



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE BURGOS

**TRABAJO FIN DE GRADO – CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS:
ESTUDIO DE LA SEPARACIÓN MEDIANTE
PROCESOS DE MEMBRANA DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS
DE HOJAS DE OLIVO.**



Autor: Miranda Renedo Ortega

Tutoras: María Teresa Sanz Díez y Sagrario
Beltrán Clavo

Departamento: Biotecnología y Ciencia de
los Alimentos (Área de Ingeniería Química)

Convocatoria: julio 2021

VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN: Ciencia y Tecnología de los Alimentos

CURSO: 2020-2021

Dña. María Teresa Sanz Diez y Dña. Sagrario Beltrán Calvo informan de que la alumna Dña. Miranda Renedo Ortega, ha realizado el trabajo "Estudio de la separación mediante procesos de membrana de compuestos bioactivos presentes en los extractos de hojas de olivo" bajo su tutela, y considera que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indiquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 30 de junio de 2021



Fdo.: María Teresa Sanz Diez



Fdo.: Sagrario Beltrán Calvo

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

Dña. Miranda Renedo Ortega y Dña. María Teresa Sanz Diez y Dña. Sagrario Beltrán Calvo autora y tutoras del Trabajo Fin de Grado autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto

Acceso abierto con periodo de embargo

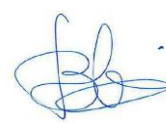
Burgos, a 30 de julio de 2021



Fdo.: Miranda Renedo Ortega



Fdo.: María Teresa Sanz Diez



Sagrario Beltrán Calvo

Este trabajo ha sido desarrollado en el seno del Grupo de Investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la UBU (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128, en el marco de los siguientes proyectos de investigación:

- VALORIZACIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA DE CASTILLA Y LEÓN MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE FLUIDOS PRESURIZADOS (PROVALOR), financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BU050P20).
- VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS MARINOS MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE FLUIDOS SUB- Y SUPERCRÍTICOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCMPUESTOS VALIOSOS, financiado por la Agencia Estatal de Investigación (PID2019-104950RB-I00 / AEI / 10.13039/501100011033).
- VALORIZACIÓN INTEGRAL DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA MEDIANTE TECNOLOGÍAS EMERGENTES (ALVALOR), financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BU301P18).

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | vii |
| ABSTRACT | 1 |
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1.1 El olivo | 2 |
| 1.2 Hojas de olivo | 2 |
| 1.3 Procesos de separación por membranas | 3 |
| 2. OBJECTIVES | 4 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 5 |
| 3.1. Hojas de olivo (OL): | 5 |
| 3.2. Procesos de extracción convencional | 6 |
| 3.3. Procesos de membrana | 6 |
| 3.4. Compuestos fenólicos totales (Método de Folin-Ciocalteu) | 7 |
| 3.5. Capacidad reductora (Método FRAP) | 7 |
| 3.6. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos individuales y azúcares | 7 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 8 |
| 4.1. Separación y fraccionamiento de los extractos acuosos mediante procesos de membrana | 8 |
| 4.1.1. Caracterización de polifenoles individuales en extractos acuosos | 12 |
| 4.1.2. Caracterización de azúcares en extractos acuosos | 14 |
| 4.2. Estudio preliminar de separación de extractos hidroalcohólicos mediante membranas | 15 |
| 4.2.1. Caracterización de polifenoles individuales en extractos hidroalcohólicos | 19 |
| 5. CONCLUSIONES | 21 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 22 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------|--------------------------------------|
| OL | Hojas de olivo |
| DOL | Unidad en base seca de hoja de olivo |
| Desv. Std. | Desviación típica |
| AAI | Índice de actividad antioxidante |
| AGE | Ácido gálico equivalente |
| TFG | Trabajo fin de grado |
| TPC o PT | Contenido en polifenoles totales |
| NF | Nanofiltración |
| UF | Ultrafiltración |
| OI | Ósmosis inversa |
| VRF | Factor de reducción de volumen |
| BM | Balance de materia |
| PES | Polietersulfona |

ABSTRACT

Olive leaves are one of the by-products of olive growing and are considered a cheap raw material that can be used as a good source of high added value bioactive compounds. This by-product contains significant amounts of bioactive compounds which makes its appreciation very attractive. For this reason, in this work it is first proposed to obtain aqueous extracts (solvent: 100% water) and hydroalcoholic extracts (solvent: 80% ethanol and 20% water) for their subsequent fractionation by membranes. It is observed that the larger membrane pore size, the lower retention of compounds by the membrane and the higher the concentration of compounds in the permeate phase. If the extract solvent contains ethanol, conditioning the membrane is required prior to fractionation so that the process flow is stabilized, and the membrane is not ruptured. Finally, it is observed that once the flows stabilize, there are practically no differences between the flow of the extract with water solvent and the extract with hydroalcoholic solvent. In the other hand, the compounds soluble in the solvent of each extract are characterized by HPLC, characterizing phenolic compounds such as hydroxytyrosol, rutin, verbascoside, luteolin-7-O-glucoside and oleuropein and characterizing carbohydrates such as mannitol, glucose, sucrose, xylose and arabinose. Luteolin-O-7-glucoside being the main phenolic compound in aqueous extract and oleuropein in hydroalcoholic extract and mannitol as the majority carbohydrate in both extracts. And mannitol as the majority carbohydrate in both extracts.

Keywords: olive leaves, oleuropein, polyphenols, phenolic compounds, ultrafiltration, nanofiltration, antioxidant capacity, HPLC.

RESUMEN

Las hojas de olivo son uno de los subproductos del cultivo del olivo y se consideran una materia prima barata que puede utilizarse como una buena fuente de compuestos bioactivos de alto valor añadido. Este subproducto contiene importantes cantidades de compuesto bioactivos lo cual hace muy atractivo su valorización. Por ello, en este trabajo se plantea en primer lugar la obtención de extractos acuosos (disolvente: 100% agua) e hidroalcohólicos (disolvente: 80% etanol y 20% agua) para su posterior fraccionamiento mediante membranas. Se observa que a mayor tamaño de poro de membrana menor retención de compuestos por la membrana y mayor concentración de compuestos en la fase permeado. Si el disolvente del extracto contiene etanol hace falta un acondicionamiento de la membrana anterior al fraccionamiento para que el flujo del proceso se estabilice y no se rompa la membrana. Finalmente se observa que una vez los flujos se estabilizan no hay prácticamente diferencias entre el flujo del extracto con solvente agua y el extracto con solvente hidroalcohólico. En segundo lugar, se caracterizan mediante HPLC los compuestos solubles en el disolvente de cada extracto llegando a caracterizar compuestos fenólicos como hidroxitirosol, rutina, verbascósido, luteolin-7-O-glucósido y oleuropeína e hidratos de carbono como manitol, glucosa, sacarosa, xilosa y arabinosa. Siendo el Luteolin-7-O-glucósido el compuesto fenólico mayoritario en extracto acuoso y la oleuropeína en extracto hidroalcohólico. Y el manitol como el carbohidrato mayoritario en ambos extractos.

Palabras clave: Hojas de olivo, oleuropeína, compuestos fenólicos, azúcares, ultrafiltración, nanofiltración, capacidad antioxidante, HPLC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El olivo

El olivo tal como lo conocemos (*Olea europea L.*) pertenece al género *Olea*, de la familia *Oleaceae*. Este árbol es originario de la región sirio-palestina, aunque también se ha sugerido que procede del cruce de especies próximas: *Olea africana*, originaria de Arabia y Egipto; *Olea ferruginosa*, procedente del área asiática, y *Olea laperrini*, de las montañas del sur de Marruecos (Vázquez Granado 2016). Más de 8 millones de olivos se cultivan en todo el mundo de los cuales el 98% de ellos se encuentran en la cuenca mediterránea. (Kashaninejad et al. 2020)

El cultivo en España fue introducido como consecuencia del comercio marítimo de los fenicios (1050 a.C.) (Vázquez Granado 2016). Actualmente España es el país con mayor superficie olivar. (Kashaninejad et al. 2020)

1.2 Hojas de olivo

El olivo tiene hoja perenne cuyo haz generalmente suele ser de color verde oscuro brillante y el envés está cubierto por abundantes pelos aparasolados que le confieren un color gris-plateado. (Vázquez Granado 2016)

Las hojas de olivo (OL) son uno de los subproductos del cultivo del olivo y pueden generarse durante la poda del olivo y también en el proceso de separación antes de la elaboración de la aceituna. (Kashaninejad et al. 2020)

Las aceitunas y los productos derivados representan una parte importante de la dieta mediterránea. (Ben Othman et al. 2008) Las hojas de olivo se consideran una materia prima barata que puede utilizarse como una buena fuente de compuestos bioactivos de alto valor añadido. (Khemakhem et al. 2017)

El contenido de triterpenos en las hojas de olivo es muy superior a la del fruto según análisis de la composición química de las ceras epidérmicas de la hoja, siendo el mayoritario el ácido oleanólico llegando a representar un 3.0 – 3.5% del peso seco de la hoja. (Vázquez Granado 2016)

Hay informes que demuestran que el extracto de hoja de olivo tiene capacidad de reducir la presión arterial en los animales y aumentar el flujo sanguíneo en las arterias coronarias, evitando lo espasmos de los músculos intestinales. (Khemakhem et al. 2017)

Uno de los principales antioxidantes del extracto de hoja de olivo es la oleuropeína y se ha demostrado que posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y su hidrólisis conduce a compuestos antimicrobianos. (Khemakhem et al. 2017) Otro compuesto fenólico importante en hojas de olivo es el luteolin-7-oglucósido que es un fármaco potente contra la carcinogénesis de colon. (Kashaninejad et al. 2020)

Otros compuestos valiosos presentes en las hojas de olivo son polioles o alcoholes de azúcar, principalmente el manitol. El manitol comprende una parte significativa de la reserva de carbohidratos solubles y tiene una potencia de dulzor equivalente a 70% de sacarosa. Además, el manitol también tiene propiedades antioxidantes. (Kashaninejad et al. 2020). En consecuencia, existe un interés creciente en extraer y separar compuestos activos naturales de las hojas de olivo ya que son más seguros para la salud humana que los productos

químicos sintéticos. Además, el extracto de hoja de olivo se considera económico y de fácil disponibilidad como antioxidante natural. (Khemakhem et al. 2017)

Para la extracción de los compuestos bioactivos se pueden aplicar diferentes técnicas de extracción. El sistema de extracción más utilizado ha sido la extracción de sólido-líquido mediante maceración de la biomasa vegetal en un disolvente. En trabajos previos (Kashaninejad et al. 2020) se ha demostrado, cómo otras técnicas de extracción no convencionales, tales como la extracción asistida con ultrasonidos, genera cinéticas de extracción más rápidas, si bien, el rendimiento final no fue superior a los obtenidos mediante técnicas convencionales. Además, las cinéticas de extracción fueron en general rápidas incluso para procesos convencionales de extracción con tiempo de equilibrio en torno a los 15 minutos. Por ello, se considera que, para este tipo de sustratos, los procesos de extracción convencional conducen a resultados óptimos de extracción en tiempos relativamente cortos. Los procesos de extracción con disolventes convencionales generan un extracto que contiene los compuestos bioactivos extraídos junto con el disolvente empleado en la extracción. Por lo tanto, son necesarios procesos posteriores de concentración y separación de los compuestos extraídos. En este trabajo se han estudiado procesos de separación de membrana con el fin de fraccionar y concentrar extractos de hojas de olivo obtenidos mediante procesos de extracción convencionales.

1.3 Procesos de separación por membranas

Recientemente, se ha incrementado el interés en la aplicación de tecnologías de membranas para la separación, concentración y purificación de compuestos bioactivos que permite obtener concentrados de compuestos fenólicos de alta calidad debido a la baja temperatura de funcionamiento y al mínimo consumo de energía. La operación a bajas temperaturas reduce los procesos de degradación de los compuestos bioactivos que tienen lugar en los procesos de evaporación del disolvente. La separación en los procesos de separación por membranas se basa en la permeación selectiva de moléculas de soluto a través de membranas semipermeables poliméricas o inorgánicas (Figura 1). (Khemakhem et al. 2017). De esta forma se generan dos fases, el retenido, que contiene todos los compuestos retenidos por la membrana y el permeado formado por todos los componentes que han atravesado la membrana. Los procesos de membrana se clasifican según el tamaño de poro de la membrana y la presión transmembranal que se emplean en el proceso. De esta forma se habla de procesos de microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (OI). Los procesos de microfiltración se basan en la separación de membranas simétricas para separar partículas de entre 1-10 μm y las presiones a las que se trabaja son entre 2-3 bar. Los procesos de UF emplean membranas asimétricas que se caracterizan por el peso molecular medio de corte (MWCO, molecular weight cut off) que para membranas de UF se encuentra entre 10^3 y 10^6 Da y que se define como el peso molecular equivalente de las especies que exhiben un rechazo del orden de 90%. Para procesos de UF las presiones empleadas son del orden de 5-10 bar. Los procesos de NF se emplean normalmente para la separación de iones multivalentes y compuestos orgánicos de peso molecular en el intervalo de 100 y 1000 Da. La presión de operación en procesos de NF es superior a los procesos de UF, entre 10-30 bar.

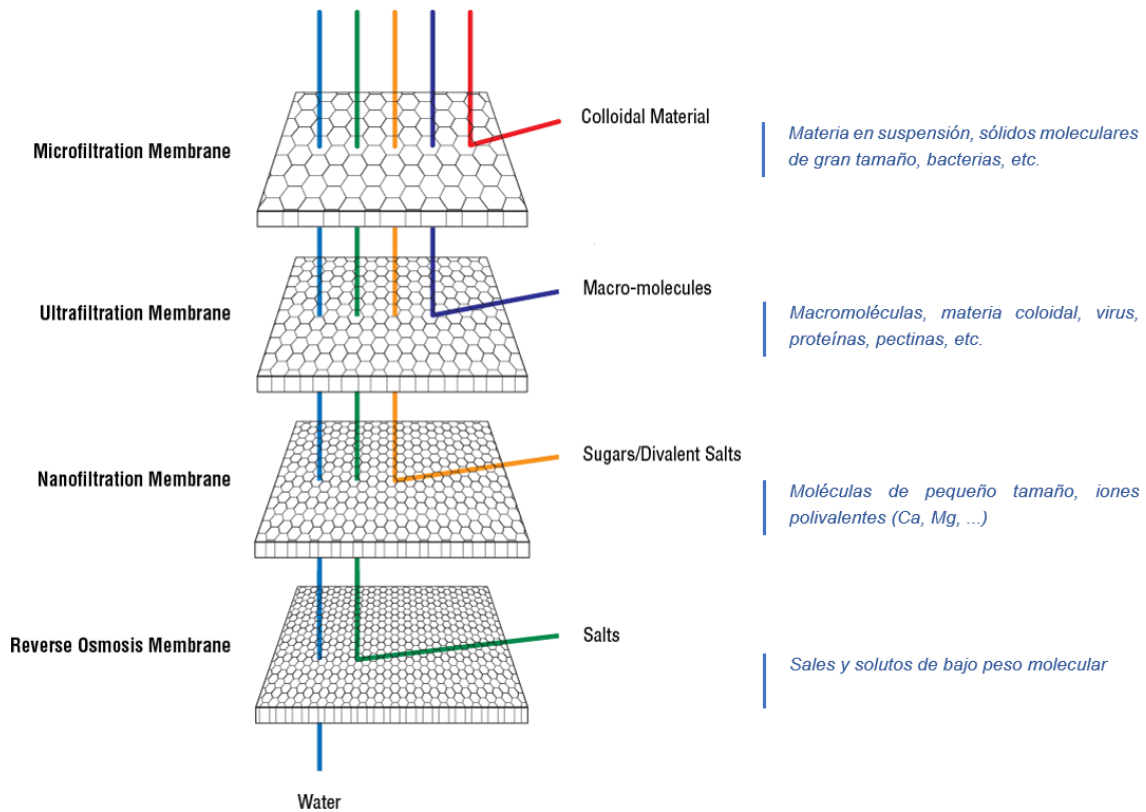


Figura 1: Separación de diferentes compuestos mediante procesos de membrana por presión. Obtenido de (<https://membranespecialists.com/>)

En los procesos de separación de membranas se distinguen dos modos de operación, los procesos de flujo cruzado o perpendicular y procesos de flujo tangencial (Figura 2). En el caso de flujo cruzado la alimentación se bombea de forma perpendicular a la membrana, mientras que en el flujo tangencial la alimentación se bombea de forma tangencial sobre la superficie de la membrana reduciendo de esta forma el ensuciamiento de la membrana y resultando en mayores flujos de permeado.

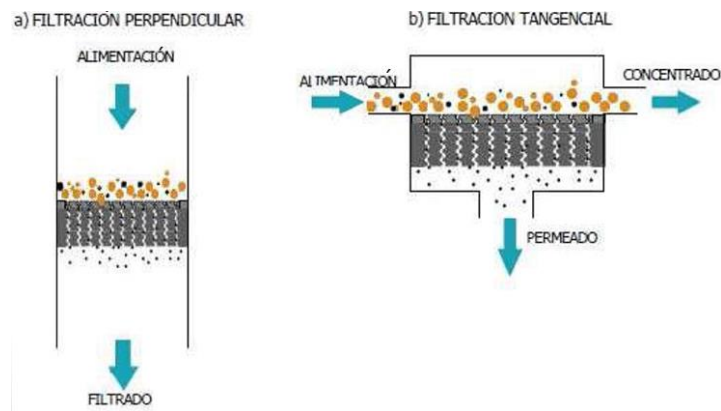


Figura 2: Comparación flujo perpendicular y tangencia. Obtenido de [Filtración de agua por membranas \(cinvestav.mx\)](http://filtración.de.agua.por.membranas/cinvestav.mx)

2. OBJECTIVES

The aim of this study was the separation of biocompounds from aqueous and ethanolic-aqueous extracts of olive leaves obtained through ultrafiltration and nanofiltration processes. To achieve the main goal of this work, the following partial objectives are proposed:

- (1) Obtaining conventional extracts of olive leaves using water as solvent and a hydroalcoholic mixture of 80 % ethanol (v/v).
- (2) Characterization of some of the biocompounds obtained in the liquid extracts.
- (3) Studies of ultrafiltration and nanofiltration processes to separate phenolic compounds and sugars obtained in the extracts.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Hojas de olivo (OL):

Las hojas de olivo que se utilizaron en este estudio pertenecen de la variedad española "Serrana de Espadán", proporcionado por Maicas-Sediles (Teresa, Castellón). Primero, las OL se secaron en un horno de convección a 45°C para reducir hasta un 10 % su contenido en humedad. Después del secado, se trituraron las OL con un molino de cuchillas (Retsch SM100, Retsch Technology GmbH, Germany) y así obtener un tamaño de



partícula entre 0.5 y 0.1 mm aumentando la superficie de contacto con el solvente y mejorando la extracción. Las OL españolas fueron caracterizadas según los protocolos de Standard Biomass Analytical Methods descritos por National Renewable Energy Laboratory (<https://www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html>). La composición química fue estudiada anteriormente por el área de ingeniería química y se muestra en la Tabla 1 en base seca de OL (DOL). Destaca la alta composición de extractivos sobre todo en agua con un 16.4 ± 0.9 (% p/p) que incluye 2.2 (% p/p) de glucosa, 0.28 (% p/p) de sacarosa, 1.4 (% p/p) de fenoles y 0.63 (% p/p) de manitol. La composición de extractivos en etanol es más baja con un 8 ± 1 (% p/p) que incluye 0.37 (% p/p) de glucosa, 0.11 (% p/p) de sacarosa, 1.7 (% p/p) de fenoles y 3.36 (% p/p) de manitol.

Tabla 1: Composición química de "Serrana de Espadán" OL expresado como g/100 gDOL (Kashaninejad et al. 2020)

| Compuestos | %, (p/p) |
|------------------------------|--------------|
| Celulosa | 17.5 ± 0.6 |
| Hemicelulosa | 12.5 ± 0.5 |
| Xilosa | 7.8 ± 0.3 |
| Galactosa | -- |
| Arabinosa | 4.7 ± 0.2 |
| Manosa | -- |
| Extractivos | 24.6 ± 2 |
| Extractos solubles en agua | 16.4 ± 0.9 |
| Glucosa | 2.2 ± 0.2 |
| Sacarosa | 0.28 ± 0.04 |
| Fenoles | 1.4 ± 0.1 |
| Manitol* | 0.63 ± 0.02 |
| Extractos solubles en etanol | 8 ± 1 |
| Glucosa | 0.37 ± 0.01 |
| Sacarosa | 0.11 ± 0.01 |
| Fenoles | 1.7 ± 0.1 |
| Manitol* | 3.36 ± 0.01 |
| Lignina insoluble en ácido | 10.76 ± 0.02 |
| Lignina soluble en ácido | 6.2 ± 0.3 |
| Cenizas | 4.69 ± 0.02 |
| Lípidos | 2.7 ± 0.2 |
| Proteínas | 10.3 ± 0.4 |

*Total mannitol content as determined by Oddo *et al.*

(Oddo et al. 2002) = 5.50 ± 0.5 % (w/w)

3.2. Procesos de extracción convencional

La extracción se llevó a cabo mediante maceración en agua o una mezcla hidroalcohólica con el 80 % (v/v) de etanol en un agitador orbital (Grant instruments - OLS 200, Shepreth Cambridgeshire, Inglaterra) durante 1 h a 50°C y una relación disolvente:hojas de olivo 20 mL:g_{DOL}. Se realiza a 50°C el baño ya que mejora la solubilidad y difusividad de los compuestos que nos interesa extraer y mejora la transferencia de masa entre la matriz y el solvente. (Kashaninejad et al. 2020). Después, se centrifugó (Thermofisher Waltham-MA, USA, model Sorvall ST 16R) a 4000 rpm durante 12 minutos a una temperatura de 10°C. Y finalmente se congelaron las muestras para continuar con los procesos de filtración otro día.

3.3. Procesos de membrana

Se realizaron las diferentes separaciones de membrana en una celda con agitación (HP4750 – Sterlitech Corporation). Se analizaron las soluciones de alimentación, permeado y retenido de los procesos de UF y NF. En la Figura 3 se puede ver la celda conectada a la bombona de nitrógeno y como por el capilar de la celda sale el permeado.



Figura 3: Sistema membranas

El rechazo (R) de cada membrana hacia los biocompuestos determinados en los extractos se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$R = \left(1 - \left(\frac{C_{i,p}}{C_{i,f}} \right) \right) * 100 \quad [1]$$

Donde $C_{i,p}$ es la concentración del biocompuesto en el permeado y $C_{i,f}$ es la concentración en la alimentación. Asimismo, se evaluó la recuperación (Y) tanto en el permeado como en el retenido como la siguiente relación de masa:

$$Y(\%) = \frac{m_{i,p-r}}{m_{i,f}} \cdot 100 \quad [2]$$

Donde $m_{i,p-r}$ es la masa del biocompuesto en la corriente de retenido o permeado y $m_{i,f}$ es la masa del biocompuesto en la alimentación.

El factor de reducción de volumen (VRF) va a ser el mismo en todos los procesos de filtración, en el caso de este trabajo el VRF es dos. De esta forma, permeado y retenido tienen el mismo volumen para poder comparar las concentraciones de los compuestos bioactivos en las dos corrientes. Para ello, en la celda se introdujeron entre 200 y 250 mL de alimentación y se recogieron entre 100 - 125 mL de permeado y retenido.

Las membranas utilizadas en este estudio fueron tres, dos para realizar las ultrafiltraciones y una tercera para realizar las nanofiltraciones. En la Tabla 2 se recogen las diferentes características de cada una de ellas.

Tabla 2: Características membranas utilizadas en el estudio.

| Nombre Membrana | Empresa | Tamaño poro | Material de la membrana | Proceso | Presión del proceso |
|-----------------------------|------------------------|-------------|-------------------------|----------------------|---------------------|
| Membrane, MK, PES, UF, 1/Pk | Sterlitech Corporation | 30 kDa | Polietersulfona (PES) | Ultrafiltración (UF) | 7 bar |
| Membrane, ST, PES, UF, 1/Pk | Sterlitech Corporation | 10 kDa | Polietersulfona (PES) | Ultrafiltración (UF) | 7 bar |
| NADIR NP030 P | Microdyn Nadir | 500 Da | Polietersulfona (PES) | Nanofiltración (NF) | 15 bar |

3.4. Compuestos fenólicos totales (Método de Folin-Ciocalteu)

Los polifenoles totales (TPC) se determinaron utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Se mezclaron 100 μ L del extracto con 2.8 ml de agua y posteriormente con 100 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después, se añadieron a la mezcla 2 mL de carbonato sódico al 7.5 % (w/v). La absorbancia se midió a 750 nm (espectrofotómetro V-750, Jasco, Japan) después de 60 min dejando reaccionar la mezcla en oscuridad (ver Figura 4). Se utilizó una curva de calibración ya calculada con soluciones estándar de ácido gálico y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de solvente, mg GAE/L.

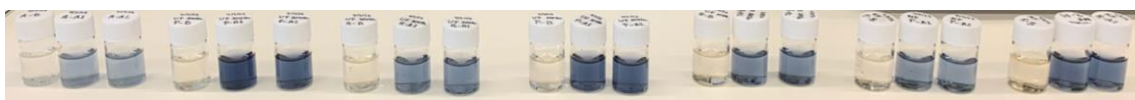


Figura 4: Muestras con sus blancos antes de medir en espectrofotometría después de estar 60 min en oscuridad.

3.5. Capacidad reductora (Método FRAP)

La capacidad antioxidante es una medida que describe la capacidad para estabilizar radicales libres en diferentes sistemas (Vazquez-Olivo 2016). Un antioxidante es una agente con capacidad de donar electrones para poder estabilizar los radicales libres, en el caso de los compuestos fenólicos estos tienen capacidad de donar uno o más de sus electrones a los radicales libres (Vazquez-Olivo 2016). El método FRAP se realizó de acuerdo con Benzie and Strain (Benzie y Strain 1996). Se añadió 2850 μ L del reactivo preparado para FRAP y 150 μ L de extracto de OL y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. La absorbancia se midió a 593 nm. Como solución estándar se utilizó $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M) y, por tanto, los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de FeSO_4 por litro de solvente, $\text{mgFe}^{2+}/\text{L}$.

3.6. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos individuales y azúcares

La separación cromatográfica se realizó mediante HPLC/DAD Agilent 1110 (Agilent Technologies, Inc., U.S.A.) utilizando una columna Kinetex® 5 μ m Biphenyl 100 Å, 250 x 4.6 mm (ver Figura 5). Los compuestos fenólicos se analizaron utilizando un gradiente lineal de dos disolventes: disolvente A (acetato de amonio 5mM con ácido acético al 1% en agua) y disolvente B (acetato de amonio 5 mM con ácido acético al 1% en acetonitrilo). El perfil de gradiente se presenta en Tabla 3 con un post-time de 10 min. La velocidad de flujo se estableció a 0.8 mL/min y la temperatura de columna fue 25 °C. La detección de UV-visible se realizó a 240, 280, 330, 340, 350



Figura 5: HPLC polifenoles

y 370 nm. Antes de la inyección, los extractos se filtraron a través de filtros de 0.45 μm de tamaño de poro para las muestras en solvente agua y para las muestras en solvente 80% de etanol se filtraron con filtros de 0.25 μm de tamaño de poro. La identificación de los compuestos polifenólicos individuales se llevó a cabo comparando los tiempos de retención y los datos espectrales con los de los estándares auténticos (hidroxitirosol, rutina, verbascósido, luteoli-7-O-glucósido, oleuropeína). Se prepararon soluciones estándar mediante disolución de los compuestos en metanol. Los resultados se expresaron como mg de compuesto fenólico por volumen de disolvente.

Tabla 3: Gradiente de disolvente HPLC-DAD para análisis de polifenoles

| | | | | | | | | | |
|--------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| %B | 2 | 2 | 8 | 10 | 18 | 38 | 65 | 80 | |
| T, min | 0 | 7 | 20 | 35 | 55 | 65 | 75 | 80 | 90 |

La identificación y cuantificación de carbohidratos solubles se realizó mediante HPLC-RID Agilent 1260 con columna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) (ver Figura 6) utilizando H_2SO_4 10 mM como fase móvil con un caudal de 0.6 mL \cdot min⁻¹. La columna y el detector se mantuvieron a 40 °C. Se utilizaron carbohidratos solubles puros para la calibración de Sigma-Aldrich adquiriendo xilosa, galactosa, arabinosa, glucosa, sacarosa y manitol. Los resultados se expresaron como mg de carbohidratos por volumen de disolvente.



Figura 6: HPLC carbohidratos

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se presenta la caracterización del extracto acuoso (apartado 4.1.) e hidroalcohólico (apartado 4.2.) obtenidos según su contenido en compuestos fenólicos totales, compuestos fenólicos individuales, capacidad reductora, sólidos solubles y contenido en azúcares solubles. En segundo, se han estudiado los diferentes características y comportamientos de los procesos de separación por membranas. Y, por último, se han caracterizado los polifenoles y azúcares individuales solubles en solvente acuoso y en solvente hidroalcohólico (80% etanol y 20% agua).

4.1. Separación y fraccionamiento de los extractos acuosos mediante procesos de membrana

En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización del extracto obtenido empleando agua como disolvente a 50°C y una relación biomasa:disolvente igual a 20 mL:g_{DOL}. A pesar de que el agua no es buen disolvente para muchos de los compuestos fenólicos encontrados en las hojas de olivo, sí que extraerá fácilmente los azúcares solubles presentes en las hojas de olivo. La composición del extracto acuoso se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Concentraciones de polifenoles totales, capacidad antioxidante, polifenoles individuales, azúcares y sólidos solubles en extracto acuoso.

| Parámetro | Unidades de masa /unidad de volumen | |
|---|-------------------------------------|------------|
| TPC, mg GAE/L | 1202 ± 62 | |
| Capacidad reductora, mg Fe ²⁺ /L | 1867 ± 42 | |
| Compuestos fenólicos individuales, mg /L | Hidroxitirosol | 15 ± 3 |
| | Rutina | 7 ± 1 |
| | Verbascosido | 11.9 ± 0.2 |
| | Luteolin-7-O-glucósido | 71.0 ± 0.2 |
| | Oleuropeína | 27 ± 0.7 |
| Azúcares individuales, mg /L | Manitol | 2468 ± 20 |
| | Glucosa | 2318 ± 4 |
| | Sacarosa | 348 ± 4 |
| | Xilosa | 470 ± 9 |
| | Arabinosa | 210 ± 71 |
| Sólidos solubles, g/100mL | 0.92 ± 0.01 | |

En los datos recogidos en la Tabla 4, el compuesto fenólico mayoritario es el luteolin-7-O-glucósido seguido de la oleuropeína. Y el compuesto fenólico que se determinó en menor concentración es la rutina. Dentro de los carbohidratos, los dos mayoritarios son el manitol y la glucosa, siendo el minoritario la arabinosa.

En segundo lugar, se determinó el flujo del agua pura para cada una de las membranas estudiadas (Figura 8a). Se puede observar cómo a medida que el tamaño de poro disminuye también lo hace el flujo de permeado. En todos los casos existe un período de acondicionamiento de la membrana y luego ya el flujo permanece estable, con valores de 226.5 L/m²h en la UF con membrana de 30 kDa, 133.3 L/m²h en la UF con membrana de 10 kDa y 57.75 L/m²h en la NF con membrana de 500 Da.

El flujo de permeado de los extractos acuosos se representa en la Figura 8b. Con los extractos acuosos el flujo de permeado disminuye considerablemente comparándolo con el flujo de agua pura. Por ejemplo, en las membranas de NF, el descenso del flujo supuso un valor de flujo de permeado de entre un 80-90 % del valor de flujo con agua. Este descenso se debe al ensuciamiento que sufre la membrana, además, como estamos en un proceso de membrana de flujo perpendicular (Figura 2) la membrana se ensucia más rápidamente que si fuera un sistema de filtración tangencial. Este tipo de estudios llevados a cabo en este trabajo, sirven para ayudar a la elección del mejor método de separación por membrana, así como el material.

Podemos observar tras los procesos de separación de membrana como los retenidos tienen un color más oscuro que el de los permeados (ver Figura 7). Y, como influye el tamaño de poro de membrana, ya que, partiendo de la misma alimentación, obtenemos diferentes tonalidades de permeado, yendo del más oscuro (membrana de tamaño de poro de 30 kDa), a más claro (membrana de tamaño de poro de 500 Da). Y viceversa con el retenido, a menor tamaño de poro de membrana más oscuro es y esto se debe a la retención de membrana que veremos más adelante en este trabajo.

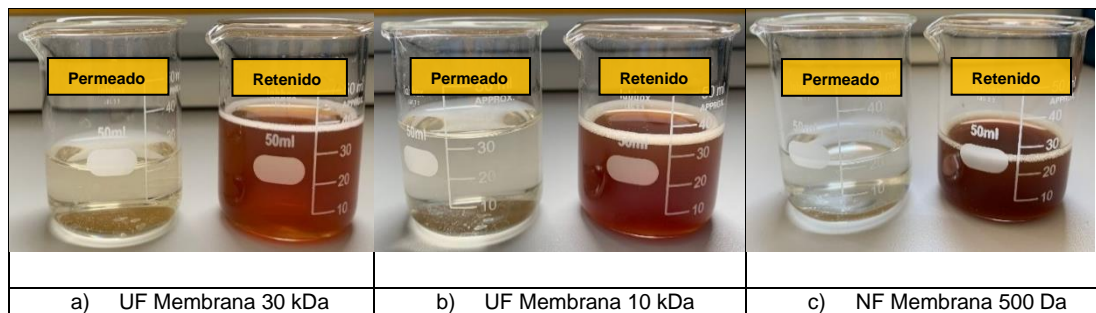


Figura 7: Diferencias de color de permeado y retenido después de los diferentes procesos de separación por membranas.

He de recordar que comparamos (en la Figura 8) entre las dos ultrafiltraciones realizadas a 7 bar y también la nanofiltración realizada a 15 bar; las tres membranas utilizadas son del mismo material (PES). La presión de trabajo ha de ser mayor en el caso de la nanofiltración al ser un tamaño de poro mucho menor, obteniendo menores flujos de permeado en la nanofiltración que en las ultrafiltraciones.

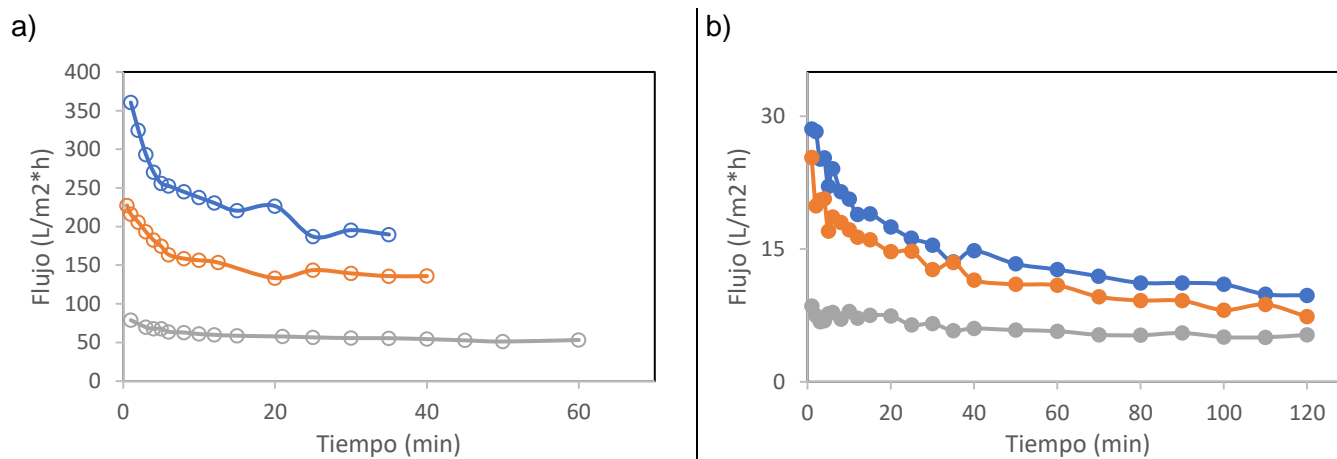


Figura 8: Comparación de flujo con y sin extracto. (a) flujos agua pura (b) flujos de extracto acuoso

❖ Legenda: Color azul: UF (30 kDa – PES); Color naranja: UF (10 kDa – PES); Color gris: NF (500 Da -PES)

Los datos recogidos en la Tabla 5 muestran que al ultrafiltrar y nanofiltrar el extracto acuoso, se retienen (R) más del 72% de los polifenoles totales por las membranas de los diferentes procesos. Mediante Startgraphics se realizó una prueba de rango múltiple para el factor de retención de membrana. El método utilizado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher. Se llama a cada par de medias significativamente diferente cuando la diferencia real es igual a 0. Por tanto, se puede decir que los porcentajes de retención de las membranas de UF (30 kDa y 10 kDa) son no son significativamente diferentes mientras que el porcentaje de retención de la membrana de NF si es significativamente diferente. Por tanto, a menor tamaño de poro mayor porcentaje de rechazo (R) de la membrana.

Se puede ver en la Tabla 5 que se recuperan (Y) muchos más polifenoles totales en el retenido que en el permeado, siendo la recuperación en los retenidos mayor del 81%. Por acción del tamaño de poro de membrana, a menor tamaño de poro menor concentración y recuperación de polifenoles totales en el permeado. Con el cálculo de la recuperación en ambas fases generadas (retenido y permeado) comprobamos los balances de materia, observando que las desviaciones son en torno al 5 % para los procesos de UF, mientras que para la NF, la desviación fue ligeramente superiores (en torno al 15 %). Por otra parte,

la interacción entre polifenoles y proteínas solubilizadas con las membranas, hace muchas veces difícil su cuantificación.

Por otro lado, y siguiendo la línea de lo anteriormente comentado, hay más sólidos solubles en el retenido que en el permeado y esto se debe a la membrana que retiene gran parte de los sólidos de la alimentación.

Tabla 5: Concentraciones de polifenoles totales, capacidad antioxidante, sólidos totales y balances de materia de las diferentes muestras acuosas

| Parámetros / Muestras | TPC, mg GAE/L | | Y, (%) | R*, (%) | FRAP, mg FeSO ₄ /L | | Sólidos solubles totales, g/100mL | |
|-----------------------|-----------------------|-----------|--------|-------------------|-------------------------------|------------|-----------------------------------|-------------|
| Alimentación | C _A , mg/L | 1202 ± 62 | -- | -- | 1867 ± 42 | | 0.91 ± 0.01 | |
| UF 30 kDa | C _R , mg/L | 1965 ± 22 | 81.7 | 72.6 ^a | C _R , mg/L | 2863 ± 28 | C _R , mg/L | 1.8 ± 0.4 |
| | C _P , mg/L | 329 ± 49 | 13.7 | | C _P , mg/L | 488 ± 57 | C _P , mg/L | 0.13 ± 0.04 |
| UF 10 kDa | C _R , mg/L | 2015 ± 11 | 83.8 | 75.3 ^a | C _R , mg/L | 2990 ± 152 | C _R , mg/L | 1.8 ± 0.3 |
| | C _P , mg/L | 297 ± 1 | 12.3 | | C _P , mg/L | 365 ± 20 | C _P , mg/L | 0.17 ± 0.01 |
| NF 500 Da | C _R , mg/L | 2606 ± 20 | 108.4 | 86.2 ^b | C _R , mg/L | 4026 ± 218 | C _R , mg/L | 2.0 ± 0.01 |
| | C _P , mg/L | 166 ± 5 | 6.9 | | C _P , mg/L | 243 ± 8 | C _P , mg/L | 0.21 ± 0.02 |

- ❖ **Legenda:** C_R: Concentración en retenido; C_P: Concentración en permeado; Y: Recuperación de PTC; R: Retención de membrana.
- ❖ **R*:** Mediante Startgraphics se realiza una prueba de rango múltiple para el factor de retención de membrana. El método utilizado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher.

Con la capacidad antioxidante (FRAP) ocurre similar a los polifenoles totales, hay mayor capacidad antioxidante en el retenido que en el permeado (Tabla 5). Mediante Startgraphics se ha visto la correlación que hay entre la capacidad reductora (FRAP) y la concentración de polifenoles totales (TPC) de las distintas fases obtenidas (ver en Tabla 6). En la Tabla 6 se muestran las correlaciones de rango de Spearman entre cada par de variables. Estos valores de correlación oscilan entre -1 y +1 y miden la fuerza de la asociación entre las variables. Los coeficientes de Spearman se calculan a partir de los rangos de los valores de los datos. Entre paréntesis se muestra el número de pares de valores de datos utilizados para calcular cada coeficiente. Los números en rojo son un valor P que prueba la significativa estadística de las correlaciones estimadas. Lo valores de P por debajo de 0.05 indican correlaciones distintas de cero estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95.0%. Por tanto, como resultado fue que PTC (mg GAE/L) y FRAP (mg FeSO₄/L) tienen valores de P por debajo de 0.05 (ver en Tabla 6), por lo tanto, son estadísticamente significativos concluyendo que los polifenoles totales están directamente relacionados con el poder antioxidante del extracto de hojas.

Tabla 6: Startgraphics: Correlaciones de rango de Spearman “La capacidad antioxidante y los polifenoles totales son directamente proporcionales”

| | | |
|-------------|----------------|----------------|
| | PTC (mg/L) | FRAP (mg/L) |
| PTC (mg/L) | | 0,9560 (14) |
| | | 0,0006 |
| FRAP (mg/L) | 0,9560 (14) | |
| | 0,0006 | |

4.1.1. Caracterización de polifenoles individuales en extractos acuosos

Mediante HPLC según se describió en la sección 3.6. de este trabajo, se obtuvieron las áreas que correspondían a los compuestos fenólicos individuales (Figura 9) y se calculó las concentraciones de cada uno de ellos con la ayuda de la correspondiente curva de calibrado.

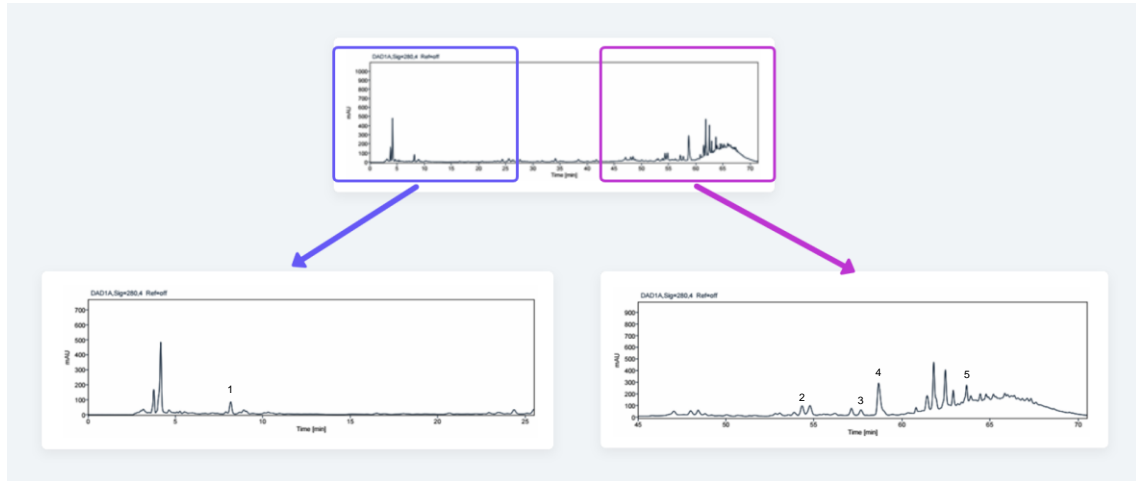


Figura 9: Cromatograma de la muestra “alimentación” de extracto acuoso. Señal: 280 nm. Volumen pinchazo en HPLC: 40 µL. Leyenda: (1) Hidroxitirosol, (2) Rutina, (3) Verbascósido, (4) Luteolin-7-O-glucósido, (5) Oleuropeína.

Se caracterizaron los polifenoles individuales de el extracto acuoso ultrafiltrado y nanofiltrado. En la siguiente tabla se muestran las respectivas concentraciones de polifenoles individuales en cada fase, la retención de membrana y la recuperación de cada uno de ellos en las fases generadas:

Tabla 7: Concentración (mg/L), retención (%) y recuperación (%) de polifenoles individuales en cada muestra del extracto acuoso.

| Parámetro | Polifenoles | Hidroxitirosol | Rutina | Verbascósido | Luteolin-7-O-glucósido | Oleuropeína |
|--------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------------|-----------------|
| | Muestras | | | | | |
| C_A , mg/L | Alimentación | 15 ± 3 | 7 ± 1 | 11.9 ± 0.2 | 71.0 ± 0.2 | 27.0 ± 0.7 |
| C_R , mg/L | UF 30 kDa | 10.1 ± 0.1 | 14.0 ± 0.3 | 18.2 ± 0.3 | 117.6 ± 1.2 | 23 ± 2 |
| C_P , mg/L | | 12.2 ± 0.1 | 1.36 ± 0.01 | 2.063 ± 0.003 | 6.67 ± 0.03 | 31.2 ± 0.1 |
| R, % | | 19.9 | 80.6 | 82.7 | 90.6 | -- |
| Y_R , % | | 33 | 99.6 | 76.4 | 82.8 | 42.7 |
| Y_P , % | | 40 | 9.7 | 8.7 | 4.7 | 57.8 |
| C_R , mg/L | | UF 10 kDa | 0.8 ± 0.1 | 10.9 ± 0.6 | 20.8 ± 0.2 | 118.2 ± 0.7 |
| C_P , mg/L | 27.3 ± 0.6 | | 0.3 ± 0.2 | 1.753 ± 0.005 | 4.7 ± 0.1 | 37.7 ± 0.6 |
| R, % | -- | | 95.5 | 85.3 | 93.4 | -- |
| Y_R , % | 2.7 | | 77.9 | 87.3 | 83.2 | 16.4 |
| Y_P , % | 89.6 | | 2.3 | 7.4 | 3.3 | 70 |
| C_R , mg/L | NF 500 Da | | 23.0 ± 0.8 | 10.3 ± 0.3 | 18.3 ± 0.1 | 98.7 ± 0.3 |
| C_P , mg/L | | 8.91 ± 0.02 | 0.9 ± 0.2 | 0.9 ± 0.1 | 1.48 ± 0.01 | 8.74 ± 0.01 |
| R, % | | 41.6 | 87.2 | 92.6 | 97.9 | 67.6 |
| Y_R , % | | 75.3 | 73.8 | 76.8 | 69.5 | 18.3 |
| Y_P , % | | 29.2 | 6.4 | 3.7 | 1 | 16.2 |

❖ **Leyenda:** C_A : Concentración alimentación C_R : Concentración en retenido; C_P : Concentración en permeado; R: Retención de membrana; --: Sin retención de membrana; Y: Recuperación de polifenoles.

Los polifenoles caracterizados son el hidroxitirosol, la rutina, el verbascósido, el luteolin-7-O-glucósido y oleuropeína. Observando individualmente los compuestos fenólicos individuales recogidos en la Tabla 7, podemos ver que la mayoría de los compuestos fueron recuperados (Y) más del 80%, habiendo excepciones en la UF con membrana de 30 kDa de tamaño de poro donde se recupera un 73.1% de hidroxitirosol y en la NF donde se recupera un 70.5% de luteolin-7-O-glucósido y un 34.5% de oleuropeína. Estas pérdidas pueden suceder por interacciones con la membrana en la que estos compuestos quedan retenidos en ella y no quedan ni en el permeado ni en el retenido o por interacciones con otros compuestos como proteínas siendo muy difícil su detección. Los compuestos que se recuperan en mayor porcentaje en el retenido de ambas UF (30 kDa y 10 kDa) son la rutina, el verbascósido y luteolin-7-O-glucósido mientras que el hidroxitirosol y la oleuropeína se recuperan en mayor porcentaje en el permeado.

Fijándonos en los datos recogidos de retención (R) de cada una de las membranas en la Tabla 7, la membrana de UF de tamaño de poro de 30 kDa retiene en mayor porcentaje a la rutina, al verbascósido y al luteolin-7-O-glucósido. Y esta membrana retiene en menor medida a hidroxitirosol y no retiene oleuropeína. En el caso de la membrana de UF de tamaño de poro 10 kDa ocurre similar a la anterior membrana de UF, los compuestos fenólicos que más retiene son rutina, verbascósido y luteolin-7-O-glucósido. Y esta membrana no retiene hidroxitirosol y oleuropeína. Por último, con la membrana de NF vemos que los tres compuestos que más se retenían con las dos membranas anteriores también son los que más se retienen en esta membrana. A diferencia de las dos membranas de UF, la membrana de NF retiene gran parte del hidroxitirosol y un pequeño porcentaje de oleuropeína, mientras que en este último compuesto (oleuropeína) no se había conseguido retener con las membranas de UF.

Se puede ver en la Tabla 7 que la retención de membrana (R) influye en las concentraciones finales y recuperaciones de cada compuesto en el permeado y retenido. La rutina, el verbascósido y el luteolin-7-O-glucósido al ser los tres compuestos fenólicos que más se retienen, se encuentra mayor concentración (mg/L) en el retenido que en el permeado en los tres procesos de membranas. En cambio, como se ha comentado antes, el hidroxitirosol en las UF no se retiene prácticamente, por tanto, pasa gran parte al permeado mientras que, en la NF se retiene prácticamente todo de hidroxitirosol, quedando una concentración más elevada en el retenido que en el permeado nanofiltrado. Ocurre lo mismo con la oleuropeína en ambas UF, al no haber retención de membrana pasa gran parte al permeado y en la NF al haber retención de este compuesto aumenta la concentración de retenido y se reduce la de permeado. Por tanto, a menor tamaño de poro de membrana mayor retención de esta y menor concentración de compuesto pasa al permeado.

Finalmente se determinó mediante desorción la posible adsorción de compuestos fenólicos en las membranas dejando la membrana (ya utilizada tras el proceso de separación por membranas) 24 horas a temperatura ambiente en etanol. Se observó adsorción mayoritaria de oleuropeína, adsorbida en la membrana de nanofiltración (no cuantificada); mientras que se observó cantidades minoritarias de luteolin-7-O-glucósido en la misma membrana (NF) o de hidroxitirosol en la membrana de ultrafiltración de 30 kDa de tamaño de poro.

4.1.2. Caracterización de azúcares en extractos acuosos

Mediante HPLC según se describió en la sección 3.6. de este documento, se obtuvieron las áreas que correspondían a los azúcares (Figura 10) y se calculó las concentraciones de cada uno de ellos con la ayuda de la correspondiente curva de calibrado. Se caracterizaron los azúcares de el extracto acuoso ultrafiltrado y nanofiltrado.

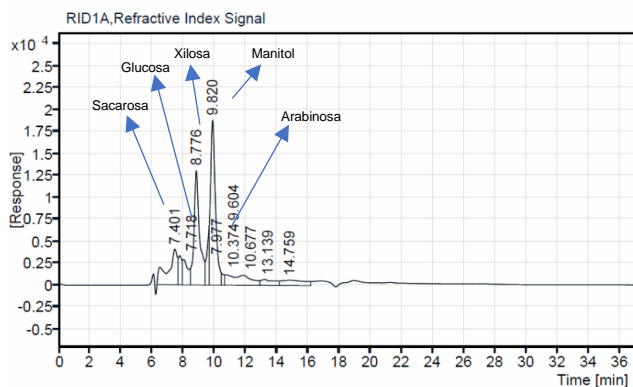


Figura 10: Cromatograma azúcares (HPLC). Muestra “alimentación” del extracto acuoso. Pinchazo: 10 μ L.

En la Tabla 8 se recoge la concentración de cada fase generada (retenido y permeado), la retención y la recuperación de los azúcares extraídos en el extracto acuoso.

Tabla 8: Concecntración (mg/L), retención (%) y recuperación (%) de azúcares en extracto acuoso.

| Parámetro | Azúcares | | | | | |
|--------------|--------------|--------------|----------------|--------------|---------------|---------------|
| | Muestras | Sacarosa | Glucosa | Xilosa | Manitol | Arabinosa |
| C_A , mg/L | Alimentación | 349 \pm 4 | 2319 \pm 4 | 470 \pm 9 | 2468 \pm 20 | 210 \pm 71 |
| C_R , mg/L | UF 30 kDa | 655 \pm 3 | 3599 \pm 18 | 804 \pm 18 | 3695 \pm 15 | 275 \pm 12 |
| C_P , mg/L | | 63 \pm 1 | 724 \pm 9 | 136 \pm 13 | 1013 \pm 13 | 0.0 \pm 0.0 |
| R, % | | 81.8 | 68.8 | 71 | 59 | 100 |
| Y_R , % | | 92.12 | 76.05 | 83.73 | 73.34 | 64.15 |
| Y_P , % | | 81.85 | 68.76 | 71.02 | 58.98 | 100 |
| C_R , mg/L | UF 10 kDa | 731 \pm 2 | 3855 \pm 120 | 840 \pm 34 | 3866 \pm 1 | 268 \pm 4 |
| C_P , mg/L | | 38 \pm 1 | 618 \pm 1 | 139 \pm 2 | 861 \pm 4 | 0.0 \pm 0.0 |
| R, % | | 89.2 | 74 | 70 | 65 | 100 |
| Y_R , % | | 98.6 | 78.14 | 83.9 | 73.6 | 60 |
| Y_P , % | | 5.2 | 12.72 | 14.2 | 16.7 | -- |
| C_R , mg/L | NF 500 Da | 732 \pm 17 | 3880 \pm 57 | 819 \pm 32 | 4052 \pm 26 | 278 \pm 20 |
| C_P , mg/L | | 27 \pm 5 | 367 \pm 1 | 77 \pm 3 | 521 \pm 5 | 0.0 \pm 0.0 |
| R, % | | 92 | 84 | 84 | 79 | 100 |
| Y_R , % | | 97 | 77 | 80 | 76 | 61 |
| Y_P , % | | 3.7 | 8 | 8 | 10 | -- |

❖ **Legenda:** C_A : Concentración en alimentación; C_R : Concentración en retenido; C_P : Concentración en permeado; R: Retención de membrana; Y: Recuperación de polifenoles.

En la Tabla 8 se puede ver que los azúcares caracterizados son la sacarosa, la glucosa, la xilosa, el manitol y la arabinosa de los cuales la arabinosa queda el 100% en el retenido. El resto de los azúcares si se encuentran en el permeado, pero en menor cantidad que en el retenido según se observa en los elevados factores de retención, en torno al 60-80%. Concluyendo que los azúcares se retienen en mayor medida en el retenido después de la ultrafiltración. Los dos azúcares más retenidos por la membrana es la arabinosa y la sacarosa y el menos retenido es el manitol.

Recuperamos el 100% de sacarosa, mientras que del resto de azúcares recuperamos más del 90% excepto de arabinosa que hay más pérdidas (Tabla 8). Las pérdidas de arabinosa pueden deberse a que puede que haya pasado algo de arabinosa al permeado, pero no se haya podido detectar con el HPLC o que haya interactuado con la membrana u otros compuestos y no hayamos podido detectarlo.

A pesar del pequeño tamaño molecular de los azúcares y polifenoles se observa una alta retención de los mismos. Esto probablemente sea debido a las interacciones complejas entre proteínas disueltas, polifenoles y azúcares con la membrana. Los polifenoles tienden a unirse de forma no covalente a proteínas y polisacáridos (Cassano et al. 2018). También puede ocurrir que se fabriquen membranas con poros asimétricos que no corresponden con el rango del MWCO y, por tanto, a mayor volumen de poros pequeños en la capa superior de la membrana más ensuciamiento de esta (Cassano et al. 2018). Hay otros estudios que hablan de formaciones de enlaces polares y múltiples enlaces de hidrógeno con aditivos (como polivinilpirrolidona) que se añaden en la fabricación de membranas PES y eso lo que aumenta la retención de estas membranas (Cassano et al. 2018).

4.2. Estudio preliminar de separación de extractos hidroalcohólicos mediante membranas

En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización del extracto obtenido empleando 80% etanol y 20% agua como disolvente a 50°C y una relación biomasa:disolvente igual a 20 mL:g_{DOL}.

Por falta de tiempo no se pudo realizar un estudio completo con extractos hidroalcohólicos, pero sí que se realizaron algunos estudios preliminares para poder comparar con los extractos acuosos. Para ello, se obtuvo un extracto hidroalcohólico a partir de las hojas de olivo utilizando la misma metodología que para los extractos acuosos. La única diferencia en la preparación del extracto es que el disolvente sería un 80% etanol y un 20% agua (v/v), en vez de 100% agua.

En la Tabla 9 se muestran los datos recogidos después de ultrafiltrar y nanofiltrar el extracto hidroalcohólico del extracto de oliva. Comparando esta tabla con los datos de extractos acuosos (Tabla 4) se puede observar que, el contenido en polifenoles totales (mg GAE/L) y capacidad reductora (mg Fe²⁺/L) es mucho mayor en los extractos hidroalcohólicos que en los extractos acuosos. Esto es debido a la mayor cantidad de oleuropeína, luteolin-7-O-glucosido, verbascosido, rutina, catequina e hidroxitirosol extraídos. Hay una mayor extracción de polifenoles porque la mezcla etanol-agua es mucha más eficiente que el solvente agua pura debido a la doble acción del agua, que hincha la matriz de la planta y mientras el etanol interrumpe la unión entre el soluto y las matrices de la planta (Kashaninejad et al. 2020). Respecto al contenido en compuesto fenólicos individuales

destaca el alto contenido en oleuropeína, compuesto fenólico individual mayoritario en las hojas de olivo. Y el menor compuesto extraído en solvente agua fue la rutina mientras que en solvente etanol la catequina.

En el caso de los azúcares extraídos, se han caracterizado los azúcares individuales extraídos en extracto etanólico (alimentación), pero no se han caracterizado los azúcares individuales de la fase retenido y permeado tras la ultrafiltración (esto se debe a falta de tiempo). Según los datos de solubilidad encontrado en bibliografía (Kashaninejad et al. 2020), la solubilidad de azúcares en mezclas hidroalcohólicas es menor que en agua. En la Tabla 9 podemos comparar los azúcares de extracto hidroalcohólico con los del extracto acuoso (ver Tabla 8) y vemos que efectivamente se han extraído menos manitol y glucosa y no se ha extraído xilosa y arabinosa en solvente agua-etanol; pero sí que se ha extraído algo más de sacarosa en solvente agua. Además, a medida que aumenta el porcentaje de etanol, menor solubilidad de estos y menor grado de extracción (Kashaninejad et al. 2020).

Por último, se determinaron más sólidos solubles en extracto etanol (ver en Tabla 9) que en extracto agua. Esto se debe a que se disuelven muchos más polifenoles totales (entre otros compuestos) en etanol-agua que en agua pura y, por ello, hay más cantidad de sólidos solubles en el extracto hidroalcohólico.

Tabla 9: Concentraciones de polifenoles totales, capacidad antioxidante, polifenoles individuales, azúcares y sólidos solubles en extracto hidroalcohólico.

| Parámetro | | Unidades de masa /unidad de volumen |
|---|------------------------|-------------------------------------|
| TPC, mg GAE/L | | 3373 ± 44 |
| Capacidad reductora, mg Fe ²⁺ /L | | 5210 ± 167 |
| Compuestos fenólicos individuales, mg /L | Hidroxitirosol | 82.6 ± 25.2 |
| | Catequina | 4.3 ± 2.6 |
| | Rutina | 23.2 ± 5.2 |
| | Verbascosido | 29.6 ± 0.5 |
| | Luteolin-7-O-glucosido | 325 ± 17 |
| | Oleuropeina | 2697 ± 85 |
| Azúcares individuales, mg /L | Manitol | 2240 ± 45 |
| | Glucosa | 495 ± 25 |
| | Sacarosa | 505 ± 30 |
| | Xilosa | -- |
| | Arabinosa | -- |
| Sólidos solubles, g/100mL | | 1.77 ± 0.01 |

➤ Leyenda: --: no encontrado

Mediante Startgraphics se ha visto la correlación que hay entre la capacidad reductora (FRAP) y la concentración de polifenoles totales (TPC) de las distintas fases obtenidas (ver en Tabla 10). En la Tabla 10 se muestran las correlaciones de rango de Spearman entre cada par de variables. Estos valores de correlación oscilan entre -1 y +1 y miden la fuerza de la asociación entre las variables. Los coeficientes de Spearman se calculan a partir de los rangos de los valores de los datos. Entre paréntesis se muestra el número de pares de valores de datos utilizados para calcular cada coeficiente. Los números en rojo son un valor P que prueba la significativa estadística de las correlaciones estimadas. Los valores de P por debajo de 0.05 indican correlaciones distintas de cero estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95.0%. Por tanto, como resultado fue que PTC (mg GAE/L) y FRAP

(mg FeSO₄/L) tienen valores de P por debajo de 0.05 (ver en Tabla 10), por lo tanto, son estadísticamente significativos concluyendo que los polifenoles totales están directamente relacionados con el poder antioxidante del extracto de hojas.

Tabla 10: Startgraphics: Correlaciones de rango de Spearman “La capacidad antioxidante y los polifenoles totales son directamente proporcionales”

| | PT | FRAP |
|------|--------|--------|
| PT | | 0,6606 |
| | | (10) |
| | | 0,0475 |
| FRAP | 0,6606 | |
| | (10) | |
| | 0,0475 | |

Sólo se realizó una única experiencia de ultrafiltración a 7 bar, haciendo pasar el extracto hidroalcohólico por una membrana igual a la que se utilizó para ultrafiltrar los extractos acuosos – membrana de tamaño de poro 10 kDa y formada por polietersulfona (PES). De esta forma pudimos comparar las diferencias y similitudes de hacer extracciones con solvente agua y con solvente hidroalcohólico.

Al ultrafiltrar mezclas hidroalcohólicas se observó que, la membrana según (Shukla y Cheryan 2002) se debía reacondicionar para que el flujo de la ultrafiltración se ralentizase. El disolvente etanol modifica la estructura de la membrana haciendo que la membrana se rompa y el flujo sea muy rápido perdiendo así la función de la membrana.

El acondicionamiento de la membrana consistió en sumergir la membrana 24 horas en concentraciones crecientes de etanol y determinar posteriormente el flujo de permeado (Shukla y Cheryan 2002). En este estudio primero se sumergió en agua y al día siguiente se sumergió en una disolución de 20% etanol y 80% agua, aumentando cada 24 horas un 20% de etanol y disminuyendo un 20% de agua hasta llegar a un 80% de etanol y un 20% de agua en la disolución donde se encuentra sumergida la membrana. Se observó cambios notorios en la textura y grosor de la membrana, dando sensación de mayor firmeza, dureza y grosor que antes de haber realizado el acondicionamiento.

Para ir comprobando que el acondicionamiento daba mejores resultados con el flujo, se realizó cada día una ultrafiltración (7 bar) con esa misma membrana que acondicionaba y como alimentación la disolución que había estado la membrana sumergida durante las 24 horas anteriores. Así, midiendo el flujo durante los cinco días que se realizó el acondicionamiento de membrana observamos que efectivamente el flujo iba disminuyendo. Se observa en la Figura 11 que el flujo vuelve a aumentar ligeramente cuando el porcentaje de etanol de la disolución que se hace pasar en la ultrafiltración es superior a 60%. Según el artículo de (Shukla y Cheryan 2002) este aumento de flujo también ocurre con membranas de otros materiales como éster de celulosa. El flujo se ha conseguido bajar de 144.5 L/m²h que era el flujo con agua pura a 105 L/m²h que es el flujo con el disolvente 80% etanol – 20% agua.

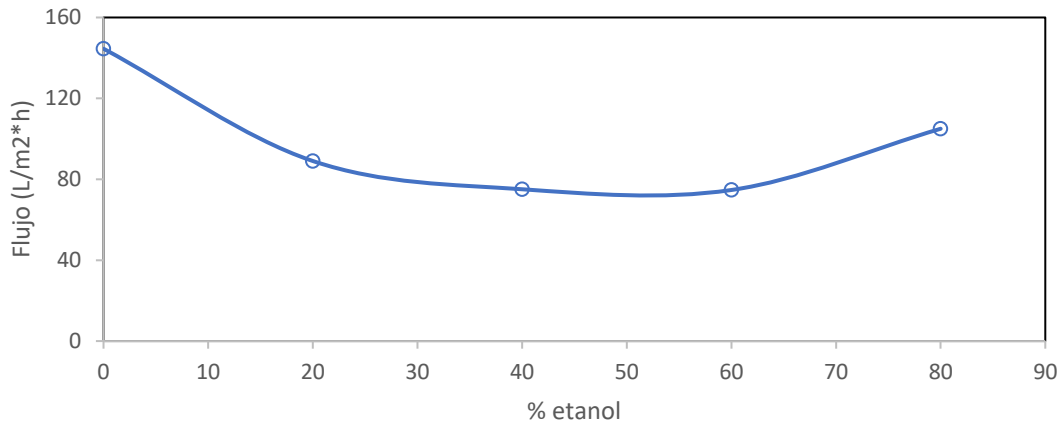


Figura 11: Evolución del flujo del solvente por la membrana mediante ultrafiltración (7 bar).

Una vez, acondicionada la membrana con el mismo porcentaje de disolventes que tiene nuestros extractos hidroalcohólicos (80% etanol y 20% agua), ya se puede trabajar con los extractos.

Realizamos una ultrafiltración a 7 bar con la membrana acondicionada. En la Figura 12 observamos que al comienzo de las ultrafiltraciones se recogen flujos bastante dispares siendo superiores a los de los extractos acuosos. Pero una vez transcurridos los primeros cinco minutos se observa como los flujos se igualan bastante no habiendo prácticamente diferencias entre uno y otro.

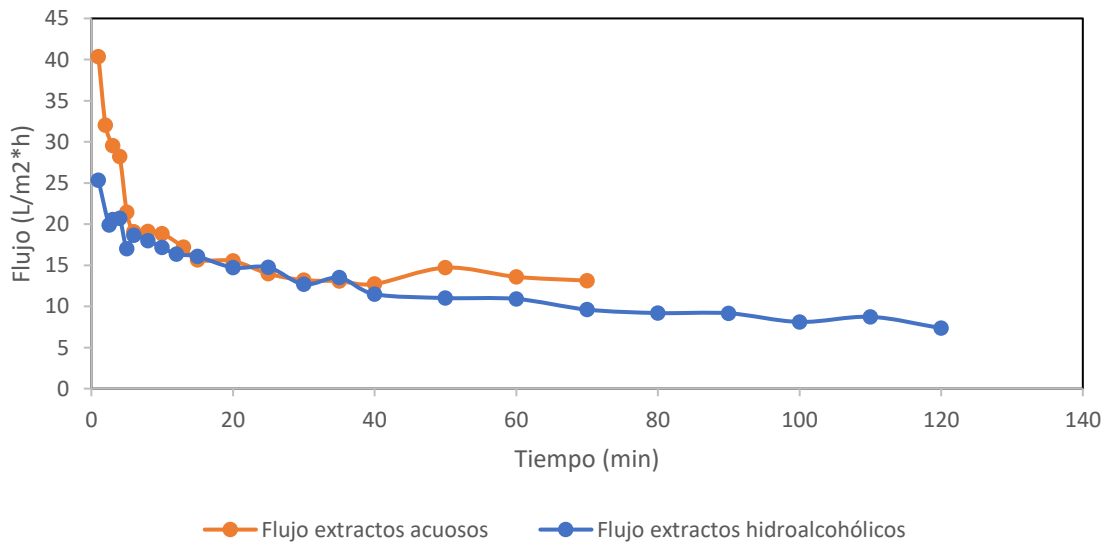
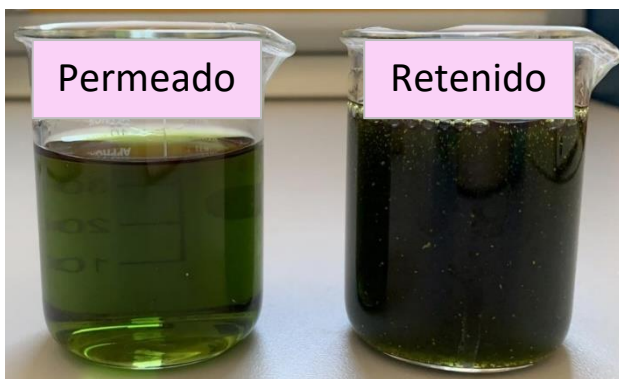


Figura 12: Comparación del flujo de permeado con extracto acuoso y extracto hidroalcohólico.



Otra diferencia que se observó fue el color de los extractos ya que, al estar en contacto el extracto de hoja de olivo junto con el etanol, la clorofila se solubiliza dando un color verdoso (ver en Figura 13).

Como ocurría con el extracto acuoso, el permeado es más claro y el retenido tiene un color más oscuro.

Figura 13: Comparación color permeado y retenido tras ultrafiltración con membrana de 10 kDa de tamaño de poro a 7 bar.

Tras haber realizado las extracciones y una vez determinados los polifenoles totales, en la Figura 14 podemos observar que hay mayor porcentaje de polifenoles totales en el retenido que en el permeado independientemente del solvente que se utilice, esto se debe a la retención de membrana. Y, si comparamos entre los dos solventes, la presencia de etanol conduce a un mayor hinchamiento de la membrana lo cual contribuye a un mayor porcentaje de recuperación (Y) de los compuestos fenólicos totales en el permeado para extractos hidroalcohólicos que para extractos acuosos.

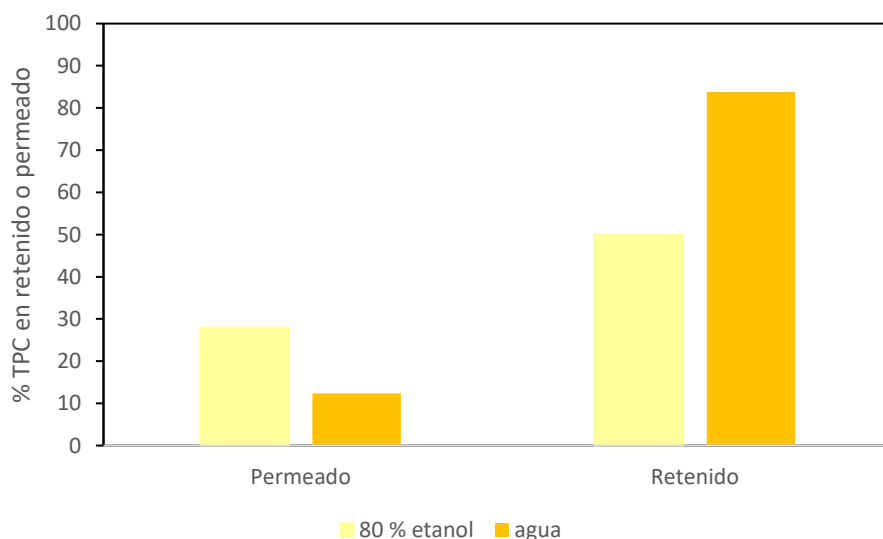


Figura 14: Comparación de % de polifenoles totales en permeado y retenido en extractos acuosos y extractos hidroalcohólicos.

4.2.1. Caracterización de polifenoles individuales en extractos hidroalcohólicos

Como se ha mencionado antes, por falta de tiempo solo hemos podido trabajar con ultrafiltración a 7 bares con la membrana de tamaño de poro de 10 kDa. Mediante HPLC según se describió en la sección 3.6. de este trabajo, se obtuvieron las áreas que correspondían a los compuestos fenólicos individuales (Figura 15) y se calculó las concentraciones de cada uno de ellos con la ayuda de la correspondiente curva de calibrado. En la Tabla 11 se puede observar las concentraciones de los polifenoles individuales extraídos de los extractos hidroalcohólicos.

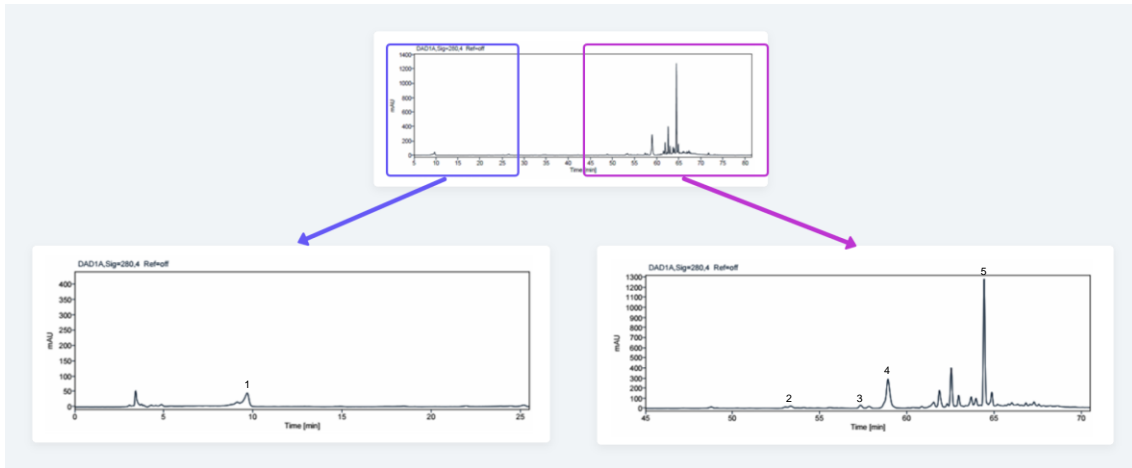


Figura 15: Cromatograma de la muestra “alimentación” de extracto hidroalcohólico. Señal: 280 nm. Volumen pinchazo en HPLC: 10 μ L. Leyenda: (1) Hidroxitirosol, (2) Rutina, (3) Verbascósido, (4) Luteolin-7-O-glucósido, (5) Oleuropeína.

Anteriormente en la Figura 14 se comentaba que se extraían más polifenoles totales en el retenido que en el permeado y podemos comprobar en la Tabla 11 que individualmente cada polifenol se encuentra en mayor concentración en el retenido que en el permeado.

Se puede ver en la Tabla 11 que, el compuesto polifenólico que más retiene (R) la membrana de UF 10 kDa es el hidroxitirosol y el compuesto que menos retiene la membrana es la oleuropeína. Si comparamos la retención de los polifenoles por la misma membrana con extracto acuoso (Tabla 7), observamos que hay una mayor retención de todos los compuestos con solvente acuoso que hidroalcohólico y esto se debe a la función del etanol sobre la membrana (hinchamiento). Como se comentaba en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, aunque haya mayor recuperación en el retenido que en el permeado de todas las muestras, se consigue que en el permeado del extracto hidroalcohólico se recuperen más porcentaje de polifenoles que los recuperados en las muestras acuosas (excepto el hidroxitirosol).

Según los datos recogidos en la Tabla 11, el polifenol que menos se recupera (Y) es el hidroxitirosol. Mientras que el resto de los polifenoles se recuperan más del 80%. Aquellos polifenoles que no han sido recuperados son difíciles de determinar y saber por qué ha habido esas pérdidas; puede que haya habido interacciones con la membrana o con otras moléculas del extracto como proteínas.

Tabla 11: Concentración (mg/L) de los polifenoles individuales de cada muestra de extracto hidroalcohólico.

| Parámetro | Polifenoles | | | | | |
|--------------|--------------|----------------|------------|----------------|------------------------|----------------|
| | Muestras | Hidroxitirosol | Rutina | Verbascósido | Luteolin-7-O-glucósido | Oleuropeína |
| C_A , mg/L | Alimentación | 83 \pm 25 | 23 \pm 5 | 29.6 \pm 0.5 | 325 \pm 17 | 2697 \pm 85 |
| C_R , mg/L | 10 kDa | 84 \pm 24 | 34 \pm 1 | 37.9 \pm 0.9 | 398 \pm 27 | 3393 \pm 165 |
| C_P , mg/L | | 20 \pm 5 | 9 \pm 2 | 13 \pm 4 | 182 \pm 52 | 1671 \pm 77 |
| R, % | | 75 | 62 | 57 | 44 | 40 |
| Y_R , % | | 51 | 74 | 22 | 61 | 60 |
| Y_P , % | | 13 | 19 | 64 | 28 | 30 |

*Leyenda: C_R : Concentración en retenido; C_P : Concentración en permeado; R: Retención de membrana; Y: Recuperación de polifenoles.

5. CONCLUSIONES

En este estudio se han obtenido extractos acuosos e hidroalcohólicos a partir de hojas de olivo. Los extractos hidroalcohólicos presentan un mayor contenido en compuestos polifenólicos y, por ello, tiene una mayor capacidad antioxidante. En el extracto acuoso el luteolin-7-O-glucósido es el compuesto fenólico mayoritario y la oleuropeína en el extracto hidroalcohólico. El azúcar mayoritario en ambos extractos es el manitol; pero ocurre lo contrario que en el caso de los polifenoles, hay mayor presencia de azúcares en el extracto acuoso ya que se solubilizan mejor en solvente agua que en etanol. También se puede ver como hay mayor concentración de sólidos solubles totales en el extracto hidroalcohólico que en el extracto acuoso, debiéndose esto al doble efecto de solvente agua-etanol en los procesos de extracción.

Se ha estudiado el fraccionamiento de los extractos acuosos mediante proceso de ultrafiltración y nanofiltración. Se ha observado que al disminuir el tamaño de poro se obtiene mayor retención de membrana y mayor concentración de compuestos en el retenido que en el permeado. Además, se encontró una correlación positiva entre la capacidad antioxidante de cada una de las fases con la concentración en polifenoles totales.

Se han realizado estudios preliminares para llevar a cabo la separación de los compuestos bioactivos obtenidos en el extracto hidroalcohólico, siendo necesario un acondicionamiento de la membrana previo a el fraccionamiento para que el flujo fuese estable. Se realizó una sola experiencia con la membrana de ultrafiltración de tamaño de poro 10 kDa a 7 bar, observando que los flujos del extracto acuoso y extracto hidroalcohólico casi no difieren cuando se estabilizan. Y se observa un mayor porcentaje de recuperación de polifenoles totales en el permeado del extracto hidroalcohólico en comparación con el extracto acuoso, ya que el etanol modifica la estructura de la membrana produciendo un hinchamiento de la misma favoreciendo el flujo de compuesto fenólicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Benzie, Iris F.F., y J. J. Strain. 1996. «The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay». *Analytical Biochemistry* 239 (1): 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- Cassano, Alfredo, Carmela Conidi, René Ruby-Figueroa, y Roberto Castro-Muñoz. 2018. «Nanofiltration and tight ultrafiltration membranes for the recovery of polyphenols from agro-food by-products». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020351>.
- Kashaninejad, M., M. T. Sanz, B. Blanco, S. Beltrán, y S. Mehdi Niknam. 2020. «Freeze dried extract from olive leaves: Valorisation, extraction kinetics and extract characterization». *Food and Bioprocess Technology* 124: 196-207. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.015>.
- Khemakhem, Ibtihel, Olfa Dridi Gargouri, Ali Dhouib, Mohamed Ali Ayadi, y Mohamed Bouaziz. 2017. «Oleuropein rich extract from olive leaves by combining microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration». *Separation and Purification Technology* 172: 310-17. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.08.003>.
- Oddo, Elisabetta, Filippo Saiano, Giuseppe Alonzo, y Enrico Bellini. 2002. «An investigation of the seasonal pattern of mannitol content in deciduous and evergreen species of the Oleaceae growing in northern Sicily». *Annals of Botany* 90 (2): 239-43. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf177>.
- Othman, N. Ben, D. Roblain, P. Thonart, y M. Hamdi. 2008. «Tunisian table olive phenolic compounds and their antioxidant capacity». *Journal of Food Science* 73 (4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00711.x>.
- Shukla, Rishi, y Munir Cheryan. 2002. «Performance of ultrafiltration membranes in ethanol-water solutions: Effect of membrane conditioning». *Journal of Membrane Science* 198 (1): 75-85. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(01\)00638-X](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(01)00638-X).
- Vázquez-Olivo, G. 2016. «Cuantificación y caracterización de compuestos fenólicos en la planta de Maíz (Zea mays L.)», 68.
- Vázquez Granada, Laura. 2016. «Procedimiento para la determinación de compuestos bioactivos en aceitunas mediante HPLC».
- Standard Biomass Analytical Methods provided by the National Renewable Energy Laboratory <https://www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html> Fecha de búsqueda: 14/04/2021
- Berenice Orozco Solorio, L. y Nava Diguero, P. Gobierno de México. Filtración de agua por membranas. <https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/filtracion-de-agua-por-membranas/> Fecha de búsqueda: 14/04/2021
- Pearson, D. y Pain L. Membrane Specialists. Membrane systems: process development, design, engineering, controls, fabrication, commissioning and optimization. <https://membranespecialists.com/> Fecha de búsqueda: 14/04/2021