
CE 18	1,56	1,72	3,4753	0,0043
SFME 01	1,25	1,61	0,1267	0,1267
SFME 02	1,30	1,56	0,0634	0,0028
SFME 03	1,04	1,61	0,2371	0,0063
SFME 04	1,32	1,63	0,6182	0,0085
OWME 01	1,35	1,78	0,0923	0,0107
OWME 02	1,41	1,67	0,1339	0,0000
OWME 03	1,69	2,11	0,0251	0,0049
SME 01	1,47	2,05	0,0351	0,0000
SME 02	1,40	1,74	0,0525	0,0041
SME 03	1,49	1,82	0,0558	0,0042
SME 04	1,49	1,70	0,4272	0,0040
OWME.P 01	1,49	1,69	0,0491	-
OWME.P 02	1,66	1,77	1,5892	-
OWME.P 03	1,80	1,98	1,6054	-
SME.P 01	1,68	2,02	0,1239	-
SME.P 02	1,85	2,20	0,0658	-
SME.P 03	2,12	2,42	0,0528	-

## ANEXO 4. RESULTADOS HPLC

Tabla 16. Resultados HPLC

Experimento	Rendimiento extracción		
	HT (mg <sub>HT</sub> /100 g <sub>alp,seco</sub> )	T (mg <sub>T</sub> /100 g <sub>alp,seco</sub> )	OLE (mg <sub>OLE</sub> /100 g <sub>alp,seco</sub> )
CE 01.1	-	33,40	100,40
CE 01.2	-	17,57	87,47
CE 01.3	-	33,54	96,45
CE 01.4	-	26,87	313,33
CE 01.5	15,74	20,64	155,49
CE 01.6	-	39,29	103,24
CE 02.3	17,35	29,55	82,72
CE 02.6	-	20,94	87,89
CE 13.2	66,55	53,37	193,48
CE 13.4	-	89,70	223,82
CE 18.1	27,05	52,07	135,70
CE 18.2	29,25	64,66	44,43
CE 18.3	-	-	27,26
CE 18.4	25,55	68,47	106,27
CE 18.5	13,67	69,78	54,90
SFME 1.5	24,13	81,47	37,52
SFME 2.5	12,32	61,41	14,29
SFME 3.0	23,75	98,99	30,39
SFME 3.1	22,14	57,74	21,10
SFME 3.2	27,64	71,77	182,01
SFME 3.3	34,27	78,96	89,00
SFME 3.4	-	30,63	42,31
SFME 3.5	13,93	63,00	69,65
SFME 4.5	16,43	66,09	115,08
SFME 5.4	88,74	131,54	445,04
OWME 1.2	17,12	59,05	13,46
OWME 1.4	24,85	0,00	39,69

Experimento	Rendimiento extracción		
	HT (mg <sub>HT</sub> /100 g <sub>alp,seco</sub> )	T (mg <sub>T</sub> /100 g <sub>alp,seco</sub> )	OLE (mg <sub>OLE</sub> /100 g <sub>alp,seco</sub> )
OWME 2.0	11,45	42,54	19,65
OWME 2.1	26,66	56,44	14,18
OWME 2.2	5,83	17,72	11,04
OWME 2.3	18,22	64,94	32,19
OWME 2.4	19,58	73,20	8,71
OWME 2.5	20,01	103,46	237,47
OWME 3.5	19,12	70,35	63,96
SME 1.5	16,54	63,38	76,29
SME 2.1	21,49	65,81	58,38
SME 2.2	23,52	71,71	48,41
SME 2.3	24,52	75,65	22,20
SME 2.4	17,10	62,55	12,26
SME 2.5	19,00	45,70	16,21
SME 3.5	26,09	75,97	93,00
SME 4.5	15,73	72,16	65,70
SFME.P 1.2	28,10	35,65	186,90
SFME.P 3.0	41,78	32,10	209,91
SFME.P 3.2	75,42	70,44	183,78
OWME.P 2.2	45,31	62,58	239,99
OWME.P 3.2	3,20	36,03	211,42
SME.P 1.2	30,36	10,21	198,77
SME.P 3.2	11,41	172,23	428,21
SME.P 5.2	29,91	102,16	377,95
SME.P 6.2	67,80	145,21	282,04