



**UNIVERSIDAD
DE BURGOS**

Facultad de Ciencias

**EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS PARA
LA VALORIZACIÓN SOSTENIBLE DE LAS HOJAS DE
OLIVO**

Trabajo Fin de Grado

GRADO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Miriam Fukai Sáiz Fernández

Tutoras: Alba Ester Illera Gigante y Maria Teresa Sanz Diez

Curso académico 2025-2026

ANEXO DE SOSTENIBILIZACIÓN CURRICULAR ⁽¹⁾

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

CURSO: 2025-2026

Dña. Miriam Sáiz Fernández, estudiante matriculado en el Trabajo Fin de Grado del Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

REFLEXIÓN SOBRE LAS COMPETENCIAS DE SOSTENIBILIDAD DESARROLLADAS EN EL TRABAJO FIN DE GRADO (entre 600 y 800 palabras):

Este TFG constituye una muestra evidente del valor que tiene la investigación científica a la hora de afrontar los desafíos globales actuales y alinearse con los principios de sostenibilidad y los Objetivos de Desarrollo Sostenible, también conocidos como los ODS.

En primer lugar, el uso de las hojas de olivo como materia prima refleja una competencia clave, que es la gestión eficiente de recursos. Estas hojas son un residuo agrícola generado en grandes cantidades durante la poda del olivo. Su aprovechamiento evita prácticas de quema o acumulación, los cuales tienen un efecto perjudicial sobre el medio ambiente y contribuye indirectamente a la reducción y mitigación del cambio climático. Asimismo, las tecnologías limpias disminuyen el uso de disolventes orgánicos frente a los métodos convencionales de extracción. De esta forma se ponen en práctica los principios de la química verde que fomenta así procesos más seguros y sostenibles.

La principal relación de este proyecto es el **ODS 12**: La producción y consumo responsable. En lugar de emplear materias primas vírgenes, se ha trabajado con un subproducto abundante del sector olivero. Esto implica un cambio de enfoque hacia la valorización de subproductos, siendo consideradas de forma habitual, un residuo agrícola. Este planteamiento reduce la generación de desechos y fomenta una utilización más eficiente de los recursos, integrando así los principios de la economía circular. De esta forma, el proyecto no solo propone una técnica de extracción, sino una manera distinta de entender los procesos productivos. Asimismo, el uso de tecnologías limpias reduce la huella ambiental en la obtención de compuestos bioactivos.

Además, los compuestos fenólicos son compuestos que presentan propiedades antioxidantes y beneficios para la salud. Es por ello por lo que se relaciona con el **ODS 3**: Salud y bienestar. De esta forma, el desarrollo de este TFG se vincula con una mejor calidad de vida a través de su aplicación en alimentos funcionales o productos farmacéuticos. Por otra parte, el uso de agua como disolvente implica una menor exposición a disolventes potencialmente tóxicos como lo pueden ser algunos disolventes orgánicos.

Por otro lado, el trabajo también guarda relación con el **ODS 8**: Trabajo decente y crecimiento económico. La valorización de subproductos del olivar puede generar oportunidades económicas y laborales en contextos rurales donde el cultivo del olivo tiene un peso significativo.

El uso de tecnologías avanzadas de extracción y la obtención de compuestos de alto valor añadido posiciona este trabajo dentro del ámbito de la innovación tecnológica. Es por ello por lo que se puede alinear también con el **ODS 9**: Industria, innovación e infraestructura. La posibilidad de escalar estos procesos a nivel industrial abren nuevas vías para el desarrollo de industrias más sostenibles, especialmente en el sector agroalimentario.

También se puede relacionar con el **ODS 13**: Acción por el clima. Durante toda la fase experimental se ha tenido en cuenta factores como el consumo energético y el tipo de disolventes empleados. De tal forma que, el microondas y los ultrasonidos han permitido disminuir el consumo energético global del proceso, una disminución significativa del tiempo de extracción con respecto a los métodos tradicionales, lo que resulta en una reducción indirecta de emisiones de gases de efecto invernadero. La necesidad de encontrar alternativas más sostenibles y menos contaminantes refleja una preocupación por disminuir el impacto ecológico de los procesos químicos.

Cabe destacar que lo más relevante de este trabajo es que la sostenibilidad no se limita al resultado final, sino que está integrada en durante todo el proceso, incluyendo la selección de materia prima y la elección de tecnologías de extracción optimización de condiciones de trabajo. De esta forma, no solo se considera el rendimiento de extracción, sino también el impacto global del proceso.

Burgos, a 10 de junio de 2026

Fdo.: Miriam Sáiz Fernández

(1) Las memorias presentadas deberán contar con el Anexo de Sostenibilización Curricular. A tal efecto, **se incluirá tras el documento con el visto bueno de los tutores del trabajo**. (Reglamento interno de la Facultad de Ciencias para la gestión de la asignatura “Trabajo Fin de Grado” de la Facultad de Ciencias, aprobado en Junta de Facultad de 11 de febrero de 2022, modificado en Junta de Facultad el 7 de junio de 2023)

Índice

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJECTIVES.....	6
3. METODOLOGÍA.....	6
3.1 Reactivos y materiales.....	6
3.2 Materia prima.....	6
3.2.1 Preparación de la materia prima	7
3.3 Métodos de extracción de compuestos fenólicos.....	8
3.3.1 Extracción con disolventes orgánicos.	8
3.3.2. Extracción mediante agua subcrítica (subW).	9
3.3.3 Extracción Asistida por Microondas (MAE).	10
3.3.4. Extracción Asistida por Ultrasonidos (UAE).....	10
3.4 Análisis de los extractos	11
3.4.1. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC.	11
3.4.2. Evaluación del rendimiento de extracción y productividad	11
3.4.3. Medición del consumo energético de cada extracción	12
3.5 Análisis estadístico	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1 Extracción con disolventes orgánicos.	12
4.1.1 Efecto de la humedad de las hojas.	12
4.1.2 Efecto del tamaño de la materia prima.....	13
4.1.3 Efecto del disolvente.....	13
4.2 Extracción con agua subcrítica	14
4.3 Extracción asistida por microondas	15
4.4 Extracción asistida por ultrasonidos (UAE).	16
4.5 Comparación entre tecnologías de extracción	17
4.5.1 Efecto en el rendimiento de extracción	17
4.5.2 Efecto en la productividad de la extracción	19
4.5.3 Consumo energético a escala de laboratorio de los métodos de extracción.	21
5. CONCLUSIONES.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA.....	22

RESUMEN

El sector oleícola genera anualmente un gran volumen de subproductos, entre los que destacan las hojas de olivo (*Olea europaea* L.). Estas constituyen una fuente natural de compuestos fenólicos de alto valor añadido, como la oleuropeína.

En este trabajo se estudió la eficiencia de tres tecnologías de extracción limpias: agua subcrítica (subW), microondas (MAE) y ultrasonidos (UAE) para la extracción de compuestos fenólicos presentes en hojas de olivo. Los resultados de extracción se compararon con los de extracciones realizadas utilizando mezclas hidroalcohólicas. Para ello se evaluó el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos, la productividad, y el consumo energético frente al extracto obtenido.

Los resultados experimentales demostraron que la MAE fue la técnica más eficaz, logrando un rendimiento de 320 mg de compuestos fenólicos totales por 100 gramos de biomasa seca en solo 30 minutos, lo que supone un incremento del 13,1% respecto a la extracción convencional con metanol. Por su parte, la tecnología de extracción con agua subcrítica permitió también reducir el tiempo de proceso a 30 minutos, destacando por su bajo consumo energético, siendo un 95,4% menor que los métodos tradicionales a 24 horas.

Esta comparación determinó que el agua subcrítica destaca por su capacidad de hidrólisis, facilitando la obtención de derivados más bioactivos. Estos hallazgos validan la integración de procesos ecoeficientes para la valorización de residuos agrícolas dentro del marco de la economía circular.

PALABRAS CLAVE: Compuestos fenólicos, hojas de olivo, tecnologías limpias.

1. INTRODUCCIÓN

España se sitúa como el principal productor y exportador de aceite de oliva a nivel mundial. Esta actividad resulta fundamental en las regiones mediterráneas, donde tiene un gran peso económico. De hecho, la producción española supone aproximadamente el 45% del total global y cerca del 70% dentro de la Unión Europea. El cultivo del olivo ocupa en el país alrededor de 2,75 millones de hectáreas, y aproximadamente 2,55 millones se dedican a la producción de aceituna para almazara, lo que representa cerca del 93% del total. Dentro del territorio nacional, Andalucía destaca como la zona con mayor producción (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2025).

Sin embargo, en el proceso de producción de aceite de oliva, se genera una cantidad considerable de residuos y subproductos que plantean desafíos medioambientales importantes. Entre los principales residuos del olivar, destacan los restos de poda y hojas, y especialmente el alperujo, que es una mezcla pastosa de restos sólidos presentes en la aceituna (pulpa, piel, hueso) y agua residual (alpechín), que se obtiene del proceso de extracción del aceite (Matute & Torrecilla, 2012). Durante la recolección de aceituna, las hojas representan aproximadamente el 10% del peso total. Este alto porcentaje genera un gran volumen de residuos que se acumulan en cantidades significativas (Martín-García et al., 2018). Tradicionalmente, estos residuos vegetales han sido infrautilizados o eliminados mediante su quema o incorporación directa al suelo, prácticas que pueden implicar impactos ambientales negativos o un aprovechamiento limitado de su potencial. Asimismo, estos residuos son utilizados para la alimentación de animales rumiantes, el compostaje y la obtención de biocombustibles (Krzywonos et al., 2025).

Se ha estudiado la composición química de las hojas de olivo. Desde el punto de vista estructural, estas presentan una naturaleza predominantemente lignocelulósica, en la que destacan la celulosa, la hemicelulosa y la lignina como principales componentes de la pared celular. La celulosa (17,5 %) representa una de las fracciones principales de esta estructura, seguida de la lignina (10,8% insoluble y 6,2% soluble) y la hemicelulosa (12,5%)

(Kashaninejad et al., 2020). Estos componentes tienen un gran valor industrial: la glucosa de la celulosa y la xilosa de la hemicelulosa son azúcares fermentables útiles para producir etanol y xilitol, un edulcorante clave en la industria alimentaria (Lama-Muñoz et al., 2020).

Además, las hojas de olivo destacan por su alto contenido en compuestos bioactivos, lo que las convierte en una materia prima de gran interés para su valorización. Esta línea de investigación se enmarca en las estrategias de sostenibilidad que buscan reducir residuos, optimizar el uso de recursos agrícolas y fomentar modelos productivos más eficientes y respetuosos con el medioambiente. En consecuencia, el estudio y aprovechamiento de sus compuestos fenólicos adquiere una relevancia creciente tanto desde una perspectiva científica como industrial.

El creciente interés en los extractos vegetales se debe, principalmente, a que estos presentan una actividad antioxidante mayor que los compuestos fenólicos puros y, por otra parte, a la complejidad técnica que implica la purificación de dichos analitos. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios biosintetizados por las plantas a través de rutas metabólicas como respuesta a situaciones de estrés. Esta familia química posee una gran diversidad estructural, llegando a abarcar más de 8.000 compuestos distintos (Martín Gordo, 2018). Todas estas sustancias son derivadas del fenol, cuya estructura fundamental consiste en un anillo aromático (benceno) unido a uno o varios grupos hidroxilo.

Según su estructura se pueden clasificar en distintos grupos (Figura 1).

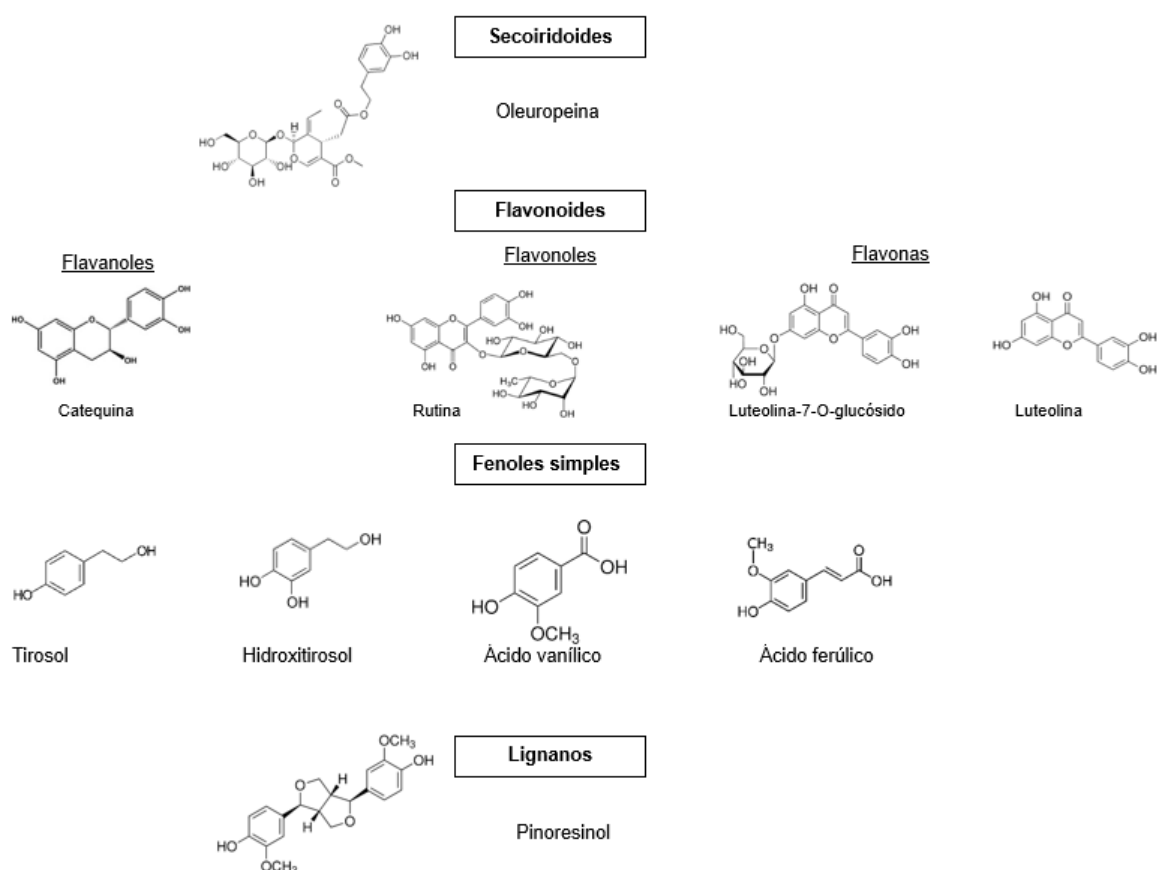


Figura 1. Clasificación y estructura de compuestos fenólicos presentes en hojas de olivo. (Martín-García et al., 2018)

La primera familia es la de los secoirridoides, la cual agrupa a metabolitos clave como la oleuropeína y el ligstrósido, junto a sus respectivas formas hidrolizadas. La segunda familia la constituyen los flavonoides, subdivididos internamente en tres clases: los flavanoles, representados por la catequina; los flavonoles, que incluyen la rutina; y las flavonas, cuyos

ejemplos principales son la luteolina-7-glucósido y la luteolina. Los compuestos fenólicos simples son un grupo con menor complejidad y concentración. Estos comprenden el tirosol, hidroxitirosol, vanilina, ácido vanílico y ácido ferúlico. Por otra parte, están los lignanos como el pinoresinol (Han et al., 2009).

La oleuropeína se posiciona como el metabolito secundario de mayor relevancia en el olivo, destacando especialmente por su elevada concentración en las hojas, seguida por los flavonoides. En la variedad de hoja *Coratina* hay una concentración de oleuropeína de 1960 mg/kg en el fruto, y, en las hojas, 6100 mg/kg, lo que supone una cantidad más de tres veces superior en las hojas que en el fruto (Hassen et al., 2015).

Sin embargo, los fenoles simples suelen estar presentes en menor cantidad debido a su degradación. Según algunos estudios, tras un mes a 20 °C, la oleuropeína experimenta una degradación del 30 %, incluso almacenada en condiciones de oscuridad, determinando así la importancia del tiempo y el almacenamiento de la materia prima (Krzywonos et al., 2025).

Químicamente, la oleuropeína se clasifica como un glucósido secoiridoide de naturaleza fenólica, cuya estructura molecular se observa en la Figura 2, y resulta de la unión del ácido elenólico mediante un enlace éster al hidroxitirosol y a través de un enlace glucosídico a una molécula de glucosa (Romero et al., 2020).

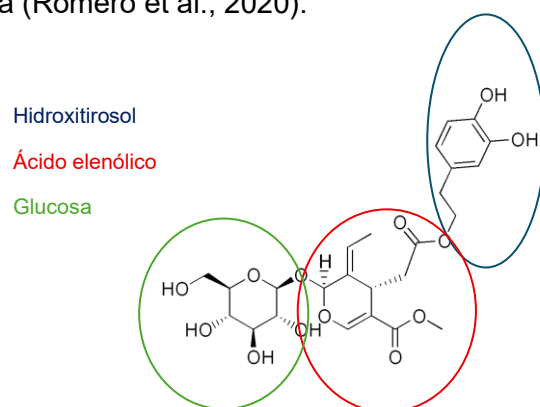


Figura 2. Estructura molecular de la oleuropeína (Herráez et al., 2014).

La β -glucosidasa es la enzima implicada en la hidrólisis de la oleuropeína, actuando de forma rápida en las etapas de trituración y malaxación del proceso de extracción del aceite de oliva (Hassen et al., 2015). Durante el proceso de maduración y calentamiento, la oleuropeína experimenta reacciones de hidrólisis que dan lugar a la formación de compuestos más simples, como el hidroxitirosol y la aglicona derivada de la oleuropeína, con una menor polaridad (Talhaoui et al., 2015). Es por ello que el hidroxitirosol y el tirosol se encuentran presentes en el aceite de oliva virgen. La concentración de compuestos fenólicos en un aceite de oliva oscila entre 50 y 800 mg/kg, mientras que en las aceitunas de mesa varía entre 200 y 1200 mg/kg. En el caso del aceite de oliva virgen, el hidroxitirosol representa el 90 % de su composición fenólica (Herráez et al., 2014).

Por otro lado, los flavonoides también están presentes en las hojas en grandes cantidades. Estos se pueden presentar de dos formas: como agliconas (incluyendo apigenina, diosmetina, luteolina y quercetina) y como glucósidos como la luteolina-7-O-rutinósido, la luteolina-7-O-glucósido, la luteolina-5-O-glucósido y la quercetina-7-O-rutinósido (Borjan et al., 2020).

La extracción de estos metabolitos facilita su aplicación en las industrias alimentaria, nutracéutica, farmacéutica y cosmética, respondiendo a la tendencia actual de sustituir aditivos sintéticos por alternativas naturales (Rodríguez et al., 2008). Estos compuestos mitigan el desarrollo de afecciones crónicas, degenerativas y cardiovasculares, disminuyendo además la incidencia de procesos neoplásicos (Saillema Ortiz et al., 2023).

La eficacia antioxidante radica directamente en su estructura química, la cual está determinada por el número y posición de los grupos hidroxilo presentes. De este modo, los ortodifenoles exhiben una elevada bioactividad frente a las limitadas capacidades de los monofenoles como el tirosol. En las hojas de olivo, la concentración de estos metabolitos secundarios varía de forma notable según factores genéticos y condiciones ambientales (Palmeri et al., 2022).

La eficiencia al extraer estos compuestos depende de cómo se prepare la muestra y del método de extracción utilizado. Además, factores como la luz, el aire y la temperatura provocan su degradación, aunque el calor acelera el proceso y acorta los tiempos de trabajo (Liazid et al., 2007). El incremento térmico eleva la energía cinética, expande las células vegetales y acelera la solubilización de compuestos fenólicos. Sin embargo, el calor excesivo degrada los compuestos termolábiles y libera enzimas oxidativas, exigiendo una evaluación térmica específica por matriz para no comprometer la calidad del extracto (Sailema Ortiz et al., 2023).

La maceración en agitación con disolventes orgánicos puros o mezclas hidroalcohólicas como metanol o etanol (Difonzo et al., 2017) se considera el método convencional; no obstante, este procedimiento presenta limitaciones significativas como la demanda de grandes volúmenes de disolvente, ciclos operativos prolongados y una selectividad reducida, lo que a su vez genera una elevada demanda energética impulsada por la agitación y el calor constantes (Martín-García et al., 2022). Al emplear mezclas hidroalcohólicas se optimiza la extracción de los analitos frente al uso de medios puros, ya que esta sinergia resulta ideal para compuestos con solubilidad mixta. En consecuencia, la proporción etanol:agua (75:25, v/v) supera en rendimiento a las extracciones realizadas únicamente con agua o con el disolvente puro (Sailema Ortiz et al., 2023).

Como alternativa, en este trabajo se propone el uso de tecnologías avanzadas de extracción, empleando agua en estado subcrítico (subW), extracción asistida por microondas (MAE, *Microwave-Assisted Extraction*) y extracción asistida por ultrasonidos (UAE). Los resultados obtenidos mediante estas técnicas ecoeficientes se compararán con los de la metodología convencional utilizando disolventes orgánicos como agente extractor de compuestos fenólicos.

En primer lugar, la extracción con agua subcrítica consiste en utilizar agua a temperaturas comprendidas entre 100 °C y 374 °C, es decir, por encima de su punto de ebullición convencional y por debajo de su temperatura crítica. Bajo estas condiciones, el agua se mantiene en estado líquido debido a la aplicación de una presión suficiente (Figura 3).

En este estado, las propiedades fisicoquímicas del agua cambian drásticamente. Por un lado, se produce la reducción de su constante dieléctrica y polaridad, asemejándose de este modo a ciertos disolventes orgánicos convencionales. Por otro lado, el incremento de su producto iónico (K_w) eleva la concentración de iones hidronio e hidróxido. Debido a ello, actúa como un disolvente eficaz para analitos de distinta polaridad (Díaz-de-Cerio et al., 2024).

Diversos artículos han demostrado la alta eficacia de esta técnica para la extracción de proteínas y de distintos metabolitos fenólicos, tales como las isoflavonas en matrices sólidas como la soja, antocianos en el hollejo de uva y aceites esenciales en el orégano (Cea Pavez, 2020; Díaz-de-Cerio et al., 2024). Sin embargo, al trabajar con estructuras termosensibles como los compuestos fenólicos, resulta indispensable optimizar las condiciones operacionales para lograr la máxima recuperación con la menor degradación térmica posible (Manousi et al., 2019).

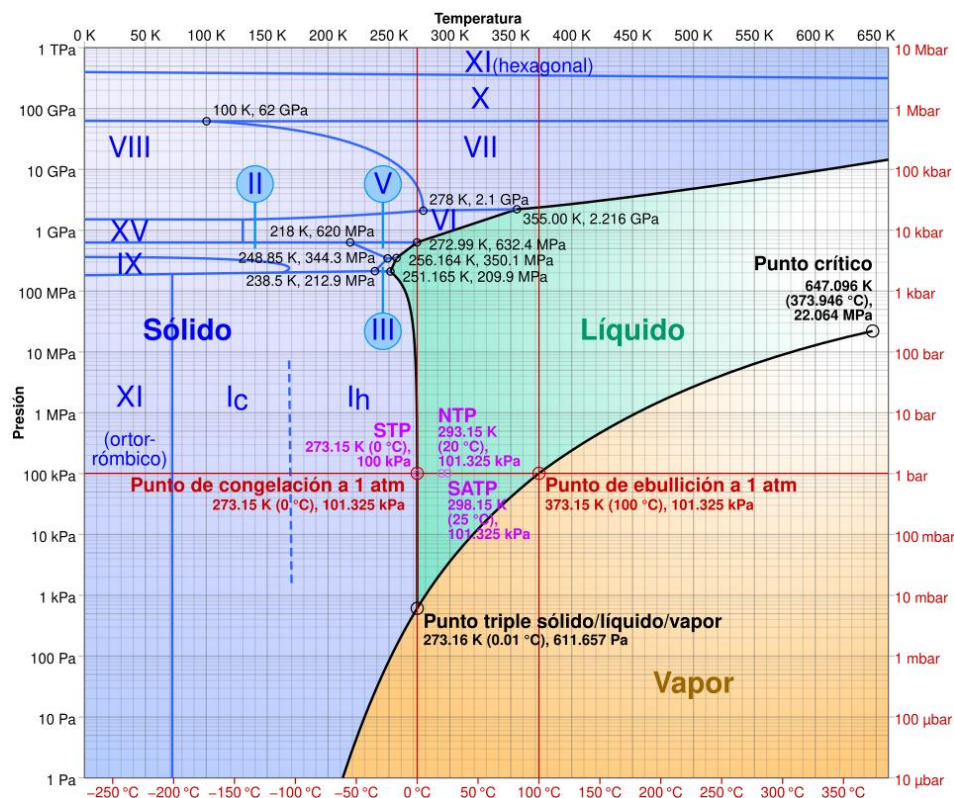


Figura 3. Diagrama de fases del agua. Adaptado de *Phase diagram of water*, por Cmglee, 2025, Wikipedia (wikipedia.org). CC BY-SA 3.0.

Por otra parte, la extracción asistida por microondas emplea radiación electromagnética para inducir calor mediante la interacción directa con moléculas polares e iones (Cao et al., 2025). La absorción de la radiación electromagnética induce una intensa agitación y fricción intermolecular, provocando el incremento térmico de la matriz. De esta forma, el calentamiento dieléctrico provoca la evaporación del agua intracelular y la presión resultante rompe las paredes celulares de la muestra vegetal, facilitando la rápida penetración del disolvente y optimizando la liberación de los compuestos fenólicos objetivo (Cassol et al., 2019). Asimismo, la polaridad del medio extractor constituye un factor determinante en el proceso, dado que las sustancias con una elevada constante dieléctrica como es el caso del agua ($\epsilon = 80$) poseen una mayor capacidad de absorción de la radiación microondas. Esta técnica se ha utilizado con éxito, por ejemplo, para la extracción de aceites esenciales en hojas de romero y menta, así como del ácido glicirrónico a partir de la raíz de regaliz (Proestos & Komaitis, 2008)

La tercera y última tecnología propuesta fue la extracción asistida por ultrasonidos. Se trata de una tecnología no térmica que emplea frecuencias de entre 20 y 100 kHz para promover el fenómeno de cavitación, el cual genera fuerzas de cizallamiento. La UAE destaca por su simplicidad, rapidez y operación a bajas temperaturas, consolidándose como una técnica óptima para la extracción de compuestos fenólicos. Las ondas de choque y la energía liberada durante el colapso violento de las burbujas de gas optimizan la transferencia de masa y provocan la rotura de la pared celular, permitiendo una liberación más eficaz de los compuestos fenólicos contenidos en la muestra (Martín-García et al., 2022). Esta tecnología se ha utilizado en semillas de apomo, frutos de limón persa y semillas de chía (Corona-Jiménez et al., 2016; Medina-Torres et al., 2019; Negrón-Díaz et al., 2023).

Frente a los métodos tradicionales, estas tecnologías emergentes destacan por su sostenibilidad y eficiencia, debido a que emplean exclusivamente agua como fase extractora, aprovechando el potencial de este fluido como el disolvente verde universal.

El presente trabajo se desarrolla en el marco de una colaboración europea vinculada al proyecto “OLinWaste” (Ref. 101181402). Dicho proyecto cuenta con la financiación de la Unión Europea y con la participación del grupo de investigación BIOIND de la Universidad de Burgos. Tiene como finalidad principal la creación de una biorrefinería integrada de cero emisiones, orientada a la valorización de los residuos generados en las almazaras para transformarlos en biofertilizantes, biopesticidas, bioplásticos, bioenergía y otros productos de alto valor añadido.

2. OBJECTIVES

The main objective is to assess and enhance the use of olive leaves as an agro-industrial by-product by extracting bioactive compounds—particularly phenolic compounds—through sustainable and eco-friendly techniques such as ultrasound, microwave-assisted methods, and subcritical water extraction. The following specific objectives were additionally established to accomplish this main goal:

1. To evaluate the phenolic compounds extraction kinetics using aqueous mixtures of methanol and ethanol as a conventional baseline for comparison.
2. To determine the phenolic compounds extraction kinetics using ultrasounds, microwave, and subcritical water extractions.
3. To compare the efficiency of the different extraction techniques by assessing and contrasting their phenolic profile, extraction yield, productivity and their energy consumption.

3. METODOLOGÍA

3.1 Reactivos y materiales

Para las extracciones convencionales con mezclas hidroalcohólicas se emplearon metanol (VWR Chemicals, 99,8 %) y etanol absoluto (VWR Chemicals, 100 %).

Los patrones estándar de compuestos fenólicos, incluidos el hidroxitirosol, tirosol, catequina, ácido vanílico, esculetina, vanilina, vicianina II, ácido ferúlico, rutina, luteolina-7-glucósido, oleuropeína, luteolina y pinosresinol, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los filtros procedían de Scharlau.

Para las fases móviles se utilizaron acetato amónico (VWR Chemicals, 99,2 %), ácido acético glacial (Panreac, 100 %) y acetonitrilo (Sigma-Aldrich, 99,8 %). El agua ultrapura Tipo I Milli-Q se obtuvo a través de un equipo de purificación Wasserlab (modelo Ecomatic 3L DP50L) para procesar agua destilada Tipo II.

3.2 Materia prima

Las hojas de olivo utilizadas procedían de Italia (cosecha de junio de 2025) y pertenecían a la variedad *Coratina*. Las muestras se conservaron en congelación a -18 °C hasta su posterior procesamiento.

El contenido de humedad de la biomasa se determinó por triplicado antes de cada ensayo empleando un analizador de humedad de infrarrojos (Ohaus, modelo MB 120), obteniéndose un valor medio del 34 ± 2 %.

Esta materia prima fue caracterizada previamente en el Área de Ingeniería Química. En la Tabla 1 se detalla la composición de la matriz lignocelulósica, en la cual destacan la celulosa, la hemicelulosa y la lignina como los principales componentes de la pared celular. La fracción de celulosa está representada analíticamente por el contenido de glucanos, dado que este polisacárido consiste estructuralmente en cadenas lineales de glucosa. Por otro lado, la hemicelulosa está constituida por la suma de los pentosanos (xilanos y arabinanos); a esta

última fracción se asocian también los grupos acetilo, característicos de la estructura ramificada de la hemicelulosa en esta biomasa vegetal (Rodríguez-Viveros et al., 2023). Junto a estos polímeros estructurales, están presentes otras fracciones químicas de interés, tales como compuestos nitrogenados y lípidos en proporciones similares (alrededor del 8 %).

Tabla 1. Caracterización composicional de las hojas de olivo.

Compuestos	Composición (% base seca)
Extractivos (H ₂ O)	25,9 ± 0,6
Extractivos (EtOH)	10 ± 1
Lignina insoluble	24 ± 1
Lignina soluble	3,06 ± 0,01
Glucanos	10,7 ± 0,3
Xilanos	4,6 ± 0,2
Arabinanos	2,7 ± 0,2
Grupos acetilo	1,6 ± 0,3
Proteínas	7,6 ± 0,1
Lípidos	8,0 ± 0,3
Fibra	21,0 ± 0,1
Cenizas	1,0 ± 0,4

Destacaron los extractivos solubles en agua ($25,9 \pm 0,6$ %), seguidos por los extractivos en etanol (10 ± 1 %). Estos resultados indican la presencia importante de compuestos hidrosolubles y de metabolitos potencialmente recuperables mediante procesos de extracción. El contenido total de lignina fue elevado, con una fracción de lignina insoluble de 24 ± 1 % y lignina soluble de $3,06 \pm 0,01$ %, lo que evidencia una estructura lignocelulósica relativamente recalcitrante.

Finalmente, el bajo contenido de cenizas ($1,0 \pm 0,4$ %) indica una reducida presencia de material inorgánico, mientras que el contenido de acetilo fue de $1,6 \pm 0,3$ %, asociado principalmente a hemicelulosas acetiladas. En conjunto, estos resultados muestran que la biomasa posee una composición adecuada para procesos de valorización integral, especialmente orientados a la recuperación de compuestos fenólicos y fracciones lignocelulósicas.

3.2.1 Preparación de la materia prima

Se realizaron diferentes extracciones a partir de las hojas de olivo tanto frescas como secas, ya que en bibliografía se ha descrito que los procesos de secado pueden favorecer la extracción de compuestos fenólicos de las hojas de olivo (Kashaninejad et al., 2020). Para el tratamiento de secado, las muestras se dispusieron en una estufa de convección (Thermo Scientific) a una temperatura controlada de 105 °C durante 4 horas.

También se realizaron diferentes extracciones para estudiar el efecto del tamaño de la partícula. La materia prima se sometió a una etapa de molienda utilizando un molino analítico (IKA, modelo A11 basic mill, Brasil).

El conjunto de las muestras procesadas bajo las diferentes condiciones experimentales se presenta visualmente en la Figura 4.



Figura 4. (a) hojas húmedas trituradas (b) hojas húmedas no trituradas (c) hojas secas no trituradas.

3.3 Métodos de extracción de compuestos fenólicos.

Para los ensayos experimentales, se llevaron a cabo extracciones sólido-líquido manteniendo una relación fija del 5 % de hojas en base seca (p/v). En la Tabla 2 se detalla el esquema de las distintas experiencias analíticas desarrolladas en este estudio.

Los términos utilizados para codificar las muestras se corresponden con MeOH: metanol-agua, EtOH: etanol-agua, H: húmedo, S: seco, T: triturado, NT: no triturado y subW: agua subcrítica.

Tabla 2. Esquema de los métodos empleados y condiciones para la extracción de compuestos fenólicos de hojas de olivo.

	Método de Extracción	Estado de la Hoja	Disolvente Empleado	Tiempo	Temperatura
I. Extracción Convencional	Mezclas hidroalcohólicas	No triturada / Húmeda	Etanol 80%	24 h	50 °C
	Mezclas hidroalcohólicas	No triturada / Seca	Etanol 80%	24 h	50 °C
	Mezclas hidroalcohólicas	Triturada / Húmeda	Etanol 80%	24 h	50 °C
	Mezclas hidroalcohólicas	Triturada / Húmeda	Metanol 80%	24 h	50 °C
II. Tecnologías limpias	Extracción con agua presión	Triturada / Húmeda	Agua	60 min	130 °C
	Microondas	Triturada / Húmeda	Agua	60 min	130 °C
	Ultrasonidos	Triturada / Húmeda]	Agua	60 min	52 °C

3.3.1 Extracción con disolventes orgánicos.

Las extracciones convencionales se llevaron a cabo utilizando mezclas de metanol:agua y etanol:agua en una proporción 80:20 (v/v), empleando un reactor de 100 mL a una temperatura constante de 50 °C y con la relación sólido-líquido establecida del 5 % (p/v). La cinética del proceso se monitorizó mediante la toma de alícuotas a intervalos de tiempo definidos: 30 minutos, 1, 5, 7, 10, 15, 20 y 24 horas.

Las variables estudiadas en este estudio fueron (1) secado de la materia prima (2) tamaño de la materia prima y (3) el tipo de solvente empleado (metanol o etanol al 80%).

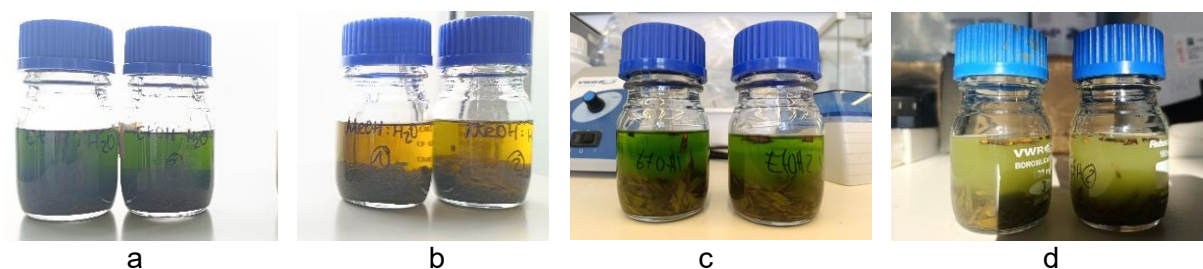


Figura 5. Fotografía de las muestras vegetales tras los diferentes tratamientos de extracción: (a) etanol al 80 % en muestras húmedas trituradas; (b) metanol al 80 % en muestras húmedas trituradas; (c) etanol al 80 % en muestras húmedas no trituradas; y (d) etanol al 80 % en muestras secas no trituradas.

3.3.2. Extracción mediante agua subcrítica (subW).

Se realizó una extracción con agua subcrítica en un reactor de 0,5 L de capacidad utilizando como método de calentamiento una camisa de cerámica de 95 mm de diámetro y 160 mm de altura. Además, este equipo tiene incorporado un sistema que permite la monitorización y registro de la temperatura, y un manómetro con válvula de purga que mantiene la presión interna estable a lo largo de todo el proceso.

En primer lugar, se introdujeron en el reactor las hojas húmedas trituradas en una relación del 5 % (p/v) y el agua (250 mL). La mezcla se calentó hasta 130 °C y la presión se ajustó a 5 MPa utilizando nitrógeno como agente de presurización, ya que es un gas inerte que no interacciona con el medio de reacción. Se tomaron alícuotas en el momento en el que se alcanzó la temperatura de trabajo, y posteriormente a los 15, 30, 45 y 60 minutos. Tras 60 minutos a dicha temperatura, se dejó enfriar el reactor hasta una temperatura de 90 °C y se procedió a despresurizarlo para recuperar el hidrolizado final.

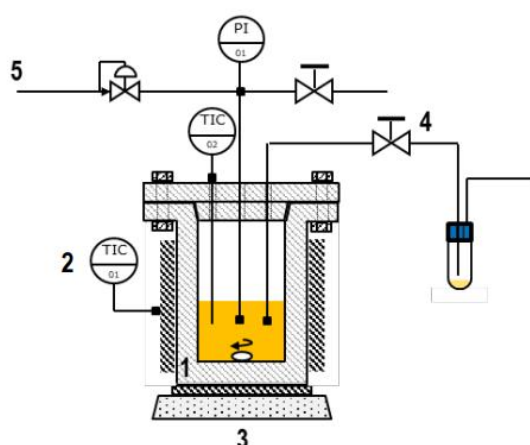


Figura 6. Esquema y foto del reactor para la extracción PLE: (1) Reactor (2) Camisa (3) Placa de agitación (4) Toma de muestra (5) Entrada de gas.

Se seleccionó la temperatura de operación de 130 °C con base en resultados previos en el grupo de investigación, ya que se observó que a temperaturas inferiores disminuye la solubilidad de los compuestos de interés, debido a que se intensifican las interacciones entre el analito y la matriz, lo que da lugar a una extracción más lenta y menos completa.

3.3.3 Extracción Asistida por Microondas (MAE).

La extracción asistida por microondas se llevó a cabo en un equipo flexiWAVE (Milestone SRL) utilizando reactores resistentes a altas presiones. Para cada ensayo, se emplearon 50 mL de agua como fase extractora, manteniendo una relación del 5 % en base seca (p/v) a partir de las hojas húmedas trituradas. Durante el tratamiento, la presión interna dentro del reactor se correspondió de forma automática con la presión de saturación del agua a la temperatura de operación.

Tomando como referencia las condiciones fijadas previamente en el sistema de agua subcrítica, las extracciones se realizaron a 130 °C. Con el fin de evaluar el perfil cinético del proceso, se desarrollaron cinco tratamientos independientes con tiempos de residencia de 5, 15, 30, 45 y 60 min, aplicando en todos los casos una rampa de calentamiento previa de 5 minutos para alcanzar la temperatura operativa de trabajo.

3.3.4. Extracción Asistida por Ultrasonidos (UAE).

Por último, la extracción de los compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante un sistema de ultrasonidos de alta intensidad empleando un procesador Vibra-Cell™ (Sonics & Materials, Inc., EE. UU.) de 750 W equipado con una sonda de titanio de 13 mm de diámetro. Las condiciones operacionales de trabajo se fijaron a una frecuencia constante de 20 kHz y una amplitud del 100 %.

Para cada ensayo, se introdujeron 125 mL de una suspensión acuosa de hojas de olivo húmedas y trituradas al 5 % (p/v en base seca) en un reactor encamisado de 200 mL de capacidad y un diámetro interno de 4,8 cm. La temperatura media del proceso se mantuvo controlada a 52 °C mediante la acción de una camisa de refrigeración conectada a un baño termostático calibrado a 30 °C. La sonda ultrasónica se posicionó sumergida a una profundidad fija de 2 cm respecto al fondo del reactor. El tratamiento se aplicó de forma pulsada —ciclos de 5 s de actividad y 5 s de latencia— durante un tiempo total de proceso de 60 min. Con el fin de evaluar el perfil cinético, se extrajeron alícuotas a intervalos de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos.



(a)



(b)

Figura 7. Fotografía los equipos de extracción utilizados: (a) microondas (b) ultrasonidos.

3.4 Análisis de los extractos

Para separar las fases líquidas y sólidas de los extractos, las muestras se filtraron a vacío y posteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos a 4 °C y 5000 rpm. El estudio de la concentración de compuestos fenólicos se realizó en la fase líquida. El residuo sólido se secó a 105 °C y se pesó posteriormente. Los extractos se conservaron a temperatura de refrigeración y protegidos de la luz para posteriores análisis.

3.4.1. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC.

Para el análisis en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), se realizó una filtración de los extractos mediante filtros de jeringa de polipropileno hidrofóbico de 13 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,22 µm. Se utilizó un equipo HPLC equipado con una bomba cuaternaria y un detector de arreglo de diodos (DAD) (Agilent 1260 Infinity II/HP Series 1100). La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una precolumna (Phenomenex® AJ0-9000, 2,1- 4,6 mm) conectada a una columna cromatográfica Kinetex® Biphenyl (4,6 mm × 250 mm, 5 µm tamaño de partícula) con una porosidad de 100 Å. El detector DAD permitió la monitorización y cuantificación de los compuestos fenólicos y su detección a diferentes longitudes de onda (280, 330, 350 y 370 nm).

Se empleó la combinación de dos fases móviles. Por un lado, la fase móvil A consistió en una solución acuosa de acetato de amonio 5 mM acidificada con un 1 % (v/v) de ácido acético; por otro lado, la fase móvil B estuvo constituida por la misma mezcla de reactivos preparada en acetonitrilo. La elución se realizó utilizando un gradiente lineal entre ambas fases, el cual comenzó con una proporción alta de fase acuosa para favorecer la retención inicial de los compuestos fenólicos en la columna. A lo largo del análisis, se incrementó progresivamente la proporción de fase orgánica, lo que facilitó la elución de los compuestos con mayor carácter hidrofóbico.

El programa comenzó con un 2 % de fase orgánica (B) durante los primeros 7 minutos. A partir de ese punto, la proporción de B se incrementó progresivamente hasta alcanzar el 8 % entre los minutos 7 y 20, y posteriormente se aumentó hasta el 10 % entre los minutos 20 y 35. A continuación, el gradiente continuó elevándose hasta el 18 % entre los minutos 35 y 55, seguido de un incremento más pronunciado hasta el 38 % entre los minutos 55 y 65. En la fase final del análisis, la composición alcanzó el 65 % entre los minutos 65 y 75 y el 80 % entre los minutos 75 y 80. Finalmente, se restablecieron las condiciones iniciales (2 % de B) para permitir la reequilibración de la columna durante 10 minutos antes de la siguiente inyección. La separación cromatográfica de los distintos compuestos se realizó inyectando volúmenes de 20 y 40 µL por muestra, manteniendo una temperatura de la columna de 25 °C y un caudal de fase móvil de 0,8 mL/min. Los compuestos para los que se disponía de estándares se identificaron primero comparando los tiempos de retención y los espectros UV/vis de los picos correspondientes, seleccionando los 280 nm como la longitud de onda principal de registro. De esta manera, se identificaron un total de 13 compuestos fenólicos. Los resultados se expresaron como la cantidad de compuestos fenólicos por 100 gramos de biomasa seca.

3.4.2. Evaluación del rendimiento de extracción y productividad

El rendimiento de extracción de cada técnica utilizada se ha calculado de acuerdo con la Ecuación 1:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{mg compuestos fenólicos extraídos}}{100 \text{ g b.s.}} \quad [\text{Ec. 1}]$$

Por otra parte, se ha calculado la productividad del proceso de las distintas extracciones realizadas mediante la Ecuación 2:

$$\text{Productividad} = \frac{\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg compuestos fenólicos}}{100 \text{ g b.s.}} \right)}{\text{Tiempo (min)}} \quad [\text{Ec. 2}]$$

3.4.3. Medición del consumo energético de cada extracción

El consumo energético se registró mediante un medidor digital RS PRO (modelo PM01, 230 Vac, 16 A). Este parámetro constituye un indicador crítico de sostenibilidad, donde una menor demanda energética por gramo de fenol extraído refleja una mayor eficiencia térmica y ambiental del proceso.

En cada ensayo de extracción de compuestos fenólicos, se registró el consumo eléctrico acumulado en kWh. Esta medición no solo permite cuantificar el gasto operativo directo, sino que sirve para determinar el requerimiento energético por unidad de masa de analitos recuperados, calculado de acuerdo con la Ecuación 3:

$$\text{Consumo energético específico} = \frac{\text{Consumo (kWh)}}{\text{mg compuesto fenólico extraído}} \quad [\text{Ec. 3}]$$

3.5 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Para la identificación de grupos con diferencias significativas, se aplicó el test LSD, empleando en todos los casos un nivel de confianza del 95 % (p-valor < 0,05). El procesamiento de los datos se realizó mediante el software Statgraphics Centurion XIX.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción con disolventes orgánicos.

4.1.1 Efecto de la humedad de las hojas.

En primer lugar, se estudió el efecto del secado de la materia prima empleando como disolvente una mezcla hidroetanólica al 80 % (v/v). En la Figura 8 se observa que la extracción sobre las hojas enteras en estado húmedo (EtOH NT-H) alcanzó una media de 235 ± 9 mg / 100 g b.s., valor significativamente superior a los 219 ± 1 mg / 100 g b.s. obtenidos con la hoja seca (EtOH NT-S), lo que supone un incremento del 7,3 %.

Los compuestos mayoritarios en ambos extractos fueron la luteolina-7-O-glucósido (que constituyó entre el 38 y el 42 % de la fracción fenólica total), la luteolina (16 %) y la oleuropeína (16-20 %). Por otra parte, los compuestos minoritarios identificados fueron la rutina y la vanilina.

La diferencia principal se observó en la oleuropeína. El extracto de hojas secas alcanzó una concentración significativamente mayor, de $44,7 \pm 0,5$ mg / 100 g b.s., lo que representa un incremento del 19,8 % frente al obtenido con hojas húmedas ($37,3 \pm 3,0$ mg / 100 g b.s.). Esta tendencia coincide con los hallazgos de Ghomari et al. (2019), quienes demostraron que el secado previo de las hojas optimiza el rendimiento extractivo debido a que la deshidratación inactiva las enzimas hidrolíticas. De este modo, se evita el deterioro de los metabolitos de interés y se logra preservar la oleuropeína de forma más eficiente.

Por otra parte, se logró extraer en EtOH NT-H un 19,4 % más de luteolina-7-O-glucósido (Lut-7) y un 27,7 % más de luteolina en comparación con EtOH NT-S. Dado que la Lut-7 es uno de los compuestos fenólicos mayoritarios en la materia prima, su comportamiento podría justificar que no se haya observado un incremento del contenido fenólico total en el extracto tras someter la biomasa a un proceso de secado.

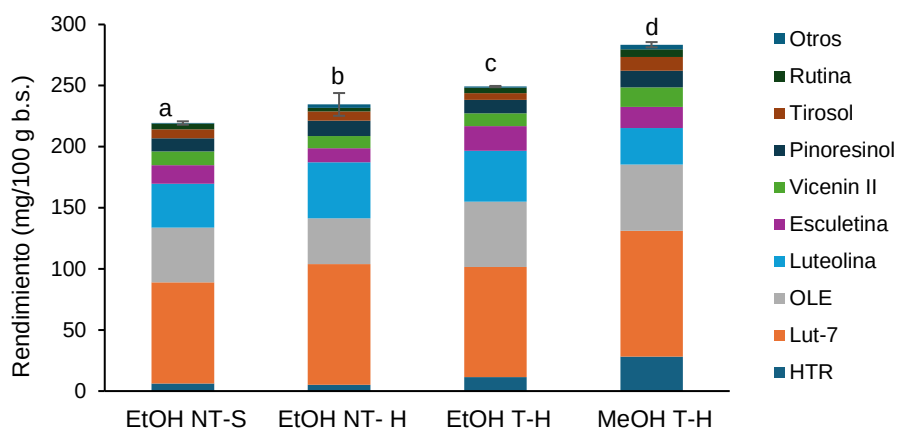


Figura 8. Perfil fenólico a $t = 24$ h tras distintas extracciones con mezclas hidroalcohólicas. Las barras con letras distintas denotan que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al rendimiento total.

4.1.2 Efecto del tamaño de la materia prima.

La reducción del tamaño de partícula logró una concentración media mayor de compuestos fenólicos totales (249 ± 1 mg / 100 g b.s.) en comparación con la biomasa sin triturar (235 ± 9 mg / 100 g b.s.), lo que representa un incremento del 6,0 % (Figura 8). Este resultado se debe a que la molienda de las hojas consigue romper las estructuras del tejido vegetal, lo que aumenta la superficie de contacto con el disolvente y, por lo tanto, favorece la transferencia de masa. De este modo, se garantiza una mayor eficiencia en la extracción y una mayor estabilidad de los compuestos fenólicos.

El compuesto mayoritario en EtOH T-H fue Lut-7 ($90,1 \pm 0,8$ mg / 100 g b.s.), seguido de OLE ($53,5 \pm 0,2$ mg / 100 g b.s.) y luteolina ($41,7 \pm 0,6$ mg / 100 g b.s.). La molienda incrementó notablemente el rendimiento de OLE en un 41,9 % respecto al tratamiento sin triturar (EtOH NT-H); no obstante, este último optimizó la recuperación de Lut-7 y luteolina en un 9,7 % y 10,1 %, respectivamente.

El mayor rendimiento global de fenólicos totales en EtOH T-H se atribuye a un efecto acumulativo en el perfil cromatográfico. Aunque la trituración disminuyó la concentración de los dos flavonoides principales, potenció la liberación de OLE y de la totalidad de las fracciones minoritarias (HTR, esculetina y pinoresinol.).

4.1.3 Efecto del disolvente.

Se determinó que el empleo de biomasa húmeda y triturada optimizó la extracción de los compuestos fenólicos. Por lo tanto, estos parámetros se seleccionaron como factores fijos para evaluar, en la siguiente etapa, el efecto de diferentes sistemas de disolventes hidroalcohólicos sobre el rendimiento de la extracción.

En la Figura 8 se puede observar que el rendimiento máximo se alcanzó con una mezcla hidrometanólica (MeOH T-H; 283 ± 2 mg / 100 g b.s.), en comparación con el extracto hidroetanólico (EtOH T-H), el cual obtuvo un menor rendimiento (249 ± 1 mg / 100 g b.s.).

La diferencia de extracción del metanol frente al etanol bajo las mismas condiciones experimentales se fundamenta en la polaridad y el tamaño molecular del disolvente. El metanol es más polar que el etanol, posee un radio molecular menor, una constante dieléctrica más elevada (32,6 frente a 24,5 del etanol) y una menor viscosidad dinámica (0,587 mPa·s frente a 1,20 mPa·s del etanol); lo que incrementa su capacidad de penetración en la matriz vegetal y mejora la solubilidad de los compuestos fenólicos de polaridad media-alta, demostrando una mayor afinidad por compuestos de bajo peso molecular (Do et al., 2014). Debido a su eficacia, el metanol es considerado idóneo para obtener extractos ricos en flavonoides, derivados hidroxicinámicos, flavonas y flavonoles presentes en frutas, legumbres,

semillas de uva y orujo con una notable capacidad antioxidante. No obstante, cabe destacar que la diferencia con respecto al extracto de etanol bajo el mismo tratamiento es relativamente estrecha. Por ello, desde una perspectiva de sostenibilidad y química verde, el etanol se postula como una alternativa viable y respetuosa con el medio ambiente, permitiendo sustituir al metanol y reducir la toxicidad del proceso global (Abaza, 2011).

4.2 Extracción con agua subcrítica

En la Figura 9 se observa la cinética de extracción de los compuestos fenólicos durante el tratamiento con agua subcrítica.

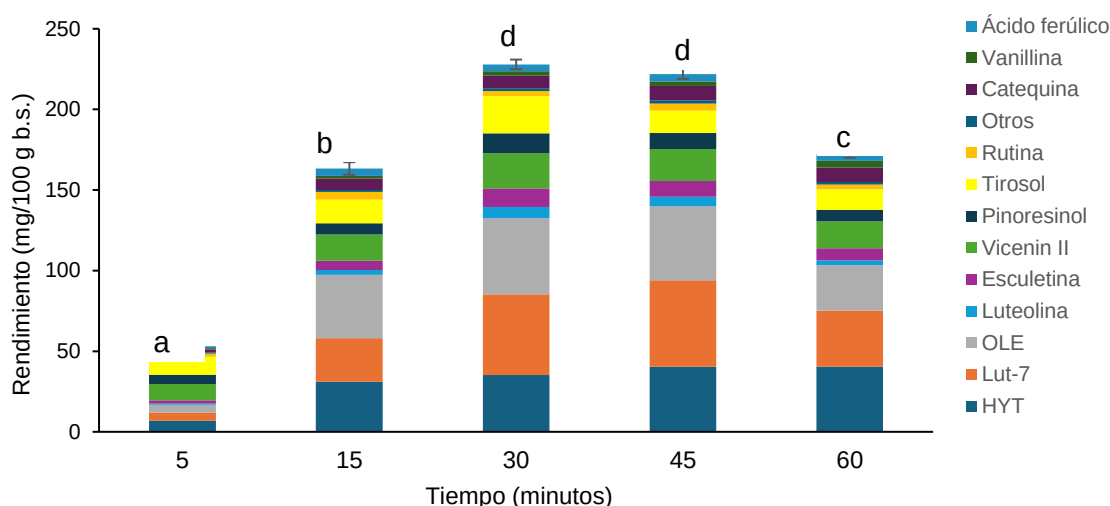


Figura 9. Cinética de extracción de los distintos compuestos fenólicos durante 60 minutos mediante extracción con subW a 130°C con una relación de 5% (p/v). Las barras con letras distintas denotan que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al rendimiento total.

La cinética mostró un incremento progresivo en la concentración total de compuestos fenólicos entre 5 y 30 min de tratamiento, alcanzando valores máximos de 228 ± 3 mg/100 g b.s. a los 30 minutos. Posteriormente, entre 30 y 45 min, la concentración permaneció relativamente estable, mientras que tras 60 min se observó una disminución del rendimiento total de extracción.

Entre los compuestos identificados, los mayoritarios fueron el HTR, OLE y Lut-7. La OLE y Lut-7 representaron la fracción predominante durante prácticamente todo el proceso de extracción, alcanzando sus mayores concentraciones entre los 30 y 45 minutos ($47 \pm 0,4$ mg/100 g b.s. y $50 \pm 0,4$ mg/100 g b.s., respectivamente). Este comportamiento indica que la extracción con agua subcrítica favorece la liberación eficiente de la OLE desde la matriz vegetal. Sin embargo, a tiempos prolongados (60 minutos) se observó una disminución de su concentración, posiblemente asociada a hidrólisis o degradación térmica.

El HTR también mostró un incremento notable conforme avanzó el tiempo de extracción, llegando a un punto de estabilización (40 ± 2 mg/100 g b.s.). Su presencia puede estar relacionada tanto con su extracción directa como con la degradación parcial de la oleuropeína durante el tratamiento (Figura 10) (Talhaoui et al., 2015).

Debido a su elevada capacidad antioxidante, el HTR constituye uno de los principales metabolitos bioactivos recuperados mediante subW. Los compuestos minoritarios correspondieron principalmente a la vanilina y al ácido vanílico y a otros fenoles presentes en concentraciones relativamente bajas durante todo el ensayo. Aunque su contribución individual fue menor, en conjunto aportan valor funcional y antioxidante al extracto.

Considerando la concentración total de polifenoles y el comportamiento cinético observado, se determinó que el tiempo óptimo de extracción mediante agua subcrítica es de 30 min. En

este punto se maximiza el rendimiento global de los analitos de interés sin evidenciar pérdidas significativas por degradación térmica o hidrolítica.

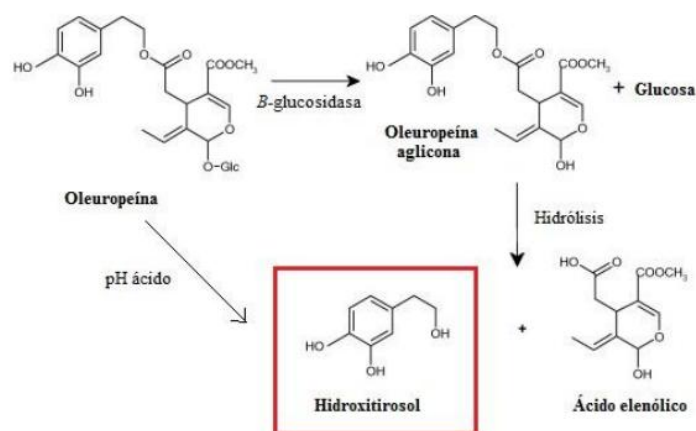


Figura 10. Hidrólisis de la oleuropeína. (Higuera Campo, 2017).

4.3 Extracción asistida por microondas

En la Figura 11 se observa la cinética de extracción de los compuestos fenólicos durante el tratamiento con MAE.

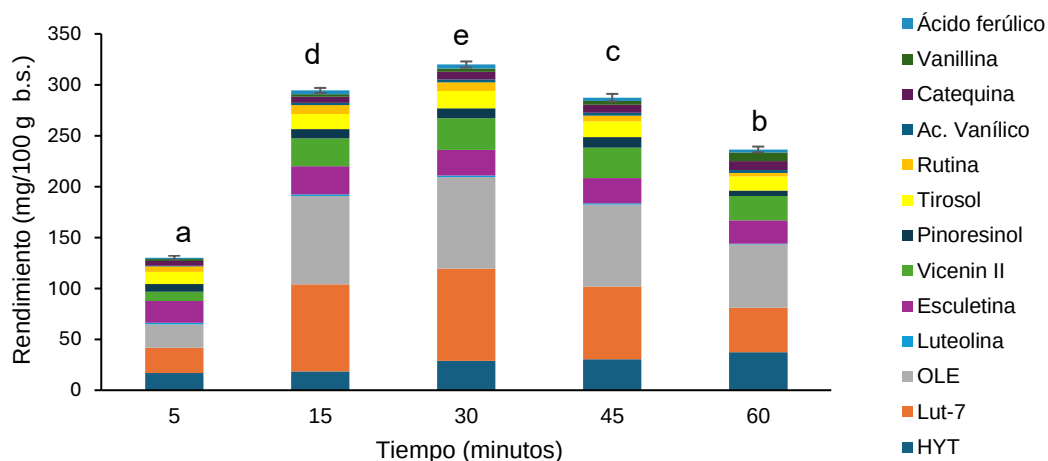


Figura 11. Cinética de extracción de los distintos compuestos fenólicos durante 60 minutos a 130°C con una relación de 5% (p/v) mediante extracción asistida por microondas. Las barras con letras distintas denotan que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al rendimiento total.

La concentración total de compuestos alcanzó su punto máximo a los 30 minutos de tratamiento (320 ± 3 mg/100 g b.s.). A partir de este punto, se observó una disminución significativa en el rendimiento, llegando a reducirse en un 26,3 %. El perfil de compuestos individuales fue similar al obtenido mediante SubW, siendo la Lut-7, la OLE y el HTR los componentes mayoritarios.

La oleuropeína es el compuesto principal que explica la caída en el rendimiento a tiempos prolongados. Dicho polifenol alcanza su pico máximo entre los 15 y 30 minutos y posteriormente su fracción se reduce. Por el contrario, la luteolina y el ácido vanílico han sido los compuestos principales minoritarios, representando entre el 0,3 % y el 1 % respectivamente.

Mediante los datos obtenidos, se determinó que el tiempo óptimo de extracción mediante MAE es de 30 minutos. Extender el proceso más allá de este límite no solo incrementa el gasto energético, sino que disminuye el rendimiento de compuestos fenólicos extraídos.

La MAE ha llamado la atención en estudios principalmente por su menor consumo de solvente, su poco tiempo de operación y su alta reproducibilidad. Al generarse el calor desde el núcleo de la muestra hacia afuera, se facilita la entrada del solvente y se potencia la liberación de los compuestos fenólicos (Álvarez-Romero et al., 2023).

Según Liazid et al. (2007), los resultados obtenidos en su estudio demuestran que las condiciones óptimas para la MAE de estos compuestos, sin riesgo de descomposición térmica, se sitúan en un límite de 100 °C y 20 min de tratamiento. Otros autores destacan que se necesitan temperaturas de altas (110-150 °C) para poder lograr una extracción eficiente (Borjan et al., 2020).

4.4 Extracción asistida por ultrasonidos (UAE).

En la Figura 12 se observan los rendimientos de extracción de compuestos fenólicos mediante ultrasonidos a diferentes tiempos. Se determinó que el tiempo óptimo es de 45 minutos, momento en el que se alcanza el rendimiento máximo absoluto de compuestos fenólicos totales (102 ± 2 mg/100 g b.s.). Tras superar este punto óptimo, se aprecia un ligero descenso en la concentración a los 60 minutos, lo que sugiere procesos de degradación o saturación en el medio extractivo por un tratamiento acústico prolongado.

La OLE fue el compuesto más abundante y representó el 31,0 % de los compuestos fenólicos totales. Este metabolito aumentó su concentración hasta los 45 minutos y, posteriormente, decreció a los 60 minutos. Por su parte, la vicenina II fue el segundo componente mayoritario, el cual representó el 25,5 % del total de polifenoles e incrementó igualmente su concentración hasta alcanzar su máximo absoluto a los 45 minutos. Finalmente, el HTR constituyó el tercer componente mayoritario del extracto, destacando por una rápida disolución inicial y alcanzando niveles significativos y constantes a partir de los 15 min, los cuales se mantuvieron estables en torno al 9,4 % hasta el final del ensayo.

Por el contrario, los componentes minoritarios (tales como el ácido ferúlico y el ácido vanílico) mantuvieron concentraciones bajas y estables, aportando una fracción minoritaria pero constante a la suma total del extracto, independientemente del tiempo de exposición a los ultrasonidos.

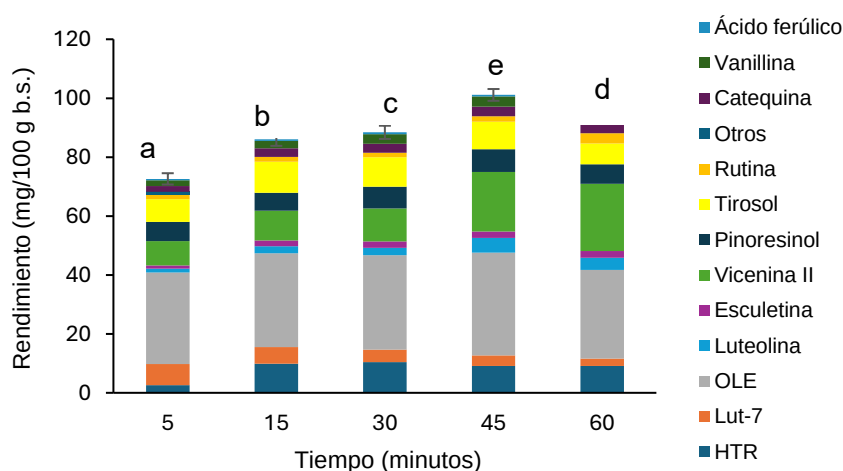


Figura 12. Cinética de extracción de los distintos fenólicos en función del tiempo durante 60 minutos a 52°C con una relación del 5 % (p/v) mediante extracción asistida por ultrasonidos. Las barras con letras distintas denotan que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al rendimiento total.

El mecanismo de acción de la UAE se fundamenta en el fenómeno de cavitación acústica, el cual fragmenta las paredes celulares de la hoja, liberando los fenoles más rápido que el método convencional a la misma temperatura (50 °C), permitiendo obtener mayores rendimientos al minimizar la degradación térmica de los compuestos (Reyes-Mera et al., 2025).

Un estudio previo en macroalgas pardas demostró que una amplitud del 60 % constituye un umbral crítico para inducir la lisis celular y maximizar la recuperación de compuestos fenólicos; asimismo, se observó que intensidades superiores desencadenan la degradación de los analitos debido a la severidad de los efectos térmicos y mecánicos asociados. Este fenómeno de degradación por sobreexposición acústica coincide con el comportamiento observado en el presente trabajo a los 60 minutos de tratamiento. En consecuencia, se hipotetiza que el descenso en el rendimiento no se debe a una transferencia térmica insuficiente, sino a un efecto de sobretratamiento físico que promueve la alteración estructural de los polifenoles (Lee et al., 2024).

4.5 Comparación entre tecnologías de extracción

En este apartado se establece una breve comparación entre los cuatro tipos de extracciones llevados a cabo.

Una de las diferencias más visibles se encuentra en el tiempo en el cual se alcanza el máximo en la extracción de compuestos fenólicos. El empleo de mezclas hidroalcohólicas condujo a tiempos largos de extracción, con un tiempo de equilibrio de 20 h, a partir del cual no se observó un aumento en la extracción de compuestos fenólicos. Por otra parte, el tiempo óptimo de extracción se redujo considerablemente en los procesos de extracción mediante subW, MAE y UAE, con valores de 30 min para las dos primeras y 45 min para UAE.

4.5.1 Efecto en el rendimiento de extracción

En la Figura 13, se muestran los resultados comparativos de extracción entre las diferentes tecnologías empleadas. En la Figura 13a se comparan los resultados obtenidos al tiempo óptimo más corto determinado entre las cuatro tecnologías estudiadas, 30 min de tratamiento. Mientras que en la Figura 13b se presenta la extracción en el tiempo óptimo seleccionado para cada técnica.

Tras 30 minutos de tratamiento se evidenció un mayor rendimiento de extracción mediante subW y MAE frente al método tradicional y la UAE (Figura 13a). A 130 °C, el agua líquida subcrítica presenta propiedades fisicoquímicas que favorecen notablemente los procesos de lixiviación, destacando una disminución en su constante dieléctrica ($\epsilon = 51,5$) y un aumento del producto iónico ($K_w = 10^{-12,1}$).

La MAE mostró la mayor eficiencia de extracción de todo el estudio alcanzando una concentración de compuestos fenólicos totales de 320 ± 3 mg/100 g b.s. Esto supone duplicar el rendimiento de la extracción convencional hidrometanólica. Cabe destacar la extracción de una cantidad de oleuropeína 3 veces superior al método convencional. Comparando con autores, estos indicaron que la MAE era el mejor método para la obtención de polifenoles. Las cantidades obtenidas mediante extracción asistida por microondas en 15 min fueron comparables a las obtenidas mediante extracción convencional en 20 h. Además, estos autores exponen que el uso de microondas incrementó significativamente la concentración de casi todos los compuestos extraídos, en comparación con el método convencional (Proestos & Komaitis, 2008).

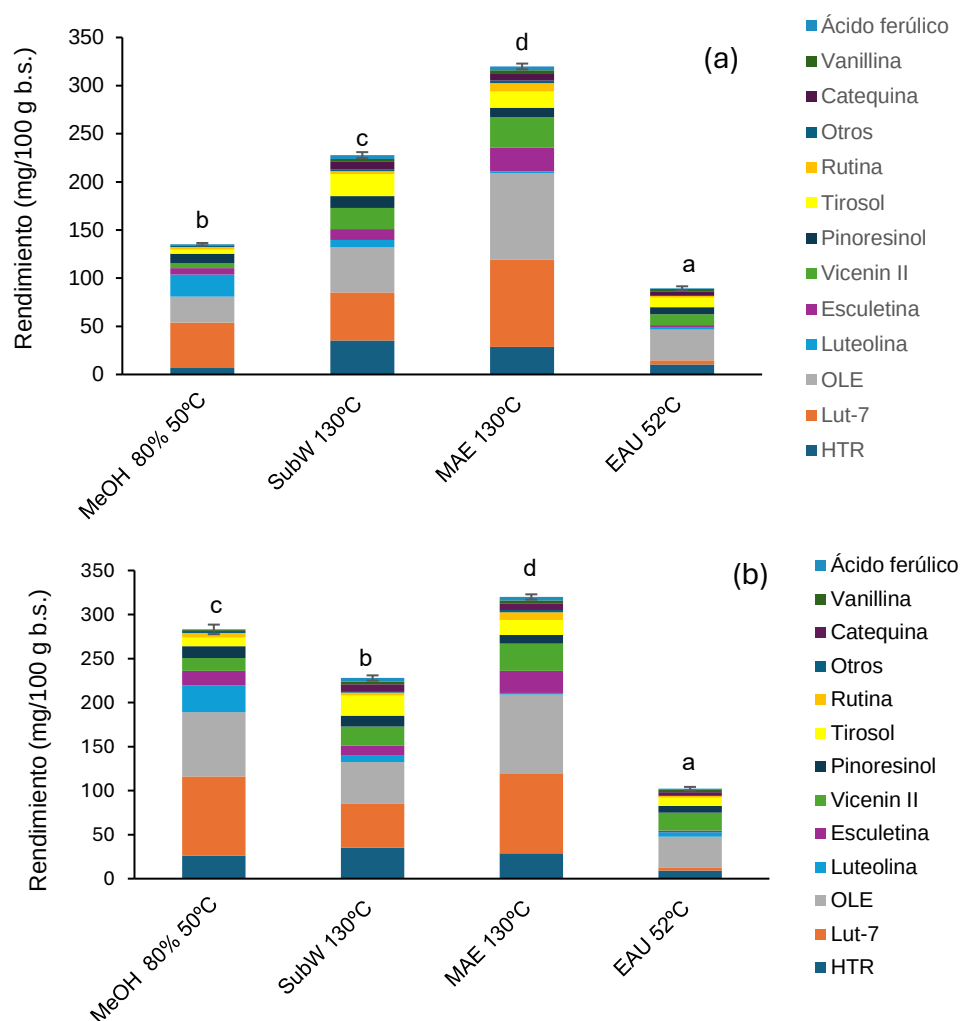


Figura 13. Efecto del método de extracción en el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos: (a) 30 minutos y (b) tiempo óptimo para cada tratamiento. Las barras con letras distintas denotan que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al rendimiento total.

Por otro lado, a un tiempo de 30 minutos, el agua subcrítica logró el segundo mejor rendimiento total (228 ± 3 mg/100 g b.s.), y una extracción de hidroxitirosol 5 veces superior a la observada con la extracción de metanol y agua.

La UAE resultó ser la técnica menos eficiente, y por debajo de la extracción convencional, llegando a un rendimiento de 90 ± 2 mg/100 g b.s. Los resultados sugieren que, bajo la frecuencia y potencia de trabajo ensayadas, el colapso de las microburbujas es energéticamente insuficiente para romper la pared celular de la matriz foliar, de tal forma que a lo largo del tiempo la extracción no aumenta de forma significativa. Pacio Teso (2022) extrajo una cantidad similar de compuesto fenólicos en pocos minutos. Además, expone que esta tecnología no cumplió con las expectativas de rendimiento fitoquímico, mostrando una capacidad extractiva inferior a la obtenida mediante el método tradicional de baño con agitación, lo que respalda la validez de los resultados obtenidos en este trabajo.

Sin embargo, en la Figura 15b se observa que la extracción convencional demostró una fuerte dependencia cronológica. Mientras que a los 30 minutos arrojó un rendimiento marcadamente limitado (135 mg / 100 g b.s.), al prolongar el proceso hasta su tiempo óptimo experimentó un incremento drástico en la recuperación de solutos hasta alcanzar los 283 ± 2 mg / 100 g b.s. Esto representa un aumento del 109,6 %, logrando más que duplicar la concentración al cabo de 20 horas. Este comportamiento pone de manifiesto que, aunque la extracción convencional es un proceso lento gobernado por fenómenos de difusión pasiva molecular, un tiempo de

contacto extendido permite equilibrar la solubilización de la mayoría de los compuestos fenólicos. La MAE consiguió un rendimiento de extracción del 113,1% en comparación con el método convencional de referencia.

En contraste, los tratamientos de agua subcrítica y extracción asistida por mostraron los rendimientos más discretos. La tecnología SubW estabilizó su rendimiento de 228 ± 2 mg/100 g b.s. en ambos escenarios temporales sugiriendo una rápida saturación del medio y consiguió un rendimiento de extracción del 80,6 %. Finalmente, el método EAU 52 °C obtuvo de forma sistemática la menor tasa de recuperación global (102 ± 2 mg/100 g b.s.) y suponiendo un rendimiento de extracción 36,1 %, lo que indica que las condiciones de energía aplicadas o la selectividad del sistema de disolución resultaron insuficientes para desorber cuantitativamente los fenoles ligados a la matriz celular.

En cuanto a la composición individual de compuestos fenólicos, autores como Difonzo et al. (2017) señalan que los extractos etanólicos contienen principalmente OLE y flavonoides como Lut-7 y luteolina, mientras que en los extractos acuosos predominan los ácidos fenólicos y glucósidos de hidroxitirosol. Por otra parte, el ácido vanílico y ácido cafeico se encontraron en mayor cantidad en los extractos acuosos. Utilizando el agua como disolvente se ha conseguido extraer muchos compuestos fenólicos que no estaban presentes en las extracciones hidroalcohólicas. La solubilidad de los compuestos fenólicos se ve favorecida en medios acuosos cuando estos se encuentran glicosilados, es decir, unidos a azúcares, lo que convierte a las mezclas hidroalcohólicas buenos disolvente para la extracción de este grupo. expone que las altas temperaturas junto con un tiempo de operación prolongado pueden derivar a la glicosilación de muchos compuestos fenólicos(Difonzo et al., 2017).

Por el contrario, la extracción de formas agliconas de baja polaridad como flavonoles metoxilados, isoflavonas y flavanonas requiere disolventes orgánicos no acuosos para lograr una mayor eficiencia (Abaza et al., 2011). Durante el calentamiento se produce una degradación térmica en los compuestos fenólicos, hidrolizando enlaces en su estructura y dando como productos compuestos en forma agliconas y pueden no llegar a extraerse por su baja polaridad.

Para el aislamiento de compuestos fenólicos de mayor polaridad como el glucósido de luteolina, el rutinósido de apigenina y los derivados de la oleuropeína, la extracción asistida por microondas (MAE) y el método convencional exhibieron una selectividad superior en comparación con otras técnicas. Sin embargo, se registró un bajo rendimiento en la recuperación de oleuropeína con agua subcrítica al utilizar agua como agente extractante (Abaza et al., 2015).

4.5.2 Efecto en la productividad de la extracción

En cuanto al análisis de productividad se observa un patrón cinético similar en todas las tecnologías estudiadas. Como ejemplo se muestra la evolución de la productividad para la extracción realizada con mezclas hidrometanólicas. En la fase inicial se registra la máxima productividad debido a que, durante los primeros minutos, la extracción de los analitos es muy rápida y la pendiente de la curva de rendimiento acumulado es muy pronunciada. Posteriormente, en la fase intermedia o de transición, la velocidad de extracción disminuye progresivamente con el paso del tiempo, pasando a ser un proceso controlado predominantemente por los fenómenos de difusión interna. Finalmente, en la fase de saturación o productividad cero, se alcanza un régimen estacionario donde la curva se vuelve completamente plana. En este punto, el sistema llega al equilibrio de solubilidad o se produce el agotamiento de la matriz. Por lo tanto, prolongar el tiempo de operación reduce de forma drástica la productividad global del proceso, incrementando el gasto energético total sin aportar una ganancia significativa en la recuperación de compuestos fenólicos.

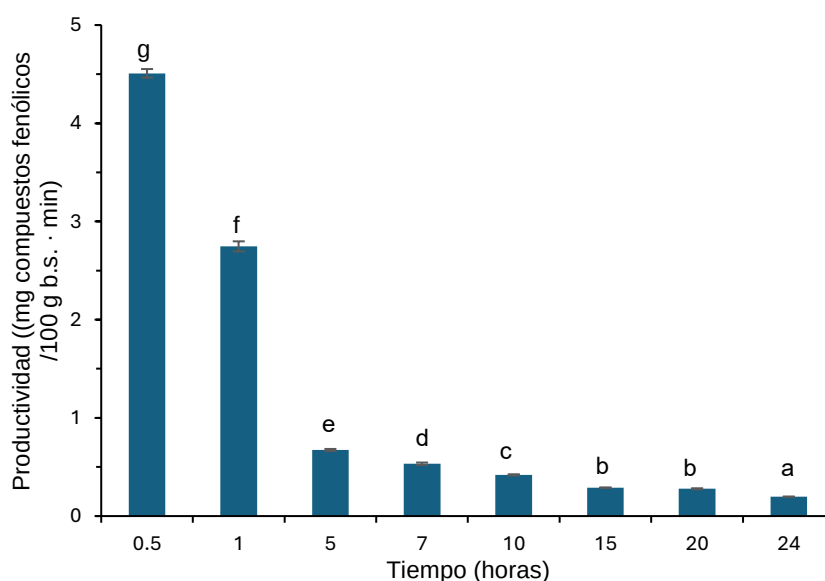


Figura 14. Evolución de la productividad del proceso de extracción de compuestos fenólicos en MeOH T-H en 24 horas. Letras distintas denotan que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al rendimiento total.

Para considerar el tiempo de extracción en la comparación en el rendimiento de extracción entre las diferentes extracciones llevadas a cabo, en la Figura 15 se representa la productividad en el tiempo óptimo obtenido para cada uno de los tratamientos. La MAE obtuvo el valor más alto ($10,5 \pm 0,1$ mg/100 g b.s. · min), seguida por la subW con ($7,5 \pm 0,3$ mg/100 g b.s. · min). En contraste, la UAE registró la menor productividad de todo el estudio ($3,0 \pm 0,1$ mg/100 g b.s. · min), situándose incluso por debajo de la productividad alcanzada mediante los métodos convencionales.

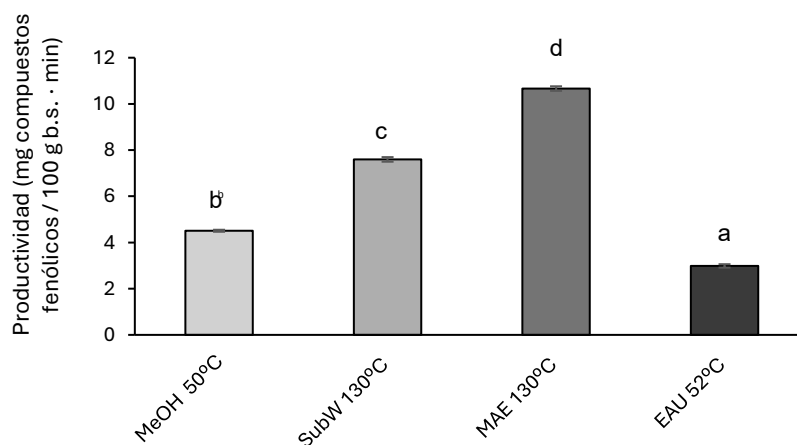


Figura 15. Representación gráfica de la productividad en las distintas tecnologías utilizadas a tiempo óptimo. Las barras con letras distintas denotan que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En conjunto, los resultados sugieren que las técnicas que emplean temperaturas elevadas y mecanismos de extracción más intensivos, como MAE y subW, favorecen significativamente la productividad del proceso en comparación con los métodos convencionales o realizados a menor temperatura.

4.5.3 Consumo energético a escala de laboratorio de los métodos de extracción.

Al evaluar el consumo específico de energía para cada proceso (Figura 16), se evidencian notables discrepancias entre las tecnologías asistidas y los métodos convencionales. Este análisis constituye un factor crítico para determinar la sostenibilidad y la viabilidad a escala industrial de los procesos de obtención de compuestos bioactivos. En este sentido, los datos experimentales revelan diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro métodos evaluados para la recuperación de la fracción fenólica.

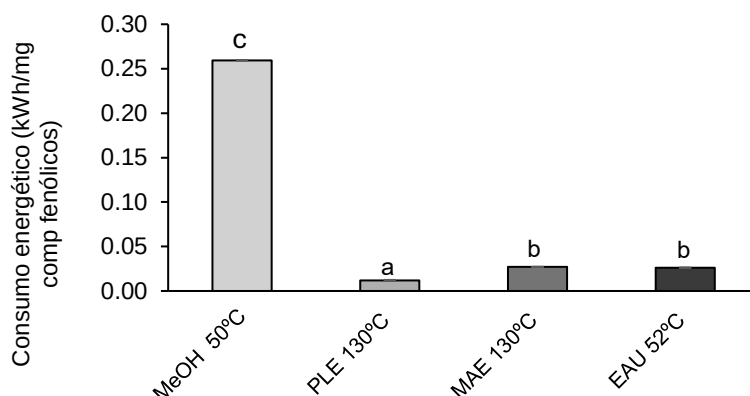


Figura 16. Consumo energético específico de extracción de compuestos fenólicos en función del método empleado a tiempo óptimo (MeOH 80% a 50 °C% aE a 130 °C, MAE a 130 °C y UAE a 52 °C).

El método convencional (MeOH 50 °C) exhibe el mayor consumo energético con un valor de 0,259 kWh/mg. Este elevado consumo se asocia habitualmente a los largos tiempos de extracción y a la menor eficiencia en la transferencia de masa que caracterizan a las técnicas tradicionales de extracción con mezclas hidroalcohólicas.

A pesar de que subW exhibió un menor rendimiento de extracción y una velocidad de extracción ligeramente inferiores a los alcanzados con MAE, la eficiencia energética fue superior. La extracción con agua subcrítica (130 °C) redujo el consumo específico de energía en un 95,37% frente a la extracción con metanol y agua, alcanzando el valor óptimo de 0,012 kWh/mg. Este comportamiento se atribuye a las propiedades del agua en las condiciones de trabajo que implican una mayor eficacia en la extracción. Por su parte, la UAE (52 °C) y la MAE (130 °C) logran reducciones muy similares del 89% frente a la extracción tradicional, demostrando que ambas tecnologías consiguen una optimización de la relación entre el gasto eléctrico y la recuperación de bioactivos.

5. CONCLUSIONES

El empleo de hojas húmedas maximiza el rendimiento fenólico total mediante una mayor extracción de luteolina-7-O-glucósido y luteolina. En contraste, el secado previo optimizó la extracción de oleuropeína. Por otro lado, la trituración de la biomasa rompe la estructura del tejido vegetal y aumenta la superficie de contacto, lo que favorece la transferencia de masa e incrementa en un 6% la extracción de compuestos fenólicos totales. Finalmente, la mezcla hidrometanólica maximizó el rendimiento de extracción (283 ± 2 mg/100 g b.s.) debido a la mayor polaridad, constante dieléctrica y menor tamaño molecular del metanol; no obstante, el sistema hidroetanólico se consolida como una alternativa sostenible, verde y de baja toxicidad, con una eficiencia muy cercana y viable para el proceso global.

En términos de rendimiento de extracción global, la MAE condujo a los mejores resultados con un total de 320 ± 3 mg de compuestos fenólicos por cada 100 g de b.s en tan sólo 30 minutos, logrando además duplicar los rendimientos de compuestos mayoritarios clave como la luteolina-7-glucósido (90 ± 4 mg/100 g b.s.) y la oleuropeína ($89,6 \pm 0,7$ mg/100 g b.s) en comparación con la metodología tradicional.

Por otra parte, la extracción con agua subcrítica (130 °C) se estableció como el tratamiento óptimo en cuanto a eficiencia energética. Este método registró el índice de consumo específico más bajo del estudio, requiriendo 0,012 kWh por cada miligramo de polifenol extraído, lo que representa una optimización del 95,37% respecto al proceso convencional.

En contraposición, la UAE a 52 °C demostró ser una alternativa poco eficiente para esta matriz vegetal específica. A pesar de registrar un bajo gasto eléctrico, las fuerzas físicas de la cavitación acústica a baja temperatura resultaron insuficientes para romper la estructura celular, arrojando un rendimiento fitoquímico deficiente de solo 102 ± 32 mg/100g b.s, un valor inferior incluso al obtenido de forma tradicional.

Finalmente, se concluye que la MAE a 130 °C representa el balance técnico, económico y ambiental más adecuado para un potencial escalado industrial.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abaza, L., Ben Youssef, N., Manai, H., Mahjoub Haddada, F., Methenni, K., & Zarrouk, M. (2011). Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas Y Aceites*, 62(1), 96–104. <https://doi.org/10.3989/gya.044710>
2. Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., & Zarrouk, M. (2015). Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants*, 4(4), 682–698. <https://doi.org/10.3390/antiox4040682>
3. Álvarez-Romero, M., Ruíz-Rodríguez, A., Barbero, G. F., Vázquez-Espinosa, M., El-Mansouri, F., Brigui, J., & Palma, M. (2023). Comparison between Ultrasound- and Microwave-Assisted Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Foods*, 12(14), 2638. <https://doi.org/10.3390/foods12142638>
4. Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., & Hrncič, M. K. (2020). Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules*, 25(24), 5946. <https://doi.org/10.3390/molecules25245946>
5. Cao, S., Liang, J., Chen, M., Xu, C., Wang, X., Qiu, L., Zhao, X., & Hu, W. (2025). Comparative analysis of extraction technologies for plant extracts and absolutes. *Frontiers in chemistry*, 13, 1536590. <https://doi.org/10.3389/fchem.2025.1536590>
6. Cassol, L., Rodrigues, E., & Zapata Noreña, C. P. (2019). Extracting phenolic compounds from Hibiscus sabdariffa L. calyx using microwave assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 133, 168–177. [10.1016/j.indcrop.2019.03.023](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.023)
7. Cea Pavez, I. A. (2020). *Extracción de compuestos fenólicos de subproductos provenientes de la industria del aceite de oliva y su estabilización mediante microencapsulación* [Tesis doctoral, Universidad de Chile]. Repositorio Académico de la Universidad de Chile. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/185747>
8. Cmglee. (2025). *Phase diagram of water* [Diagrama]. Wikipedia. <https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Phase diagram of water.svg>
9. Corona-Jiménez, E., Martínez-Navarrete, N., Ruiz-Espinosa, H., & Carranza-Concha, J. (2016). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chia (*Salvia hispanica* L.) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*, 50(4), 403-412. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000400403&lng=es&tlng=es
10. Díaz-de-Cerio, E., Barea, P., Melgosa, R., Illera, A. E., Sanz, M. T., & Beltrán, S. (2024). Isoflavone-rich extracts from okara using supercritical fluid extraction: Kinetic modeling and characterization. *Food and Bioprocess Processing*, 148, 321–329. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2024.09.019>
11. Difonzo, G., Russo, A., Trani, A., Paradiso, V. M., Ranieri, M., Pasqualone, A., Summo, C., Tamma, G., Silletti, R., & Caponio, F. (2017). Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: Antioxidant characterization and biological activity. *Journal of Functional Foods*, 31, 63–70. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.01.039>

12. Ghomari, O., Sounni, F., Massaoudi, Y., Ghanam, J., Drissi Kaitouni, L. B., Merzouki, M., & Benlemlih, M. (2019). Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 23, e00347. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00347>
13. Han, J., Talorete, T. P. N., Yamada, P., & Isoda, H. (2009). Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, 59(1), 45–53. <https://doi.org/10.1007/S10616-009-9191-2>
14. Hassen, I., Casabianca, H., & Hosni, K. (2015). Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation – A mini-review. *Journal of Functional Foods*, 18, 926–940. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.09.001>
15. Herráez, A., Martz, E., y Carrero, I. (2014). *Biomodel 2: El mundo de los lípidos*. Universidad de Alcalá. <https://biomodel.uah.es/model2/>
16. Higuera Campo, J. (2017). *Los compuestos fenólicos en el aceite de oliva/hoja de olivo: propiedades beneficiosas* [Trabajo de fin de grado, Universidad de Cantabria]. Repositorio Institucional UC. <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/11758/Higuera%20Campo%20Javier.pdf>
17. Kashaninejad, M., Sanz, M. T., Blanco, B., Beltrán, S., & Niknam, S. M. (2020). Freeze dried extract from olive leaves: Valorisation, extraction kinetics and extract characterization. *Food and Bioprocess Processing*, 124, 196–207. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2020.08.015>
18. Krzywonos, M., Difonzo, G., & Pasqualone, A. (2025). Challenges and technological requirements in agri-food waste upcycling: The case study of olive leaf extract. *Future Foods*, 11, 100547. <https://doi.org/10.1016/J.FUFO.2025.100547>
19. Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., & Castro, E. (2020). Characterization of the lignocellulosic and sugars composition of different olive leaves cultivars. *Food Chemistry*, 329, 127153. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127153>
20. Lee, ZJ, Xie, C., Duan, X., Ng, K., & Suleria, HAR (2024). Optimization of Ultrasonic Extraction Parameters for the Recovery of Phenolic Compounds in Brown Seaweed: Comparison with Conventional Techniques. *Antioxidants*, 13 (4), 409. <https://doi.org/10.3390/antiox13040409>
21. Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., & Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140(1–2), 29–34. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2006.11.040>
22. Maestro-Durán, R., León Cabello, R., & Ruíz Gutiérrez, V. (1994). Phenolic compounds from olive (*Olea europaea*). *Grasas Y Aceites*, 45(4), 265–269. <https://doi.org/10.3989/gya.1994.v45.i4.1007>
23. Manousi, N., Sarakatsianos, I., & Samanidou, V. (2019). Extraction Techniques of Phenolic Compounds and Other Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants. *Engineering Tools in the Beverage Industry: Volume 3: The Science of Beverages*, 283–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815258-4.00010-X>
24. Martín-García, B., Arráez Román, D., Gómez-Caravaca, A. M., Gálvez, J., & Segura-Carretero, A. (2018). *Hoja de olivo (Olea europaea L.)*. Alimentos vegetales autóctonos iberoamericanos subutilizados. Fabro Editores. <https://alimentos-autoctonos.fabro.com.mx/hoja-de-olivo.html>
25. Martín-García, B., De Montijo-Prieto, S., Jiménez-Valera, M., Carrasco-Pancorbo, A., Ruiz-Bravo, A., Verardo, V., & Gómez-Caravaca, AM (2022). Extracción comparativa de compuestos fenólicos de hojas de olivo mediante sonotrodo y baño ultrasónico, y evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana. *Antioxidants*, 11 (3), 558. <https://doi.org/10.3390/antiox11030558>
26. Martín Gordo, D. A. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista De Investigación Agraria Y Ambiental*, 9(1), 81-104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>

27. Matute, G., & Torrecilla, J. S. (2012). *Aprovechamiento y valorización de los residuos del olivar*. Agricultura, (951), 336–341.
28. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2025). *Aceite de oliva*. Gobierno de España. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/aceite>
29. Negrón-Díaz, A.C., Aguilar-Piloto, G., Moo-Huchin, V.M., Delgadillo-Díaz, M., & Sauri-Duch, E. (2023). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of phenolic compounds from different *Brosimum alicastrum* tissues. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 10(spe3), e3659. <https://doi.org/10.19136/era.a10niii.3659>
30. Pacio Teso, D. (2022). *Estudio del proceso de extracción de compuestos fenólicos a partir de residuos de mazorca de maíz* [Trabajo de fin de grado, Universidad de Burgos]. Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU). https://riubu.ubu.es/bitstream/handle/10259/7111/Pacio_Teso.pdf?sequence=1
31. Palmeri, R., Siracusa, L., Carrubba, M., Parafati, L., Proetto, I., Pesce, F., & Fallico, B. (2022). Olive leaves, a promising byproduct of olive oil industry: Evaluation of metabolic profiles and antioxidant capacity as a function of cultivar and seasonal change. *Agronomy*, 12 (9), 2007. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092007>
32. Proestos, C., & Komaitis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 41(4), 652–659. [10.1016/j.lwt.2007.04.013](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.04.013).
33. Reyes-Mera, J. J., Viáfara-Banguera, D., Paredes-Ulloa, C. O., & Guamán-Castillo, J. G. (2025). Influencia del tiempo y la técnica de extracción en la recuperación de compuestos fenólicos a partir de la cáscara de *Ananas comosus*. *Revista Científica Zambos*, 4(3), 80-91. <https://doi.org/10.69484/rcz/v4/n3/132>
34. Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., & Fernández-Bolaños, J. (2008). Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*, 99(13), 5261–5269. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.11.027>
35. Rodríguez-Viveros, N., Paz-Samaniego, R., Hernández-Hernández, A., García-Curiel, L., Pérez-Escalante, E., Contreras-López, E., & Pérez-Flores, J. (2023). Extracción de arabinoxilanos de subproductos agroindustriales adaptada a la estrategia universal de recuperación de compuestos bioactivos. *Investigación Y Desarrollo En Ciencia Y Tecnología De Alimentos*, 8(1), 774–784. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.100>
36. Romero, C., García, P., & Brenes, M. (2020). Chemical hydrolysis of oleuropein affected by the type of organic acid. *Food Chemistry*, 316, 126351. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.126351>
37. Sailema Ortiz, M. L., Salazar Garcés, E. C., Palacios Duchicela, R. H., Carrera Borja, W. X., & Zambrano Mendoza, C. A. (2023). Efecto de solvente y temperatura para la extracción de compuestos fenólicos en hojas de fresa. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(3), 2563-2575. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i3.6365
38. Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A. M., León, L., de La Rosa, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Pattern of Variation of Fruit Traits and Phenol Content in Olive Fruits from Six Different Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(48), 10466–10476. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.5B04315>