



UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Curso 2019/2020

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Área de Ingeniería Química

RECUPERACIÓN DE QUERCETINA, OLEUROPEÍNA Y OTROS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN RESIDUOS AGROALIMENTARIOS MEDIANTE UN PROCESO COMBINADO CON MEMBRANAS

Raquel Salvador Rodríguez

Junio 2020

Tutores: José Manuel Benito Moreno y María Isabel Escudero Barbero



**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
CURSO: 2019/2020**

D. José Manuel Benito Moreno y Dña. Isabel Escudero Barbero informan de que la alumna Dña. Raquel Salvador Rodríguez ha realizado el trabajo “Recuperación de quercetina, oleuropeína y otros compuestos fenólicos presentes en residuos agroalimentarios mediante un proceso combinado con membranas” bajo su tutela, y consideran que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 27 de mayo de 2020

Fdo.: José Manuel Benito Moreno

Fdo.: Isabel Escudero Barbero

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

Dña. Raquel Salvador Rodríguez, D. José Manuel Benito Moreno y Dña. Isabel Escudero Barbero, autora y tutores 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 27 de mayo de 2020

Fdo.: Raquel Salvador Rodríguez

Fdo.: José Manuel Benito Moreno

Fdo.: Isabel Escudero Barbero

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto de Investigación BU301P18, que lleva por título *Valorización integral de subproductos de la industria agroalimentaria mediante tecnologías emergentes*, y ha sido financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional

Asimismo, ha colaborado en la realización del trabajo Davinia Benito Bedoya, contratada como personal técnico de apoyo a la investigación por la Universidad de Burgos en base a la resolución EDU/378/2018, de 5 de abril, de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León por la que se resuelve la convocatoria de ayudas destinadas a financiar la contratación de personal técnico de apoyo a la investigación por las Universidades Públicas de Castilla y León, para jóvenes incluidos en el Sistema Nacional de Garantía Juvenil, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo y la Iniciativa de Empleo Juvenil.

Índice

ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJECTIVES.....	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3.1. PRODUCTOS UTILIZADOS.....	3
3.2. MEMBRANAS	4
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	4
3.3.1. Cuantificación de compuestos de interés	4
3.3.2. Caracterización de compuestos de interés.....	6
3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL: PIEL DE CEBOLLA	6
3.4.1. Preparación de la muestra.....	6
3.4.2. Extracción sólido-líquido	6
3.4.3. Concentración del extracto.....	7
3.4.3.1. <i>Nanofiltración</i>	7
3.4.3.2. <i>Evaporación a vacío</i>	8
3.4.3.3. <i>Liofilización</i>	8
3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL: HOJAS DE OLIVO	9
3.5.1. Preparación de la muestra.....	9
3.5.2. Extracción sólido-líquido	9
3.5.3. Concentración del extracto mediante procesos con membranas	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1. Recuperación de compuestos fenólicos de piel de cebolla.....	10
4.2. Recuperación de compuestos fenólicos de hojas de olivo.....	15
5. CONCLUSIONES	20
BIBLIOGRAFÍA.....	21

ABSTRACT

Millions of tons of by-products from the agrofood industry are wasted daily worldwide without subjecting them to an efficient exploitation process, despite the fact that many of these by-products are rich in functional compounds of great interest and with multiple uses in several areas, mainly in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. The main objective of this work has been to study the technical feasibility of a combined solvent extraction / nanofiltration / vacuum evaporation / lyophilization treatment for the recovery of quercetin and other phenolic compounds present in red onion skins generated as a by-product of the *Morcilla de Burgos* production process in the company *Embutidos de Cardeña S.L.*, and also oleuropein and other phenolic compounds present in olive leaves of the *Serrana de Espadán* variety supplied by the cooperative *Pagos de Benaval*, two phenolic compounds of high added value due to their high antioxidant capacity and their use in medical applications, so their recovery from these wastes could be very profitable.

Quercetin extraction from onion skin was performed using an aqueous solution of ethanol (70 vol. %) as solvent. The antioxidant activity (FRAP method) and the total phenolic (TPC) and flavonoid (TFC) content of the extract were measured. An aliquot of the extract was concentrated by vacuum evaporation (90 mbar, 30 °C and 150 rpm) to remove the solvent, obtaining a volume concentration factor (VCF) of 3.9 after 8 h of operation. Another part of the extract was pre-concentrated by nanofiltration (NF) in a high pressure stirred cell, using a NF270 flat polymeric membrane with a molecular weight cut-off 270 Da, under optimal operating conditions (25 bar, 30 °C, 300 rpm), reaching a VCF = 5 after 6 h, with a minimum loss of compounds of interest. The lyophilized extract obtained from the nanofiltration concentrate had a greater antioxidant capacity and a higher TPC and TFC than the lyophilized extract obtained from the vacuum evaporation concentrate. Both lyophilized extracts showed very similar chromatograms, being quercetin and its glycosylated derivatives the main components, followed by protocatechuic acid and p-coumaric acid. The extract pre-concentration by NF allowed to shorten the duration of the vacuum evaporation stage by 10 h, with the subsequent energy savings.

Oleuropein extraction from olive leaves was carried out using an aqueous solution of methanol (90 vol. %) as solvent. The antioxidant activity (ABTS method) and the TPC of the final extract were also measured. Preliminary nanofiltration experiments were performed with water and synthetic aqueous oleuropein solutions using three organic membranes, thus selecting the most suitable membrane (NF270) and the optimal operation conditions (20 bar, 30 °C, 300 rpm) for the concentration of the olive leaves extract. The concentration process was run for 2 h obtaining a VCF < 1.5; however, the concentration of this extract was not feasible by means of nanofiltration under the operating conditions studied in this work due to the fast and severe membrane fouling, even using an ultrafiltration pre-treatment.

Keywords: Onion skin, olive leaves, quercetin, oleuropein, solid-liquid extraction, nanofiltration, vacuum evaporation, lyophilization.

1. INTRODUCCIÓN

La industria agroalimentaria genera, a nivel mundial, millones de toneladas anuales de subproductos y corrientes de procesamiento de elevado impacto medioambiental si se procede a su vertido sin un tratamiento adecuado, como es el caso del lactosuero de la producción de queso, las melazas y vinazas de azucarera, las aguas residuales de matadero, etc. Hasta hace relativamente poco tiempo, el aprovechamiento de estos subproductos se enfocaba principalmente a la obtención de fertilizantes o a la alimentación animal. Sin embargo, en los últimos años se han investigado nuevas

líneas de valorización para recuperar las sustancias de alto valor añadido presentes en los mismos para su uso posterior en diferentes aplicaciones de la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética, principalmente.

La inversión en investigación para encontrar una funcionalidad a los subproductos de la industria alimentaria es de gran interés económico y medioambiental, ya que los componentes de alto valor pueden emplearse en la preparación de suplementos dietéticos, nutraceuticos, o como ingredientes alimentarios funcionales gracias a su disponibilidad y a sus efectos nutricionales (Sahin y Bilgin, 2017). Un ejemplo de estos subproductos son las hojas de olivo o la piel de cebolla, objeto de estudio en el presente trabajo, residuos vegetales de bajo costo, renovables y abundantes, que poseen compuestos fenólicos con un alto poder antioxidante cuya recuperación aún no ha sido explotada a nivel industrial (Ahmad-Qasem Mateo, 2015).

Durante el proceso de producción del aceite de oliva se genera una gran cantidad de material lignocelulósico como residuo, principalmente hojas de olivo (*Olea europaea*). Debido a su elevado contenido en compuestos fenólicos con elevada capacidad antioxidante (principalmente oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol), las hojas de olivo pueden utilizarse como materia prima en biorrefinerías, donde los antioxidantes son de gran uso potencial (Caballero y col., 2020).

La **oleuropeína** es un compuesto secoiridoide que es el principal componente fenólico de la pulpa de las aceitunas verdes, siendo responsable del sabor amargo de las mismas y del aceite de oliva virgen extra (Cavaca y col., 2020); sin embargo, la mayor fuente de oleuropeína son las hojas de olivo. Se trata de un éster glicosilado de ácido elenólico e hidroxitirosol, con un peso molecular de 540,514 g/mol. Cabe destacar que el nivel de oleuropeína disminuye con la maduración de la aceituna (Sahin y Bilgin, 2017). La oleuropeína posee propiedades antihipertensivas y cardiosaludables, al tener capacidad de inhibir la oxidación del colesterol LDL. Tanto la oleuropeína como su metabolito, el hidroxitirosol, son dos de los más potentes antioxidantes naturales conocidos, siendo su efecto sinérgico junto con otros compuestos fenólicos, como los glucósidos de luteolina y apigenina, el responsable de las propiedades protectoras cardiovasculares de los extractos de hojas de olivo (Stamatopoulos y col., 2014).

En el caso de la piel de cebolla destaca su contenido en flavonoides, compuestos de elevada actividad antioxidante, antidiabética, antiinflamatoria, anticancerígena, antimicrobiana, antihiperlipidémica, fibrinolítica, antiplaquetaria, inmunomoduladora y antiisquémica (Saplontai-Pop y col., 2015). La **quercetina**, (2-(3,4-Dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona), es el principal flavonoide presente en la cebolla (Choi y col., 2015). Los derivados de la quercetina son los encargados de dar el color amarillo a la cebolla blanca, mientras que las antocianinas dan el color púrpura a la cebolla roja (Fajardo-Romero y col., 2016). La quercetina es uno de los flavonoles con mayores efectos benéficos para la salud, debido a su actividad antioxidante, anticancerígena, antitóxica, antienvjecimiento y antimicrobiana (Borska y col., 2010; Kelly, 2011; Patel y col., 2012). Incluso existe un proceso de oxidación de quercetina que genera un metabolito conocido como 2-(3,4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxi-3 (2H)-benzofuranona, cuya capacidad antioxidante es notablemente mayor que la de la quercetina (Fuentes y col., 2020).

En este trabajo se ha estudiado la extracción de compuestos fenólicos, principalmente quercetina presente en piel de cebolla roja y oleuropeína presente en hojas de olivo, mediante un proceso combinado de extracción sólido-líquido con disolventes (mezclas hidroalcohólicas de etanol o metanol) y concentración de los extractos mediante técnicas con membranas (ultrafiltración y nanofiltración), evaporación a vacío y liofilización.

La investigación realizada servirá como paso previo para la futura encapsulación de estos concentrados mediante diferentes técnicas (emulsificación, secado por spray, electropulverización (Soleimanifar y col., 2020), secado con CO₂ supercrítico (PGSS-drying), etc.) y aumentar así la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos extraídos sin perder su capacidad antioxidante. Será también necesario el estudio de las aplicaciones de dichos concentrados encapsulados, por ejemplo como enriquecedores de alimentos sólidos a través del uso de matrices sólidas porosas y libres de enzimas oxidativas, otorgando así un alto valor agregado y comercializable (Ahmad-Qasem Mateo, 2015).

2. OBJECTIVES

The main aim of this work has been to study the technical feasibility of a combined solvent extraction / nanofiltration / vacuum evaporation / lyophilization treatment for the recovery of phenolic compounds, mainly oleuropein and quercetin present in olive leaves and onion skin waste generated as by-products of olive oil and the *Morcilla de Burgos* production processes, respectively. The purpose is to take advantage of these agrofood by-products, thus obtaining economic and environmental benefits and reducing the amount of waste generated.

The following specific objectives were also established to achieve this main goal:

- To perform the solid-liquid extraction of the phenolic compounds using hydroalcoholic solutions.
- To characterize the extracts obtained by means of antioxidant capacity (ABTS and FRAP assays), total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) measurement, using liquid chromatography (HPLC-DAD) to determine their main components.
- To study the technical viability of a membrane treatment (nanofiltration or a combined ultrafiltration/nanofiltration process) using a high-pressure stirred cell and flat disc organic membranes to perform the concentration of the extracts obtained for their subsequent vacuum evaporation and lyophilization.
- To check the effectiveness of the nanofiltration as a pre-concentration stage in terms of antioxidant capacity, TPC and TFC in the final concentrates obtained, as well as to shorten the vacuum evaporation process time and to increase energy savings in this treatment before the final lyophilization stage.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PRODUCTOS UTILIZADOS

Los experimentos se llevaron a cabo con dos tipos de residuos agroalimentarios como alimentación: a) Pieles y capas externas de cebolla roja suministradas por la empresa *Embutidos de Cardaña S.L.*; b) Hojas de olivo suministradas por la cooperativa *Pagos de Benaval*, procedentes de olivos de la variedad Serrana de Espadán (*Olea europaea* var. Serrana de Espadán), endémicos del Parque Natural de la Sierra de Espadán (Castellón).

Los reactivos químicos utilizados en los experimentos y análisis del presente trabajo fueron los siguientes: metanol (>99,8%, calidad HPLC HiPerSolv CHROMANORM[®], VWR Chemicals), etanol (>99,9 %, calidad HPLC LiChrosolv[®], Merck), ácido 6-hidroxi-

2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox, >99,9%, Sigma-Aldrich), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS, >98%, Sigma-Aldrich), persulfato potásico (>99%, Sigma-Aldrich), acetato de sodio (99%, Merck), ácido acético glacial (>99,7%, Panreac), 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ, >99,9%, Sigma-Aldrich), reactivo de Folin-Ciocalteu (>99,9%, VWR Chemicals), ácido gálico (>97,5%, Sigma-Aldrich), carbonato sódico (>99,9%, VWR Chemicals), acetato de amonio (HPLC LiChropur®, Merck), cloruro de hierro (III) hexahidratado (>99,9%, Panreac), sulfato de hierro (II) heptahidratado (>99%, Merck), carbonato sódico (>99,9%, VWR Chemicals), ácido clorhídrico (37%, Acros Organics), hidróxido sódico (>99,9%, Cofarcas S.A.) y acetonitrilo (isocratic grade LiChrosolv®, Merck). Los siguientes patrones utilizados en la caracterización de las muestras mediante HPLC fueron suministrados por Sigma-Aldrich: oleuropeína (>80%), hidroxitirosol (>98%), ácido clorogénico (>95%), rutina (>95%), verbascósido (>99%), luteolina (>97%), luteolina 7-glucósido (>98%), apigenina (>95%), naringenina (>95%), quercetina (>95%), quercetina 3-glucósido (>98%), quercetina 4'-glucósido (>95%), quercetina 3,4'-diglucósido (>85%), ácido protocatéquico (>97%), ácido p-hidroxibenzoico (>99%), ácido vainillínico (>97%), ácido p-cumárico (>98%), miricetina (>96%) y kaempferol (>97%).

Para todos los análisis y métodos se utilizó agua ultrapura Tipo I Milli-Q (Merck-Millipore), obtenida a partir de agua destilada Tipo II mediante un equipo de purificación Ecomatic 3L DP50L (Wasserlab).

3.2. MEMBRANAS

En todos los experimentos de ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF) se utilizaron membranas poliméricas planas, cuyas características se muestran en la Tabla 1, recortadas en discos de 47 mm de diámetro y 14,6 cm² de área efectiva.

Tabla 1. Características de las membranas utilizadas en este trabajo.

Membrana	Fabricante	Proceso	Material	Peso molecular nominal límite, NMWL (Da)
NF270	Dow-Filmtec	NF	Poliamida	270
TS40	TriSep	NF	Polipiperazinamida	200
NP010	Microdyn Nadir	NF	Polietersulfona	500-600
ST	Synder	UF	Polietersulfona	10000
US100	Microdyn Nadir	UF	Polisulfona	100000

3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1. Cuantificación de compuestos de interés

La concentración de compuestos antioxidantes, flavonoides y fenoles totales se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando un espectrofotómetro Hitachi U-2000 de doble haz y microcubetas de cuarzo de 1 cm de ancho.

En todos los métodos y procedimientos se utilizaron viales de color topacio, con el fin de evitar la posible oxidación y degradación de los extractos a causa de la luz. Todas las muestras se homogeneizaron en un vortex (VWR Mixer Mini Vortex) para asegurar la correcta reacción de los compuestos. Los reactivos y las muestras se pesaron en una balanza analítica Precisa 125 A ($\pm 0,0001$ g). Los métodos utilizados se describen brevemente a continuación.

- **Capacidad antioxidante (método ABTS).** Este método, utilizado para medir la capacidad antioxidante de los extractos de hojas de olivo, se basa en la decoloración del radical catión ABTS•+ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonato)). En este caso el radical se genera mediante la reacción del reactivo ABTS, que está formado por la mezcla (1:1) de una disolución acuosa de ABTS 7 mM y persulfato potásico ($K_2S_2O_8$) 2,45 mM, dejándolo reaccionar 16 horas a temperatura ambiente y en oscuridad (Rivero-Pérez y col., 2007). Se mezclaron 20 μ L de muestra con 980 μ L del reactivo ABTS, previamente diluido en metanol hasta conseguir un absorbancia entre 0,7-0,9. La reacción tiene lugar a los 20 minutos en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 734 nm, utilizando Trolox como patrón para el calibrado ($R^2 = 0,991$). En presencia de un agente antioxidante se produce una decoloración del compuesto y, por tanto, una disminución de la absorbancia (Re y col., 1999). La capacidad o actividad antioxidante (AA) de la muestra se expresa como mg de equivalentes de Trolox/g hojas de olivo secas.
- **Capacidad antioxidante (método FRAP).** Con este método se determina el poder reductor de las muestras (extractos de piel de cebolla en este caso). Se basa en la capacidad de reducir el Fe (III) hasta Fe (II) (Benzie y Strain, 1996). El reactivo FRAP se preparó mezclando 25 mL de acetato sódico 0,3 M a pH 3,6 (pH-metro Crison GLP 21), 2,5 mL de TPTZ 10 mM disuelto en HCl 40 mM, 2,5 ml de $FeCl_3$ 20 mM y 3 mL de agua Milli-Q. Se mezclaron 30 μ L de muestra con 970 μ L de reactivo FRAP. La reacción tiene lugar tras la incubación de las muestras durante 30 minutos a 37 °C en un baño termostaticado (Ultraterm, Selecta). Se midió la absorbancia a 593 nm, utilizando $FeSO_4$ como patrón para el calibrado ($R^2 = 0,9998$). Cuanto mayor es la cantidad de antioxidantes en la muestra, mayor coloración azul presenta, y por tanto mayor absorbancia (Rebolleda y col., 2015). La capacidad o actividad antioxidante (AA) de la muestra se expresa como mg $FeSO_4$ /g piel de cebolla seca.
- **Fenoles totales (TPC).** La concentración de fenoles totales se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu, que se basa en una reacción óxido-reductora entre el reactivo de Folin-Ciocalteu (se reduce) y los polifenoles presentes en la muestra (se oxidan) (Downes y col., 2010). Se mezclaron 20 μ L de muestra, 3,2 mL de agua destilada, 200 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y 600 μ L de carbonato sódico 1,9 M. Se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La absorbancia se midió a 760 nm, utilizando ácido gálico como patrón para el calibrado ($R^2 = 0,9981$). La concentración de fenoles totales de la muestra se expresa como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g piel de cebolla seca, o como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g hojas de olivo secas.
- **Flavonoides totales (TFC).** La concentración de flavonoides totales en los extractos de piel de cebolla se determinó mediante la adición de 3 mL de una disolución de hidróxido sódico (0,1 M NaOH en una mezcla 1:1 (v/v) etanol-agua) a 100 μ L de muestra en viales de color topacio. Las mezclas se agitaron posteriormente y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La absorbancia se midió a 420 nm, realizando un calibrado con disoluciones estándar de quercetina ($R^2 = 0,999$). La concentración de flavonoides totales de la muestra se expresa como mg de equivalentes de quercetina (QE)/g piel de cebolla seca (Downes y col., 2010).

3.3.2. Caracterización de compuestos de interés

La técnica que se utilizó para la caracterización de los compuestos de interés fue una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD, Agilent 1100). Al ser un HPLC con detector de diodos (DAD), se puede trabajar simultáneamente a diferentes longitudes de onda (280, 330, 350 y 370 nm), permitiendo comparar los compuestos y poder caracterizarlos. Se utilizó una columna Kinetex® 5 µm Biphenyl 100 Å, 250 x 4.6 mm, con dos fases móviles, A y B, siendo la fase A una disolución acuosa de acetato amónico 5 mM con un 1% de ácido acético, y la fase B una disolución de acetato amónico 5 mM en acetonitrilo con un 1% de ácido acético. La separación de los diferentes compuestos se llevó a cabo con 10 µL de muestra a 25 °C y un flujo de 0,8 mL/min, utilizando el siguiente gradiente lineal de fases móviles: 2% B (0-7 min), 2-8% B (7-20 min), 8-10% B (20-35 min), 10-18% B (35-55 min), 18-38% B (55-65 min), 38-65% B (65-75 min), 65-80% B (75-80 min) y 2% B (80-90 min), con un tiempo de equilibrio posterior (*post-time*) de 10 minutos antes de inyectar la siguiente muestra. Este método ha sido desarrollado y puesto a punto por el grupo de investigación *Bioteología Industrial y Medioambiental* (BIOIND) del Área de Ingeniería Química de la Universidad de Burgos.

3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL: PIEL DE CEBOLLA

3.4.1. Preparación de la muestra

La empresa *Embutidos de Cardeña S.L.* suministró las pieles y capas externas de cebolla roja ya limpias y secas, por lo que posteriormente se dividieron en lotes de 100 g de peso, aproximadamente, y se guardaron en bolsas de poliamida y polietileno, utilizando una máquina de vacío (Tecnotrip, EVT-7CD) para conservarlas en ausencia de aire y congelarlas a -22 °C. De este modo se aseguró una correcta conservación y almacenamiento de la muestra.

3.4.2. Extracción sólido-líquido

Los experimentos de extracción sólido-líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital (Incubator Shaker, modelo G25, New Brunswick Scientific Co.), utilizando una mezcla hidroalcohólica etanol-agua al 70% (v/v) como disolvente. Previamente, se procedió a la molienda de la piel de cebolla, preparada según el procedimiento explicado anteriormente, utilizando un molino Retsch SM100, hasta una granulometría final $\leq 600 \mu\text{m}$, con el fin de aumentar el área de transferencia de materia y mejorar el proceso de extracción de los compuestos de interés (quercetina y otros compuestos fenólicos) presentes en la misma.

La extracción se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad bajo las siguientes condiciones óptimas de operación, establecidas en anteriores trabajos del grupo de investigación, para obtener la máxima concentración de fenoles totales en el extracto: temperatura de 35 °C, velocidad de agitación de 255 rpm, tiempo de extracción de 1 hora y relación masa/volumen de 0,053 g piel de cebolla/mL de disolvente.

El extracto obtenido se sometió a una filtración a vacío con el fin de separar las partículas sólidas, almacenándose en botes de vidrio color topacio y conservándose congelado a -22 °C hasta su uso posterior.

3.4.3. Concentración del extracto

La siguiente etapa consistió en la obtención de un extracto de piel de cebolla concentrado, para lo cual se estudiaron tres métodos: preconcentración con membranas (nanofiltración), evaporación a vacío (tanto del extracto inicial como del concentrado obtenido mediante membranas) y liofilización. El objetivo es obtener un extracto concentrado que conserve la mayor parte de los compuestos de interés y permitir su futura encapsulación mediante diferentes técnicas, aumentando así la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos extraídos, principalmente de la quercetina.

3.4.3.1. Nanofiltración

La separación con membranas se basa en la permeación preferencial o rechazo de diversas moléculas presentes en una corriente de alimentación, la cual se hace pasar de forma tangencial a la superficie de la membrana, obteniendo dos corrientes finales: el permeado, con los compuestos capaces de atravesar la membrana, y el retenido o concentrado, donde se encuentran los compuestos que no pueden atravesar la membrana. Los procesos con membranas están considerados como una **tecnología limpia**, debido a su escasa generación de efluentes contaminantes, aplicándose en muchos casos para aumentar la seguridad de algunos productos alimentarios sin tener que recurrir a tratamientos térmicos. Los más utilizados industrialmente son aquéllos en los que la presión es la fuerza impulsora: microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (OI), según el orden decreciente del tamaño de poro de la membrana utilizada (Manahan, 2006; Zeman y Zydney, 1996). La nanofiltración, seleccionada en este trabajo, es más selectiva que la ósmosis inversa, ya que retiene las moléculas disueltas y los iones polivalentes, pero permite la filtración de los iones monovalentes junto con el agua, operando a presiones más bajas que la ósmosis inversa y con un consumo de energía inferior.

En todos los procesos con membranas se observa una disminución progresiva de la densidad de flujo de permeado (J) a lo largo del tiempo de operación, debido principalmente a dos causas: i) La *polarización por concentración*, consistente en el aumento de la concentración de solutos en la superficie adyacente a la membrana. Es un fenómeno reversible que puede minimizarse aumentando la velocidad tangencial de la alimentación sobre la superficie de la membrana (Dascalu, 2018); ii) El *ensuciamiento* de la membrana, fenómeno irreversible debido a la acumulación de solutos directamente sobre la superficie de la membrana, especialmente al trabajar con disoluciones con elevado contenido en proteínas (Chacón-Villalobos, 2006), o incluso en el interior de los poros de la misma, provocando el bloqueo total o parcial de los poros y pudiendo llegar a producir el colmataje de la membrana, con una disminución drástica de la densidad de flujo de permeado y una pérdida de la selectividad de la propia membrana (Girard y Fukumoto, 2000).

Los experimentos de nanofiltración se realizaron en una celda de alta presión Sterlitech HP4750 Stirred Cell de 300 mL de capacidad, construida con acero inoxidable, juntas de PTFE y dotada de un agitador magnético situado a una determinada altura sobre la superficie de la membrana para minimizar los fenómenos de polarización por concentración y ensuciamiento de la misma. Esta celda está diseñada para operar a presiones de trabajo comprendidas entre 5 y 69 bar, con membranas de micro, ultra y nanofiltración, utilizando aire comprimido o un gas inerte. En estos experimentos se empleó una bombona de nitrógeno con un manorreductor DHP-200-50-10 (Air Liquide) y una válvula de seguridad, conectada a la parte superior de la celda mediante un tubo termoplástico SAE J517 100R7 (Swagelok) de nylon de 0,25 pulgadas de diámetro nominal.

Para la preconcentración del extracto de piel de cebolla se utilizó la membrana NF270, cuyas características se indican en la Tabla 1. Esta membrana se coloca sobre el soporte poroso de la parte inferior de la celda, añadiendo posteriormente la alimentación y montando la celda, la cual se sitúa sobre un agitador magnético (Agimatic-E, Selecta) que permite controlar la velocidad de agitación sobre la superficie de la membrana. Cuando la celda está completamente cerrada se comienza a suministrar el nitrógeno, regulando la presión hasta alcanzar el valor deseado y recogiendo de forma continua el permeado, que atraviesa la membrana y sale por la parte inferior de la celda, en un vaso de precipitados situado sobre una balanza analítica (PS1000.R2, Radwag).

Las membranas nuevas deben acondicionarse previamente en la celda de NF para eliminar la fina capa de material preservante que las recubre, lo que se realiza utilizando 250 mL de agua Milli-Q como alimentación hasta obtener una densidad de flujo de permeado (J) constante, bajo las siguientes condiciones de operación: presión de 10 bar de presión, velocidad de agitación de 300 rpm y a temperatura ambiente (20 ± 1 °C). Se anota el peso del permeado recogido a lo largo del tiempo hasta obtener una densidad de flujo de permeado constante; el proceso suele durar entre 45 y 60 minutos. La densidad de flujo de permeado (J) se calcula del siguiente modo:

$$J = \frac{m_p}{\rho_p A_m t} \quad (1)$$

donde m_p es la masa en kg de la muestra de permeado recogida, ρ_p es su densidad ($\approx 1000 \text{ kg/m}^3$ en el caso del agua), t el tiempo de recogida de muestra en horas y A_m es el área efectiva de la membrana ($0,00146 \text{ m}^2$).

Una vez acondicionada la membrana, se procedió a la concentración de 250 mL de extracto de piel de cebolla bajo las siguientes condiciones de operación óptimas determinadas en experimentos previos del grupo de investigación: temperatura de 30 °C, velocidad de agitación de 300 rpm y presión de 25 bar. Para operar a una temperatura de 30 ± 1 °C se introdujo la celda de nanofiltración en un recipiente con agua, controlando la temperatura mediante un baño termostático Tectron-Bio (JP Selecta). El proceso de concentración mediante NF se dio por finalizado al alcanzar un factor de concentración en volumen (FCV) de 5.

3.4.3.2. Evaporación a vacío

Otro método de concentración estudiado en este trabajo es la evaporación a vacío del extracto, que se realizó utilizando un rotavapor Laborota 4001 (Heidolph). Se reguló la presión hasta condiciones óptimas para evaporar la cantidad adecuada de disolvente sin que haya pérdidas de solutos en la muestra. Además de la presión, en esta técnica influyen también la velocidad de agitación, la temperatura y las características del extracto utilizado.

Se utilizó nuevamente como alimentación el extracto etanólico (320 mL) obtenido inicialmente, operando en el rotavapor a 30 °C, 150 rpm y 90 mbar de presión.

3.4.3.3. Liofilización

La liofilización es un proceso de deshidratación a alto vacío consistente en eliminar el agua contenida en una muestra, previa congelación de la misma, mediante sublimación, hasta alcanzar un contenido final de humedad inferior al 2% en peso.

El extracto obtenido fue liofilizado en un equipo Labconco Freeze Dry System (presión de operación $1,5 \cdot 10^{-4}$ bar; tiempo de operación de 48 horas). Se utilizó como alimentación tanto el extracto final obtenido en el proceso de evaporación a vacío

como el concentrado obtenido mediante nanofiltración, ya desalcoholizados, los cuales se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 12 horas antes de ser liofilizados.

Posteriormente se realizó una reconstitución de ambos extractos liofilizados, redisolviéndolos en una mezcla hidroalcohólica (70% en volumen de etanol), con la finalidad de comparar sus propiedades con las del extracto inicial.

En todos los experimentos realizados en esta parte del trabajo se midió la capacidad antioxidante (FRAP) y concentración de fenoles y flavonoides totales en los extractos (inicial y liofilizado reconstituido) y en los permeados obtenidos mediante nanofiltración. También se identificaron mediante HPLC los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos y en el concentrado obtenido mediante nanofiltración.

3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL: HOJAS DE OLIVO

3.5.1. Preparación de la muestra

Las hojas de olivo suministradas por la cooperativa *Pagos de Benaval* se secaron a temperatura ambiente durante varios días para minimizar su contenido de humedad. Posteriormente se separaron las hojas de las ramas y del resto de materiales y se procedió a su molienda y tamizado, utilizando el molino Retsch SM100, hasta una granulometría final $\leq 500\text{ }\mu\text{m}$, para mejorar el proceso de extracción de los compuestos de interés (oleuropeína y otros compuestos fenólicos) presentes en las mismas. Se obtuvieron 120 g de hojas molidas y tamizadas.

3.5.2. Extracción sólido-líquido

Los experimentos de extracción sólido-líquido se llevaron a cabo en el agitador orbital mencionado en el apartado 3.4.2, utilizando en este caso una mezcla hidroalcohólica metanol-agua al 90% (v/v) como disolvente. La extracción se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad bajo las siguientes condiciones óptimas de operación, determinadas también en anteriores trabajos del grupo de investigación para obtener la máxima concentración de fenoles totales en el extracto: temperatura de $36\text{ }^{\circ}\text{C}$, velocidad de agitación de 150 rpm, tiempo de extracción de 12 horas y relación masa/volumen de 0,153 g hojas de olivo/mL de disolvente.

Se procedió a la extracción de los compuestos fenólicos presentes en 76,6 g de hojas de olivo secas y molidas utilizando un volumen de disolvente de 500 mL. El extracto obtenido se sometió a una filtración a vacío con el fin de separar las partículas sólidas, obteniendo un volumen de extracto de 350 mL, el cual se guardó en botes de vidrio color topacio para evitar la fotooxidación de sus componentes y se conservó en congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso posterior.

3.5.3. Concentración del extracto mediante procesos con membranas

El extracto obtenido en la etapa anterior se concentró mediante nanofiltración o un proceso combinado de ultra y nanofiltración, utilizando la celda de alta presión Sterlitech HP4750 Stirred Cell y operando como se ha indicado en el apartado 3.4.3.1.

En este caso se realizaron experimentos previos con agua Milli-Q, mezclas hidroalcohólicas metanol-agua (90% en volumen de metanol) y disoluciones sintéticas de oleuropeína para seleccionar la membrana de nanofiltración más adecuada (NF270, TS40 o NP010, con las características indicadas en la Tabla 1) y las condiciones de operación óptimas. Cada membrana nueva se acondicionó utilizando 200 mL de agua Milli-Q antes de su uso.

Para seleccionar la temperatura de operación óptima se realizaron los siguientes experimentos para cada una de las 3 membranas utilizadas, operando siempre con una velocidad de agitación sobre la superficie de la membrana de 300 rpm: i) Variación de la densidad de flujo de permeado (J, calculada mediante la Ecuación (1)) con agua a 20 °C para presiones comprendidas entre 10 y 40 bar; ii) Variación de J a 20 °C y a 30 °C, para presiones comprendidas entre 10 y 40 bar, utilizando como alimentación la mezcla metanol-agua (90% en volumen de metanol).

Una vez seleccionada la temperatura óptima para cada membrana, se llevaron a cabo experimentos de nanofiltración a dicha temperatura, utilizando como alimentación una disolución sintética de 10 mg/L de oleuropeína en una mezcla hidroalcohólica metanol-agua al 90% (v/v). Se determinó nuevamente la variación de J a diferentes presiones de operación (10-40 bar). Las disoluciones de oleuropeína (el principal componente fenólico de las hojas de olivo) se prepararon unos minutos antes de utilizarlas para evitar su degradación, y las muestras de alimentación y permeados recogidas se guardaron en viales de color topacio a -18 °C hasta su análisis. Se midió la concentración de oleuropeína en cada muestra mediante espectrofotometría UV-Vis (espectrofotómetro Hitachi U-2000) a una longitud de onda de 231 nm, realizando previamente un calibrado con disoluciones de oleuropeína en la mezcla hidroalcohólica para un intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 30 mg/L ($R^2 = 0,996$).

Posteriormente se realizó un experimento de concentración de 250 mL de una disolución sintética de oleuropeína, utilizando la membrana seleccionada a partir de los experimentos anteriores (con la que se ha obtenido una mayor retención de oleuropeína y valores de J relativamente elevados), bajo las condiciones de temperatura y presión de operación óptimas, hasta alcanzar un factor de concentración en volumen (FCV) de 5.

Finalmente se procedió a la concentración del extracto de hojas de olivo utilizando la membrana de NF seleccionada bajo las condiciones de operación óptimas. Debido al contenido en sólidos y materia coloidal del extracto, incluso después de filtrarlo a vacío, en las primeras pruebas de NF se observó un rápido ensuciamiento de la membrana y un bloqueo total de los poros de la misma.

Para intentar minimizar el problema del ensuciamiento de la membrana de NF se centrifugó el extracto a 3000 rpm durante 1 h (centrífuga Eppendorf 5804) y se filtró el sobrenadante utilizando filtros de jeringa Millex (Merck-Millipore) de 0,45 μm . Este extracto se sometió a una ultrafiltración (UF) como etapa previa a la nanofiltración, de modo que el permeado obtenido en la UF se utilizó como alimentación de la NF. Se utilizaron las membranas ST y US100 (véase Tabla 1), previamente acondicionadas, en la etapa de ultrafiltración, realizada a 7 bar, 30 °C y una velocidad de agitación de 300 rpm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE PIEL DE CEBOLLA

Inicialmente se procedió a la extracción durante 1 hora de los compuestos fenólicos presentes en 47,72 g de piel de cebolla seca y molida utilizando 900 mL de disolvente (mezcla hidroalcohólica etanol-agua al 70% (v/v)), a 35 °C y 255 rpm. El extracto obtenido se sometió a una filtración a vacío con el fin de separar las partículas sólidas. Se obtuvieron 790 mL de extracto, con una capacidad antioxidante de $195,01 \pm 11,68$ mg FeSO_4 /g piel de cebolla, una concentración de fenoles totales (TPC) de $71,20 \pm 3,06$

mg GAE/g piel de cebolla y una concentración de flavonoides totales (TFC) de $60,02 \pm 1,53$ mg QE/g piel de cebolla.

Para la concentración del extracto de piel de cebolla mediante nanofiltración se utilizó la membrana NF270, previamente acondicionada.

Se procedió a la concentración de 250 mL de extracto de piel de cebolla utilizando la celda de alta presión Sterlitech HP4750 bajo las siguientes condiciones de operación óptimas: 30 ± 1 °C, 25 bar y velocidad de agitación de 300 rpm. Se midió el peso de permeado recogido a lo largo del tiempo de duración del proceso y se calculó mediante la Ecuación (1) la densidad de flujo de permeado (J, siendo en este caso $\rho_p = 859,1$ kg/m³), tomando muestras de permeado a diferentes tiempos para su posterior análisis. El proceso de concentración mediante NF se dio por finalizado al alcanzar un factor de concentración en volumen (FCV) de 5, definido como:

$$FCV = \frac{V_A}{V_R} = \frac{V_A}{V_A - V_p} \quad (2)$$

donde V_A es el volumen de alimentación inicial y V_R y V_p los volúmenes de retenido y permeado, respectivamente, en cada instante.

En la Figura 1 se muestra la variación de la densidad de flujo de permeado en función del factor de concentración en volumen (FCV). La disminución global de J fue del 20%, con valores medios de aproximadamente 19 L/m² h.

El aumento de la concentración de flavonoides y otros compuestos en el permeado al aumentar el FCV (Figura 2) es un resultado coherente que sigue la tendencia observada en experimentos similares realizados con otros compuestos fenólicos (Castro-Muñoz y col., 2016), ya que a medida que el FCV aumenta, V_R disminuye, J disminuye ligeramente por efecto del ensuciamiento de la membrana (Figura 1) y la concentración de compuestos en el retenido aumenta en mayor proporción a lo largo del tiempo de duración del proceso, existiendo mayor posibilidad de pérdidas de compuestos de interés al atravesar la membrana y pasar a la corriente de permeado, aumentando también los valores medios de retención de todos los compuestos. Como puede verse en la Figura 2, esta pérdida es mínima para los compuestos fenólicos y los flavonoides, con concentraciones máximas de 2 y 7,5 mg/g piel de cebolla en el permeado, respectivamente, siendo ligeramente superior en el caso de la actividad antioxidante (27–41 mg/g piel de cebolla).

Los valores medios de retención o rechazo (R) se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_r} \quad (3)$$

El cálculo de la concentración en el retenido de los compuestos de interés se realizó mediante balances de materia utilizando la siguiente ecuación:

$$C_r = \frac{C_A V_A - C_p V_p}{V_r} \quad (4)$$

donde C es la concentración y V el volumen, indicando los subíndices A, p y r las corrientes de alimentación, permeado y retenido, respectivamente.

En la Figura 3 se muestra la retención o rechazo (R) de los diferentes compuestos por parte de la membrana de nanofiltración. Como puede observarse, la pérdida de compuestos de interés y su variación con el FCV es mínima para los fenoles y los flavonoides (inferior al 8% y al 3%, respectivamente), y ligeramente superior en el caso de la actividad antioxidante (12–19%).

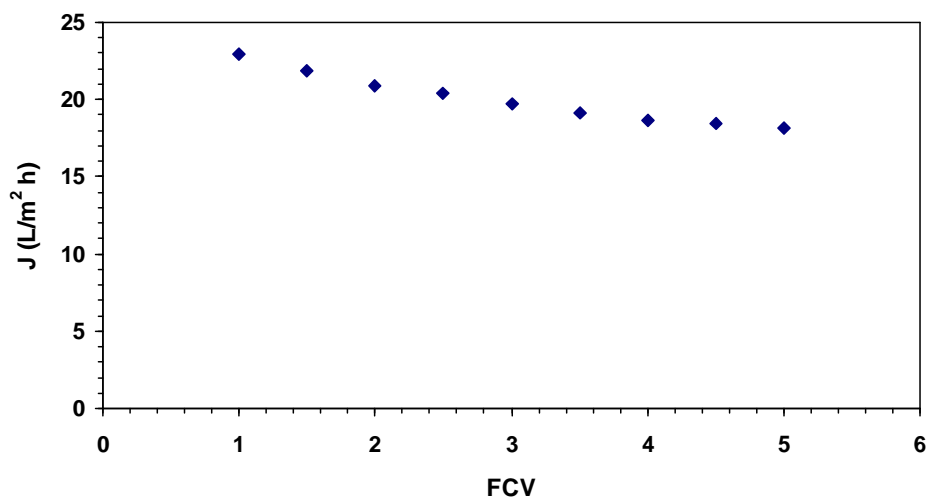


Figura 1. Variación de la densidad de flujo de permeado (J) con el factor de concentración en volumen (FCV) durante la NF del extracto de piel de cebolla utilizando la membrana NF270, a 25 bar, 30 °C y 300 rpm.

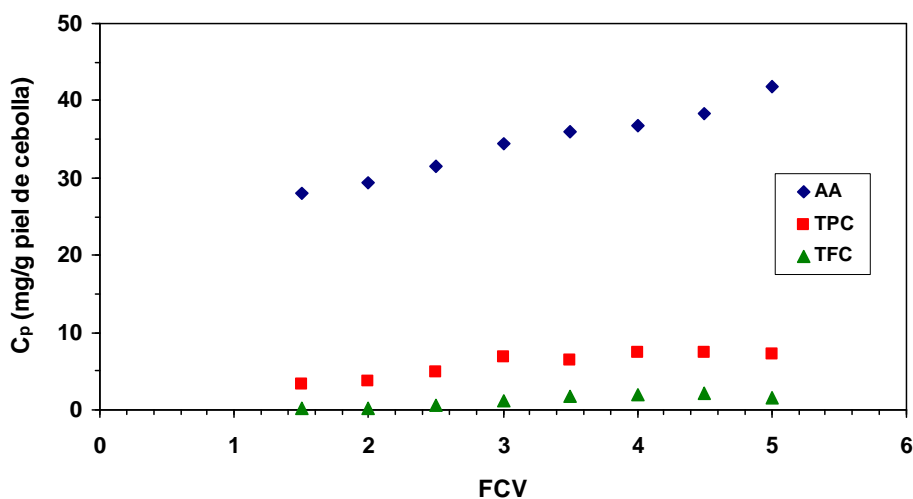


Figura 2. Variación de la actividad antioxidante (AA, mg FeSO₄/g) y de la concentración de fenoles (TPC, mg GAE/g) y flavonoides totales (TFC, mg QE/g) en el permeado con el factor de concentración en volumen (FCV) durante la NF del extracto de piel de cebolla utilizando la membrana NF270, a 25 bar, 30 °C y 300 rpm.

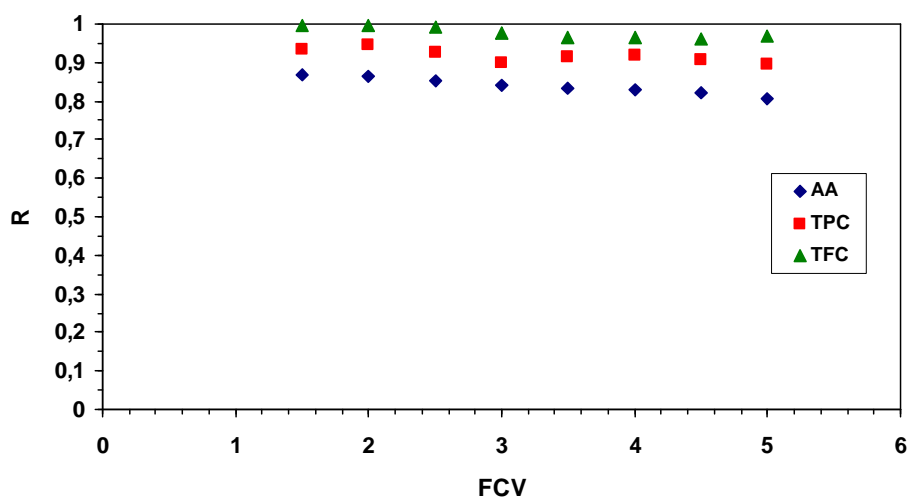


Figura 3. Variación de la retención de la actividad antioxidante (AA) y de la concentración de fenoles (TPC) y flavonoides totales (TFC) con el factor de concentración en volumen (FCV) durante la NF del extracto de piel de cebolla utilizando la membrana NF270, a 25 bar, 30 °C y 300 rpm.

Mediante nanofiltración del extracto bajo las condiciones de operación óptimas se ha alcanzado un FCV de 5 en un tiempo aproximado de 6 horas, lo que quiere decir que se consiguió concentrar cinco veces el extracto inicial, disminuyendo un 80% su volumen, con una mínima pérdida de compuestos de interés, obteniendo 50 mL de concentrado final con una recuperación del 85,6% de la actividad antioxidante y el 95% y 98% de la concentración de fenoles y flavonoides totales, respectivamente, del extracto inicial.

Otra parte del extracto etanólico obtenido inicialmente (320 mL) se concentró mediante evaporación a vacío, operando en el rotavapor a 30 °C, 150 rpm y 90 mbar de presión. Se obtuvo un volumen final de 82 mL de extracto concentrado (FCV = 3,9) después de 18 horas de operación. Este extracto se congeló a -80 °C durante al menos 12 horas antes de proceder a su liofilización a una presión de $1,5 \cdot 10^{-4}$ bar durante 48 horas, obteniendo 2,38 g de extracto liofilizado.

También se procedió a la liofilización del concentrado obtenido mediante nanofiltración, con el fin de poder comparar ambos procesos. En este caso se mezclaron 37 mL del concentrado con 37 mL de agua Milli-Q para proceder a la eliminación previa del etanol mediante evaporación a vacío bajo las mismas condiciones de operación mencionadas anteriormente, obteniendo 39 mL de concentrado final (FCV = 1,9) después de 1,5 horas de operación. Este concentrado también se congeló a -80 °C durante al menos 12 horas antes de proceder a su liofilización a una presión de $1,5 \cdot 10^{-4}$ bar durante 48 horas, obteniendo 1,17 g de extracto liofilizado. Se puede comprobar que la etapa de preconcentración del extracto mediante nanofiltración permite acortar aproximadamente 10 horas el tiempo de operación del proceso y reducir el gasto energético asociado a la evaporación a vacío.

Posteriormente se realizó una reconstitución de ambos extractos liofilizados, redisolviendo 50 mg de extracto liofilizado en 10 mL de mezcla hidroalcohólica (70% en volumen de etanol), con la finalidad de comparar sus propiedades con las del extracto inicial. Esta comparación se muestra en la Tabla 2, donde se comprueba que el extracto liofilizado obtenido a partir del concentrado de nanofiltración presenta una

mayor capacidad antioxidante y más concentración de flavonoides y compuestos fenólicos totales que el extracto liofilizado obtenido a partir del concentrado mediante evaporación a vacío.

Tabla 2. Características del extracto inicial de piel de cebolla y los liofilizados finales a partir de los concentrados obtenidos mediante evaporación a vacío y nanofiltración.

	AA (mg FeSO ₄ /g piel de cebolla)	TPC (mg GAE/g piel de cebolla)	TFC (mg QE/g piel de cebolla)
Extracto inicial	195,01±11,68	71,20±3,06	60,02±1,53
Extracto liofilizado después de evaporación a vacío	1662,51±150,44	462,71±28,37	399,57±10,27
Extracto liofilizado después de nanofiltración	2040,97±37,41	467,24±21,86	429,01±18,32

Los cromatogramas de ambos extractos liofilizados son muy similares (Figura 4), siendo la quercetina y sus derivados glucosilados los principales componentes (Tabla 3), seguidos del ácido protocatéquico y el ácido p-cumárico, resultados similares a los observados en la bibliografía (Gómez Juaristi, 2015).

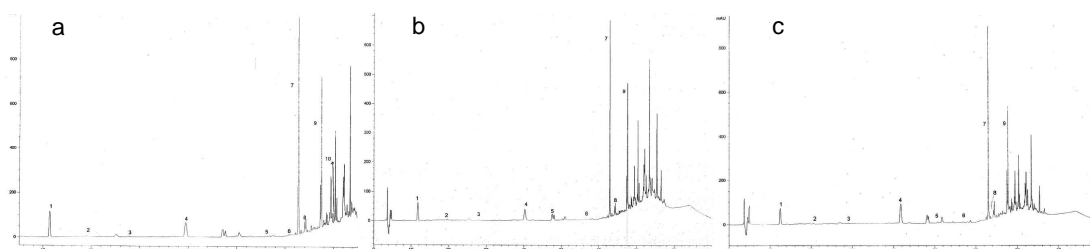


Figura 4. Cromatogramas del extracto inicial (a) y los extractos liofilizados después de evaporación a vacío (b) y nanofiltración (c), con algunos de los compuestos identificados.

Tabla 3. Concentración de los compuestos fenólicos identificados en los cromatogramas mostrados en la Figura 4.

Compuesto	Extracto inicial (mg/g piel de cebolla)	Extracto liofilizado después de evaporación a vacío (mg/g liofilizado)	Extracto liofilizado después de nanofiltración (mg/g liofilizado)
1 Ácido protocatéquico	1,224	8,740	9,645
2 Ácido p-hidroxibenzoico	0,226	2,097	2,155
3 Ácido vainillínico	0,018	0,035	0,040
4 Ácido p-cumárico	0,564	2,827	7,085
5 Quercetina 3,4'-diglucósido	0,912	4,298	0,933
6 Quercetina 3-glucósido	0,161	1,377	1,715
7 Quercetina 4'-glucósido	7,588	51,335	61,357
8 Miricetina	0,426	2,251	2,115
9 Quercetina	3,789	20,092	23,381

4.2. RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE HOJAS DE OLIVO

Los experimentos de extracción se realizaron en este caso utilizando una mezcla hidroalcohólica metanol-agua (90% en volumen de metanol) como disolvente, bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura de 36 °C, velocidad de agitación de 150 rpm y relación masa/volumen de 0,153 g hojas de olivo/mL de disolvente, durante un tiempo de extracción de 12 horas.

Se procedió a la extracción de los compuestos fenólicos presentes en 76,6 g de hojas de olivo secas y molidas utilizando un volumen de disolvente de 500 mL. El extracto obtenido se sometió a una filtración a vacío con el fin de separar las partículas sólidas. Se obtuvo un volumen de extracto de 350 mL, con una capacidad antioxidante de $0,304 \pm 0,007$ mg Trolox/g hojas de olivo y una concentración de fenoles totales (TPC) de $34,96 \pm 0,46$ mg GAE/g hojas de olivo, el cual se guardó en botes de vidrio color topacio para evitar la fotooxidación de sus componentes y se conservó en congelación a -18 °C hasta su uso posterior.

Antes de proceder al concentrado del extracto mediante nanofiltración se realizó una serie de experimentos para seleccionar la membrana más adecuada y las condiciones de operación óptimas. Se estudiaron las condiciones de operación del proceso de nanofiltración utilizando tres tipos de membranas orgánicas de diferente composición y umbral de corte: TS40 (200 Da), NF270 (270 Da) y NP010 (500-600 Da). Todas las membranas nuevas se preacondicionaron con agua Milli-Q antes de su uso, bajo las condiciones indicadas en el apartado 3.4.3.1.

Para seleccionar la temperatura de operación óptima se realizaron, para cada una de las 3 membranas utilizadas, experimentos de variación de la densidad de flujo de permeado a 20 °C y a 30 °C, para presiones comprendidas entre 10 y 40 bar, utilizando como alimentación el disolvente utilizado en el proceso de extracción (mezcla metanol-agua con un 90% en volumen de metanol) y operando siempre con una velocidad de agitación sobre la superficie de la membrana de 300 rpm.

Los resultados, mostrados en la Figura 5 para las membranas NF270 y NP010, indican una relación lineal de J con la presión de operación, siendo siempre superior a 30 °C que a 20 °C para las tres membranas: un 20% superior para la membrana NF270, un 12% superior para la membrana TS40 y hasta un 67% superior para la membrana NP010. Se seleccionó por tanto la temperatura de 30 °C para todos los experimentos posteriores.

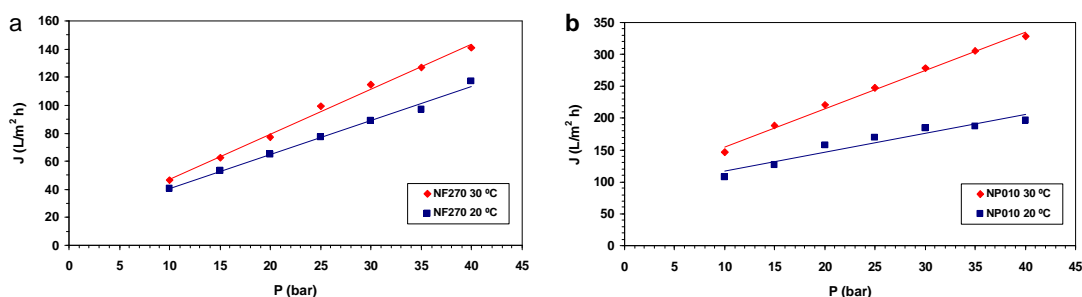


Figura 5. Variación de la densidad de flujo de permeado con la presión de operación para la nanofiltración de la mezcla hidroalcohólica (90% en volumen de metanol) a diferentes temperaturas (20 y 30 °C) y 300 rpm utilizando las membranas NF270 (a) y NP010 (b).

A continuación se realizaron experimentos de nanofiltración a 30 °C con las tres membranas, utilizando como alimentación una disolución sintética de 10 mg/L de oleuropeína (principal compuesto fenólico presente en las hojas de olivo) en una mezcla hidroalcohólica metanol-agua al 90% (v/v). Se determinó nuevamente la variación de J ($\rho_p = 825,8 \text{ kg/m}^3$) a diferentes presiones de operación (10-40 bar), midiendo la concentración de oleuropeína en la alimentación y los permeados mediante espectrofotometría. Los resultados mostrados en la Figura 6 indican la presencia de dos zonas bien diferenciadas: una zona inicial de control por presión, donde J aumenta al aumentar la presión de operación, y una zona de control por polarización por concentración, que se inicia a partir de una presión de operación de 20-25 bar, en la cual la capa de polarización está completamente desarrollada y un aumento de la presión no conlleva una mejora en J . La retención de oleuropeína fue del 72% para la membrana NF270, 77% para la membrana TS40, y únicamente del 30% para la membrana NP010, debido a su mayor umbral de corte.

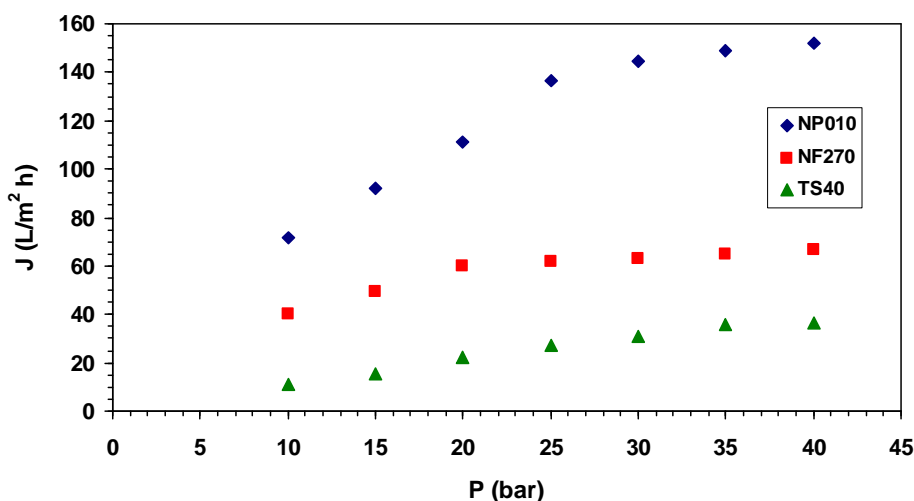


Figura 6. Variación de la densidad de flujo de permeado con la presión de operación para la nanofiltración de la disolución sintética de oleuropeína (10 mg/L) a 30 °C y 300 rpm utilizando las tres membranas.

Basándose en estos resultados, se seleccionó la membrana NF270 para el resto de los experimentos, ya que, pese a presentar una retención de oleuropeína ligeramente menor que la membrana TS40, su densidad de flujo de permeado a la presión de operación óptima (20 bar) es casi tres veces superior (60 frente a 22 L/m² h).

Para comprobar la idoneidad de la membrana NF270 seleccionada, se realizó un experimento de concentración de 250 mL de una disolución sintética de oleuropeína bajo las condiciones de temperatura y presión de operación óptimas (30 °C y 20 bar), hasta alcanzar un FCV = 5. Como puede verse en la Figura 7, este experimento de concentración duró 97 min manteniendo una densidad de flujo de permeado relativamente estable de 86 L/m² h, con una retención final de oleuropeína del 88%.

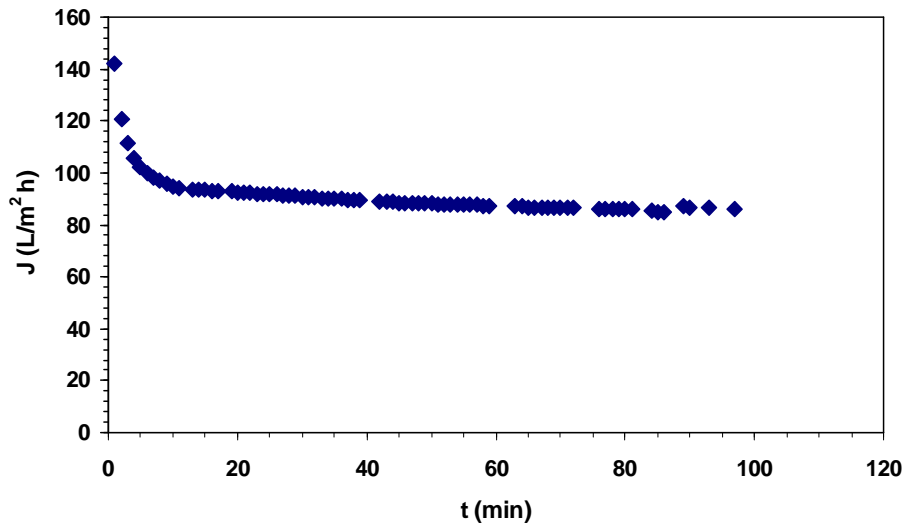


Figura 7. Variación de la densidad de flujo de permeado con el tiempo para la nanofiltración de la disolución sintética de oleuropeína (10 mg/L) a 30 °C, 20 bar y 300 rpm utilizando la membrana NF270.

Finalmente se procedió a la concentración del extracto de hojas de olivo utilizando la membrana NF270 seleccionada bajo las condiciones de operación óptimas (30 °C y 20 bar). En la primera prueba de NF se observó un rápido ensuciamiento de la membrana y un bloqueo total de los poros de la misma (Figura 8), debido al contenido en sólidos y materia coloidal del extracto, incluso después de filtrarlo a vacío, probablemente debido al elevado grado de extracción de compuestos clorofílicos de las hojas de olivo, obteniendo un FCV < 1,2.

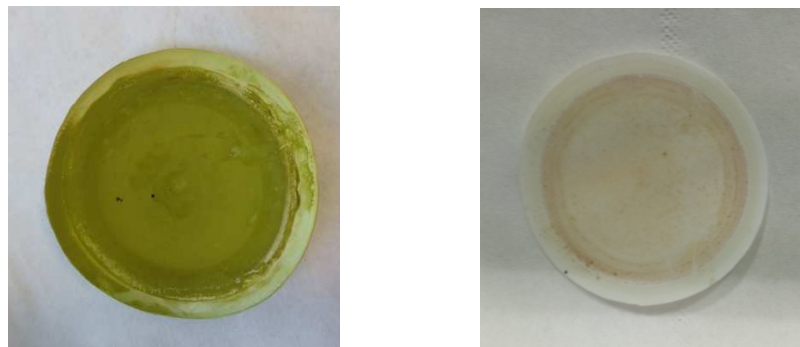


Figura 8. Fotografía de la membrana NF270 después del proceso de concentración del extracto de hojas de olivo (izquierda) y comparación con la misma membrana utilizada para la concentración del extracto de piel de cebolla (derecha).

Para intentar minimizar el problema del ensuciamiento de la membrana de NF se centrifugó el extracto a 3000 rpm durante 1 h (centrífuga Eppendorf 5804) y se filtró el sobrenadante utilizando filtros de jeringa Millex (Merck-Millipore) de 0,45 µm. Este extracto se sometió a una ultrafiltración (UF) como etapa previa a la nanofiltración.

La ultrafiltración (UF) es un proceso similar a la nanofiltración, en el que se utilizan membranas cerámicas o membranas poliméricas asimétricas con tamaños de poro

comprendidos entre 0,05 y 0,2 μm y presiones de operación entre 1 y 10 bar (Hernández y col., 1990). La finalidad de la UF en este caso es eliminar la mayor parte de los sólidos y materia coloidal nanométrica presentes en el extracto y facilitar el posterior proceso de concentración del permeado de UF mediante NF.

La UF del extracto de hojas de olivo se realizó utilizando las membranas ST y US100 (ver Tabla 1), previamente acondicionadas, a 30 °C, una presión de operación de 7 bar y una velocidad de agitación de 300 rpm. La membrana de mayor umbral de corte (US100, 100000 Da) también sufrió una disminución de J muy importante debido al bloqueo interno de sus poros, por lo que se seleccionó la membrana ST (10000 Da) para la etapa previa de UF.

En la etapa de UF se alimentaron 150 mL de extracto y se operó a 30 °C y 7 bar durante aproximadamente 6 horas hasta alcanzar un FCV = 2. El permeado obtenido en la UF (77 mL) se utilizó como alimentación de la etapa de NF con la membrana NF270 a 30 °C y 7 bar. En este caso el pretratamiento mediante UF disminuyó el ensuciamiento de la membrana de NF, pero nuevamente se produjo el bloqueo total de los poros de la misma antes de las 2 horas de operación (Figura 9), obteniendo un FCV < 1,5. En la Figura 10 puede observarse el aspecto del concentrado y del permeado final obtenidos después de la NF.

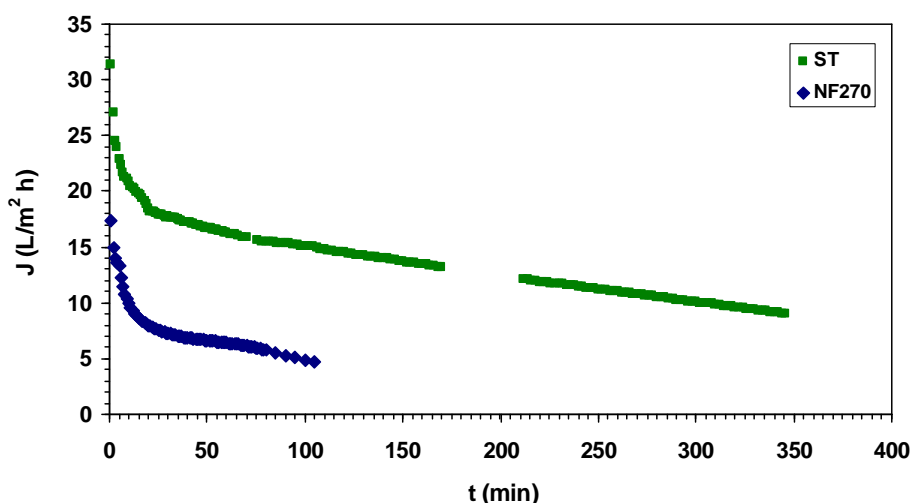


Figura 9. Variación de la densidad de flujo de permeado con el tiempo para la ultrafiltración del extracto de hojas de olivo con la membrana ST (7 bar, 30 °C, 300 rpm) y la nanofiltración, utilizando la membrana NF270 (20 bar, 30 °C, 300 rpm), del permeado obtenido en el proceso de ultrafiltración.



Figura 10. Fotografía del concentrado (izquierda) y permeado (derecha) obtenidos después de la nanofiltración del permeado de UF del extracto de hojas de olivo.

El proceso de concentración no se pudo completar debido al colmataje de la membrana, por lo que en estas condiciones no es viable llevar a cabo un proceso de concentración mediante nanofiltración con dicho extracto de hojas de olivo.

En la Tabla 4 se comparan las propiedades del extracto de hojas de olivo y de los concentrados finales de los procesos de UF y NF, así como del permeado de NF. Se puede comprobar que prácticamente la totalidad de los compuestos fenólicos se recuperan en los concentrados, y en un mayor porcentaje en el concentrado del proceso de ultrafiltración.

Tabla 4. Características del extracto inicial de hojas de olivo, el concentrado de ultrafiltración y el permeado y concentrado final obtenido mediante nanofiltración.

	AA (mg Trolox/g hojas de olivo)	TPC (mg GAE/g hojas de olivo)
Extracto inicial	0,304±0,007	34,96±0,46
Concentrado de UF	0,551±0,005	62,78±1,52
Permeado de NF	0,012±0,002	1,44±0,26
Concentrado de NF	0,126±0,002	19,72±0,33

Los cromatogramas del extracto inicial y del concentrado de UF son muy similares (Figura 11), siendo la oleuropeína el principal componente (Tabla 5), seguido del derivado glucosilado de la luteolina y del verbascósido, resultados similares a los observados en la bibliografía (Cádiz Gurrea, 2018).

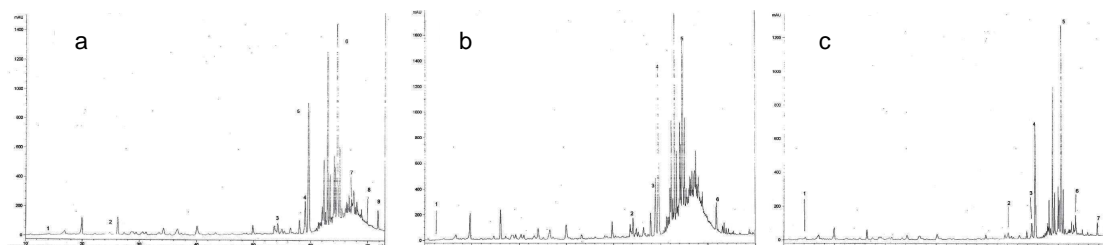


Figura 11. Cromatogramas del extracto inicial (a) y los concentrados de ultrafiltración (b) y nanofiltración (c), con algunos de los compuestos identificados.

Tabla 5. Concentración de los compuestos fenólicos identificados en los cromatogramas mostrados en la Figura 11.

Compuesto	Extracto inicial (mg/g hojas de olivo)	Concentrado de ultrafiltración (mg/g hojas de olivo)	Concentrado de nanofiltración (mg/g hojas de olivo)
1 Hidroxitirosol	0,167	0,861	0,886
2 Ácido clorogénico	0,179	---	---
3 Rutina	0,344	0,610	0,269
4 Verbascósido	1,775	3,270	0,739
5 Luteolina 7-glucósido	3,529	5,542	2,490
6 Oleuropeína	17,263	22,123	13,487
7 Luteolina	0,121	---	0,172
8 Apigenina	0,032	---	---
9 Naringenina	0,325	0,548	0,186

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha estudiado la viabilidad técnica de un proceso combinado con membranas para la recuperación de quercetina y otros compuestos fenólicos de pieles de cebolla roja generadas como subproducto del proceso de producción de Morcilla de Burgos en la empresa *Embutidos de Cardaña S.L.*, así como de oleuropeína y otros compuestos fenólicos presentes en hojas de olivo de la variedad *Serrana de Espadán*, suministradas por la cooperativa castellonense *Pagos de Benaval*.

La extracción de quercetina se realizó durante 1 hora a 35 °C y una velocidad de agitación de 255 rpm, utilizando una disolución acuosa de etanol (70% en volumen) como disolvente, con una relación de 0,053 g de piel de cebolla/mL de disolvente. Se obtuvo un extracto con una capacidad antioxidante de $195,01 \pm 11,68$ mg FeSO₄/g piel de cebolla, una concentración de fenoles totales (TPC) de $71,20 \pm 3,06$ mg GAE/g piel de cebolla y una concentración de flavonoides totales (TFC) de $60,02 \pm 1,53$ mg QE/g piel de cebolla. Una parte del extracto obtenido se concentró mediante evaporación a vacío (90 mbar, 30 °C y 150 rpm) para eliminar el disolvente, obteniendo un factor de concentración en volumen (FCV) de 3,9 después de 18 horas de operación. Otra parte se preconcentró mediante nanofiltración en una celda agitada de alta presión, utilizando una membrana polimérica plana NF270 con un corte molecular de 270 Da, bajo las condiciones de operación óptimas (25 bar, 30 °C, 300 rpm), alcanzando un FCV = 5 en un tiempo aproximado de 6 horas, con una mínima pérdida de compuestos de interés y una recuperación del 85,6% de la actividad antioxidante y el 95% y 98% de la concentración de fenoles y flavonoides totales, respectivamente, del extracto inicial. El extracto liofilizado obtenido a partir del concentrado de nanofiltración presentó una mayor capacidad antioxidante y más concentración de flavonoides y compuestos fenólicos totales que el extracto liofilizado obtenido a partir del concentrado mediante evaporación a vacío. Ambos extractos liofilizados mostraron cromatogramas muy similares, siendo la quercetina y sus derivados glucosilados los principales componentes, seguidos del ácido protocatéquico y el ácido p-cumárico. Además, se comprobó que la etapa de preconcentración del extracto mediante nanofiltración antes de su evaporación a vacío permitió acortar aproximadamente 10 horas el tiempo de operación del proceso y reducir el gasto energético asociado a la evaporación a vacío.

La extracción de oleuropeína de las hojas de olivo se realizó durante 12 horas a 36 °C y una velocidad de agitación de 150 rpm, utilizando una disolución acuosa de metanol (90% en volumen) como disolvente, con una relación de 0,153 g de hojas de olivo/mL de disolvente, obteniendo un extracto con una capacidad antioxidante de $0,304 \pm 0,007$ mg Trolox/g hojas de olivo y una TPC de $34,96 \pm 0,46$ mg GAE/g piel de cebolla. La concentración del extracto se realizó mediante nanofiltración, utilizando una membrana NF270 a 20 bar, 30 °C y 300 rpm; el proceso no pudo completarse por el colmataje de la membrana, incluso utilizando un pretratamiento de ultrafiltración, debido al elevado grado de extracción de compuestos clorofílicos de las hojas de olivo, obteniéndose tras 2 horas de operación un FCV < 1,5 y la recuperación de prácticamente la totalidad de los compuestos fenólicos en el concentrado final. Los cromatogramas del extracto inicial y del concentrado de ultrafiltración fueron muy similares, siendo la oleuropeína el principal componente, seguido del derivado glucosilado de la luteolina y del verbascósido. Sin embargo, bajo las condiciones de operación estudiadas en el presente trabajo, no es viable técnicamente llevar a cabo un proceso de preconcentración del extracto de hojas de olivo mediante nanofiltración. No obstante, la composición del concentrado de ultrafiltración obtenido abre la posibilidad de un futuro estudio de este proceso como método de preconcentración del extracto de hojas de olivo utilizando diferentes condiciones de operación o seleccionando nuevas membranas comerciales.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad-Qasem Mateo, M.H. (2015) "Assessment of the influence of processing conditions on the antioxidant potential of extracts obtained from olive oil industry byproducts". Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/53452> (última consulta: 15 de mayo de 2020).

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay", *Analytical Biochemistry* 239, 70–76.

Borska, S., Drag-Zalesinska, M., Wysocka, T., Sopel, M., Dumanska, M., Zabel, M., Dziegiel, P. (2010). "Antiproliferative and pro-apoptotic effects of quercetin on human pancreatic carcinoma cell lines EPP85-181P and EPP85-181RDB", *Folia Histochemica et Cytobiologica* 48, 222–229.

Caballero, A.S., Romero-García, J.M., Castro, E., Cardona, C.A. (2020). "Supercritical fluid extraction for enhancing polyphenolic compounds production from olive waste extracts", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 95, 356–362.

Cádiz Gurrea, M.L. (2018). "Caracterización, purificación y evaluación de la bioactividad de fitoquímicos obtenidos de fuentes naturales". Tesis Doctoral, Universidad de Granada. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10481/50916> (última consulta: 7 de mayo de 2020).

Castro-Muñoz, R., Yáñez-Fernández, J., Fila, V. (2016). "Phenolic compounds recovered from agro-food by-products using membrane technologies: an overview", *Food Chemistry* 213, 753–762.

Cavaca, L.A.S., López-Coca, I.M., Silvero, G., Afonso, C.A.M. (2020). "The olive-tree leaves as a source of high-added value molecules: oleuropein", *Studies in Natural Products Chemistry* 64, 131–180.

Chacón-Villalobos, A. (2006). "Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea", *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 243–264.

Choi, I.S., Cho, E.J., Moon, J.-H., Bae, H.-J. (2015). "Onion skin waste as a valorization resource for the by-products quercetin and biosugar", *Food Chemistry* 188, 537–542.

Dascalu, M.-E. (2018). "Estudio comparativo entre membranas de nanofiltración y de ósmosis inversa para el tratamiento eficiente del agua". Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/53452> (última consulta: 15 de mayo de 2020).

Downes, K., Chope, G.A., Terry, L.A. (2010). "Postharvest application of ethylene and 1-methylcyclopropene either before or after curing affects onion (*Allium cepa* L.) bulb quality during long term cold storage", *Postharvest Biology and Technology* 55, 36–44.

Fajardo-Romero, A., Arroyo-Rivera, Á. Ramírez-Navas, J.S. (2016). "Extracción de flavonoides totales de la envoltura externa de cebolla roja (*Allium cepa*)", *UGCiencia* 22, 119–126.

Fuentes, J., Arias-Santé, M.F., Atala, E., Pastene, E., Kogan, M.J., Speisky, H. (2020). "Low nanomolar concentrations of a quercetin oxidation product, which naturally occurs in onion peel, protect cells against oxidative damage", *Food Chemistry* 314, 126166.

Girard, B., Fukumoto, L.R. (2000). "Membrane processing of fruit juices and beverages: a review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40, 91–157.

Gómez Juaristi, M. (2015). "Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudios de transporte *in vitro* y de biodisponibilidad en humanos". Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/33529/> (última consulta: 14 de mayo de 2020).

Hernández, A., Tejerina, F., Arribas, J.I., Martínez, L., Martínez, F. (1990). "Microfiltración, Ultrafiltración y Ósmosis Inversa", Secretariado de Publicaciones, Universidad de Murcia, Murcia.

Kelly, G.S. (2011). "Quercetin", *Alternative Medicine Review* 16, 172–194.

Manahan, S.E. (2006). "Introducción a la Química Ambiental", Ed. Reverté, Barcelona, p. 220.

Patel, A.R., Heussen, P.C.M., Hazekamp, J., Drost, E., Velikov, K.P. (2012). "Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium", *Food Chemistry* 133, 423–429.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237.

Rebolleda, S., Sanz, M.T., Benito, J.M., Beltrán, S., Escudero, I., González San José, M.L. (2015). "Formulation and characterisation of wheat bran oil-in-water nanoemulsions", *Food Chemistry* 167, 16–23.

Rivero Pérez, M.D., Muñiz, P., González San José, M.L. (2007). "Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5476–5483.

Sahin, S., Bilgin, M. (2017). "Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review", *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98, 1271–1279.

Saplontai-Pop, A., Mot, A., Moldovan, M., Oprean, R., Silaghi-Dumitrescu, R., Orasan, O., Parvu, M., Gal, E., Ionescu, C. (2015). "Testing antiplatelet and antioxidant activity of the extract of seven varieties of *Allium cepa* L", *Open Life Sciences* 10, 89–98.

Soleimanifar, M., Jafari, S.M., Assadpour, E. (2020). "Encapsulation of olive leaf phenolics within electrosprayed whey protein nanoparticles; production and characterization", *Food Hydrocolloids* 101, 105572.

Stamatopoulos, K., Chatzilazarou, A., Katsoyannos, E. (2014). "Optimization of multistage extraction of olive leaves for recovery of phenolic compounds at moderated temperatures and short extraction times", *Foods* 3, 66–81.

Zeman, L.J., Zydney, A.L. (1996). "Microfiltration and Ultrafiltration. Principles and Applications", Marcel Dekker, New York, pp. 3–48.