



UNIVERSIDAD DE BURGOS

FACULTAD DE CIENCIAS

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

***ESTUDIO DE RECUPERACIÓN DE ANTIOXIDANTES
PRESENTES EN LA HOJA DE OLIVO***

**MÁSTER EN SEGURIDAD Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS
TRABAJO FIN DE MÁSTER**

RAQUEL GÓMEZ RUBIO

**Realizado en el Área de Ingeniería Química
Tutores:
José Manuel Benito Moreno
María Isabel Escudero Barbero**

Julio 2020



AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO: 2019/2020

Dña. María Isabel Escudero Barbero y D. José Manuel Benito Moreno, Directora y Co-director del Trabajo fin de Máster de Dña. Raquel Gómez Rubio, que lleva por título

ESTUDIO DE RECUPERACIÓN DE ANTIOXIDANTES PRESENTES EN LA HOJA DE OLIVO

Autorizan No autoriza

A defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, a 16 de Julio de 2020

Fdo.: María Isabel Escudero Barbero

Fdo.: José Manuel Benito Moreno

AUTORIZACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER AL REPOSITORIO (RIUBU)

Dña. Raquel Gómez Rubio y

Dña. María Isabel Escudero Barbero y D. José Manuel Benito Moreno, autor y Directores del Trabajo fin de Máster, 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 16 de Julio de 2020

Fdo. Raquel Gómez Rubio

Fdo. María Isabel Escudero Barbero

Fdo. José Manuel Benito Moreno

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 con base en 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

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Compuestos presentes en la hoja de olivo	2
1.2. Perfil fenólico de las hojas de olivo por HPLC.....	4
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO	8
2.1. Objetivo general	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. ANTECEDENTES	9
3.1. Extracción de compuestos fenólicos de hojas de olivo	9
3.1.1. Secado de las hojas de olivo.....	9
3.1.2. Extracción.....	10
3.2. Aprovechamiento de los extractos	12
4. PARTE EXPERIMENTAL	13
4.1. Materiales y métodos.....	13
4.2. Membranas.....	14
4.3. Métodos analíticos.....	14
4.3.1. Cuantificación de compuestos de interés.....	14
4.4. Equipos y procedimiento experimental.....	15
4.4.1. Preparación de la muestra.....	15
4.4.2. Extracción sólido-líquido.....	15
4.4.3. Decoloración del extracto con carbón activado y ultrafiltración.....	15
4.4.4. Concentración del extracto mediante nanofiltración.....	16
4.4.5. Obtención de extractos secos mediante liofilización.....	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
6. CONCLUSIONES.....	21
BIBLIOGRAFÍA	22

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado el interés que presentan las hojas de olivo en cuanto a su potencial aprovechamiento como fuente de antioxidantes naturales. El estudio que se presenta contiene una primera parte basada en la bibliografía publicada sobre el comportamiento y el perfil fenólico de este subproducto y en los métodos más utilizados para la obtención de los extractos. Como consecuencia de esta revisión bibliográfica, se propone realizar un trabajo experimental que, basado en un estudio previo, utiliza como disolvente agua. El objetivo que se pretende al utilizar agua como agente de extracción es reducir la presencia de compuestos coloreados presentes en la clorofila de las hojas, los cuales son altamente solubles en disolventes alcohólicos, de uso generalizado en la obtención de extractos. Además, en el estudio experimental realizado en este trabajo y con el fin de obtener extractos exentos de color, se ha llevado a cabo el tratamiento de los extractos acuosos mediante un proceso combinado de adsorción con carbón activado y ultrafiltración con membranas, seguido de una etapa de concentración mediante nanofiltración. La extracción con agua y el posterior tratamiento con membranas proporciona extractos acuosos concentrados, ricos en compuestos antioxidantes hidrosolubles como oleuropeína e hidroxitirosol, listos para ser liofilizados y obtener extractos secos y estables para su conservación y posterior uso como ingredientes alimentarios. La principal ventaja de esta propuesta tecnológica es la sustitución de la etapa de evaporación a vacío, etapa lenta y de elevado consumo energético, por tecnologías limpias con membranas, y la obtención de extractos estables y sin color. Debido a las circunstancias del estado de alarma por la pandemia del coronavirus, la experimentación realizada no se ha podido concluir, por lo que tan solo se presentan en este trabajo conclusiones parciales que, sin embargo, pueden proporcionar una orientación para futuros estudios.

Palabras clave: Extracción de antioxidantes naturales, hidroxitirosol, oleuropeína, hojas de olivo, membranas, carbón activado.

1. INTRODUCCIÓN

Los subproductos y desechos del procesado de alimentos vegetales representan un problema ambiental importante en los países mediterráneos, y son fuentes de compuestos bioactivos de valor agregado llamados fitoquímicos o metabolitos secundarios.

Entre estos subproductos se encuentran las hojas de olivo (subproductos del cultivo del olivo y de las almazaras), generadas principalmente en la poda de los árboles durante la cosecha y procesado de las aceitunas [1], representando alrededor del 10% del total del peso de las aceitunas que llegan al molino.

Antiguamente, las hojas de olivo se usaron como alimento para animales, donde se comprobaron efectos saludables al reducir la presión arterial y aumentar el flujo sanguíneo en las arterias coronarias, aliviando la arritmia y evitando espasmos [2].

Los principales factores que influyen en la actividad antioxidante durante el almacenamiento son la temperatura y la luz. Para ello, se utilizan atmósferas controladas como el nitrógeno y la ausencia de luz [3]. También se tiene en cuenta el tiempo de almacenamiento. En este sentido se ha demostrado que la oleuropeína (compuesto bioactivo) es bastante estable en extractos de metanol durante 30 días, y

después comienza a degradarse. Sin embargo, el extracto acuoso es estable los primeros 7 días y se degrada completamente después de 17 días [4].

Existen muchos métodos para la extracción de antioxidantes de las hojas de olivo, siendo el más común la extracción con disolventes. Los disolventes más utilizados para la extracción de oleuropeína y los compuestos bioactivos de las hojas de olivo son metanol puro, mezclas metanol-agua y hexano. Sin embargo, la toxicidad de ambos disolventes limita su explotación industrial para uso humano [5].

En este contexto, se han adoptado varias técnicas para la recuperación de polifenoles de las hojas de olivo, como la aplicación de tecnologías de membrana para la separación, purificación y concentración de compuestos bioactivos de soluciones acuosas. Los procesos de membrana han sido investigados por su alta eficiencia en la concentración de compuestos fenólicos, debido a la baja temperatura de funcionamiento y consumo mínimo de energía [6].

1.1. Compuestos presentes en la hoja de olivo

En la Tabla 1 se muestra la composición química promedio de las hojas de olivo [7], considerándose una fuente natural rica en nutrientes valiosos como carbohidratos, sales minerales y proteínas.

Tabla 1. Composición química promedio de las hojas de olivo.

	Humedad (g / 100 g de hojas frescas)	Proteína (g / 100 g de hojas frescas)	Lípidos (g / 100 g de hojas frescas)	Cenizas (minerales) (g / 100 g de hojas frescas)	Carbohidratos (g / 100 g de hojas frescas)
Hoja de olivo	49,8	7,6	1,1	4,5	37,1

Los principales compuestos fenólicos presentes en la hoja de olivo se pueden agrupar en 5 categorías y son los siguientes [2]:

- Oleuropeósidos (oleuropeína y verbascósido).
- Flavonas (luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, diosmetin-7-glucósido, luteolina y diosmetin).
- Flavonoles (rutina).
- Flavan-3-oles (catequina).
- Fenoles sustituidos (tirosoles, hidroxitirosoles, vainillina, ácido vanílico, ácido cafeico).

En los compuestos fenólicos la actividad antioxidante está influenciada principalmente por el número y posición de los grupos hidroxilo libres en su estructura. En el caso de los flavonoides presentes en las hojas de olivo, la actividad antioxidante está influenciada por la presencia de grupos funcionales en su estructura, principalmente el catecol de anillo B, el grupo 3-hidroxilo y el enlace 2, 3-doble conjugado con la función 4-oxo (Figura1).

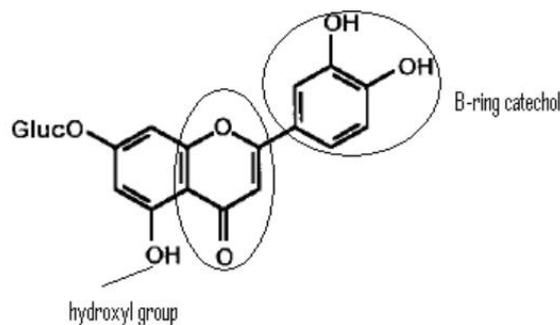


Figura 1. Estructura química de la molécula de apigenina-7-glucósido.

La oleuropeína pertenece a un grupo especial de compuestos fenólicos llamados secoiridoides que se producen a partir del metabolismo secundario de los terpenos como precursores de alcaloides indólicos [8]. La estructura química de la oleuropeína está compuesta por tres subunidades: un glucósido, un monoterpeno y el hidroxitirosol (Figura 2).

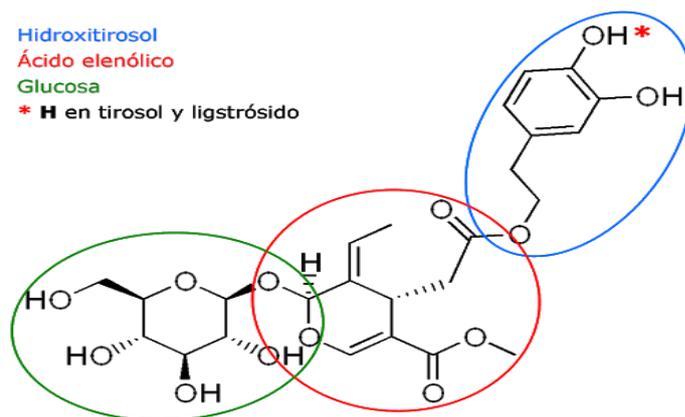


Figura 2. Estructura química de la molécula de oleuropeína.

Este compuesto tiene especial interés por su carácter antioxidante. Aporta grandes beneficios para la salud por su capacidad cardioprotectora, reduciendo la presión arterial y dilatando las arterias coronarias, ya que inhibe la oxidación del colesterol que es transportado por lipoproteínas de baja densidad (LDL). Además, hay estudios que demuestran su actividad antiinflamatoria y anticancerígeno, teniendo efectos neuroprotectores [9].

Está considerado un agente microbiano capaz de combatir a gram +, gram – y micoplasma. Es un antioxidante de gran potencia, el cual destruye radicales libres e inhibe la propagación de la oxidación. Actúa como antiinflamatorio, impidiendo el desarrollo de actividad lipoxigenasa y frena la producción de leucocitos, factores beneficiosos para enfermedades como el asma o alergias [10].

Por ello, es de gran interés la extracción de este compuesto de las hojas de los olivos, donde se encuentra en concentraciones de hasta 500 mg/g de extracto seco de hoja. La obtención de extractos de oleuropeína de hojas de olivo permite su empleo en la industria alimentaria para enriquecer alimentos o bebidas, o para ser empleados como

suplementos nutricionales. La oleuropeína se puede encontrar, aparte de en el olivo (*Olea europaea*), en otras especies de *Fraxinus*, *Syringa*, *Phillyrea* y géneros de *Ligustrum* [11].

A lo largo del proceso de maduración, la oleuropeína se transforma en hidroxitirosol, metabolito de la oleuropeína que determina la capacidad antioxidante de la molécula. El hidroxitirosol es un alcohol fenólico y uno de los derivados de la oleuropeína con buenas propiedades antioxidantes. A diferencia de la oleuropeína, que está presente en altas cantidades en frutos y hojas de olivo sin procesar, el hidroxitirosol es más abundante en frutas procesadas y en el aceite de oliva. La disminución de oleuropeína y el aumento de la concentración de hidroxitirosol ocurre debido a reacciones químicas y enzimáticas durante la maduración de la fruta o como resultado del procesado de la aceituna [12]. En la Figura 3 se muestra la estructura química del hidroxitirosol.

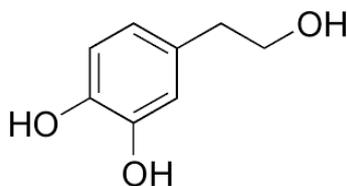


Figura 3. Estructura química de la molécula de hidroxitirosol.

El hidroxitirosol también se puede aislar agregando ácido para hidrolizar los fenoles complejos nativos en las hojas de olivo, como la oleuropeína, y su recuperación posterior mediante extracción líquido-líquido [1].

1.2. Perfil fenólico de las hojas de olivo por HPLC

El perfil fenólico de las hojas de olivo se ve afectado por varios factores agronómicos y tecnológicos, como la edad de las hojas, el grado de madurez, el origen geográfico, la forma de cultivo, la proporción de ramas en el árbol, el contenido en humedad, el grado de contaminación del suelo y los procesos industriales empleados para la extracción, afectando al contenido de oleuropeína en las hojas [13].

La oleuropeína de las hojas de olivo es muy abundante en la etapa temprana en frutos jóvenes, y disminuye rápidamente a lo largo del proceso de maduración. Esta degradación gradual de envejecimiento se debe a la enzima β -glucosidasa [14]. El color verde intenso, propio de la etapa de desarrollo, corresponde con el mayor contenido de oleuropeína y potencial antioxidante, mientras que las hojas verde-amarillentas y notablemente amarillas poseen un contenido menor de oleuropeína. Sin embargo, no está influenciada por el período de recolección, al no existir una diferencia sustancial entre las hojas recolectadas en primavera y otoño [15].

La oleuropeína es una molécula de alto interés analítico que, en su mayoría, se ha estudiado a través de técnicas cromatografías y espectroscópicas. Antes del análisis por HPLC, es necesario aislar los componentes de interés de la matriz sólida, normalmente mediante extracción con disolventes.

Para la separación de compuestos fenólicos, algunos investigadores han utilizado el método estándar externo, principalmente para la cuantificación de esos compuestos en los extractos de hoja de olivo [2]. Otros investigadores utilizaron el método estándar interno para determinar compuestos fenólicos en extracto de hoja de olivo [16],

empleando la cumarina como patrón interno para determinar la concentración de oleuropeína.

Estudios sobre la actividad antioxidante, utilizando el método de valoración del radical DPPH, muestran el siguiente orden para los compuestos fenólicos contenidos en la hoja de olivo: ácido cafeico > rutina > oleuropeína > vainillina [17].

Asimismo, se ha demostrado que los flavonoides presentes en la hoja de olivo contribuyen un 13-27% a la capacidad antioxidante de los extractos, siendo el luteolin-7-glucósido uno de los flavonoides más activos. En general, se ha demostrado una correlación directa entre la capacidad antioxidante de los extractos de hojas y el contenido total de fenoles [18].

En la Tabla 2 y en la Figura 4 se muestra el resultado de la composición de los extractos de hoja de olivo, utilizando como disolvente un 80% de etanol acuoso, valorados por cromatografía líquida HPLC-DAD [19]. La detección se registró a 245 nm, 280 nm, 330 nm, 340 nm y 350 nm. Un total de 15 compuestos fueron identificados, siendo los compuestos más abundantes la oleuropeína (pico 8) con un 44,31% del contenido fenólico total, seguida de luteolin-4-O-glucósido (pico 9) con un 12,63%, luteolin-7-O-glucósido (pico 7) con un 11,72%, apigenina-7-O-glucósido (pico 10) con un 8,85% y rutina (pico 6) con un 8,24% del contenido fenólico total. Los compuestos fenólicos vainillina, ácido o-cumárico y ácido p-cumárico están presentes en cantidades traza. Los picos (16, 17, 18) detectados en los extractos no fueron identificados.

Tabla 2. Tiempo de retención y concentración de los principales compuestos fenólicos presentes en extractos de hoja de olivo con 80% etanol acuoso [19].

Peak no	Compound Name	Retention time (minutes)	Concentration (mg/kg dry matter)	% Absolute
1	Hydroxytyrosol	5.5	919±60	1.79
2	Tyrosol	7.3	312±8	0.61
3	Caffeic acid	10.3	75±7	0.15
4	Ferulic acid	15.7	524±19	1.02
5	Verbascoside	17.4	2406±117	4.70
6	Rutin	19.4	4221±75	8.24
7	Luteolin-7-O-glucoside	20.1	6003±63	11.72
8	Oleuropein	21.4	22708±168	44.31
9	Luteolin-4-O-glucoside	23.1	6471±209	12.63
10	Apigenin-7-O-glucoside	23.3	4537±99	8.85
11	Luteolin	27.3	820±141	1.60
12	Apigenin	30.1	2245±141	4.38
13	Vanillin	12.0		≤0.02
14	P-coumaric acid	13.6		≤0.02
15	O-coumaric acid	17.2		≤0.02
16	unknown	13		
17	unknown	14		
18	unknown	28.5		

* Concentrations are expressed as mean ±SEM (n=3), absolute% was expressed as percentage of individual phenolic compounds in the total extracts

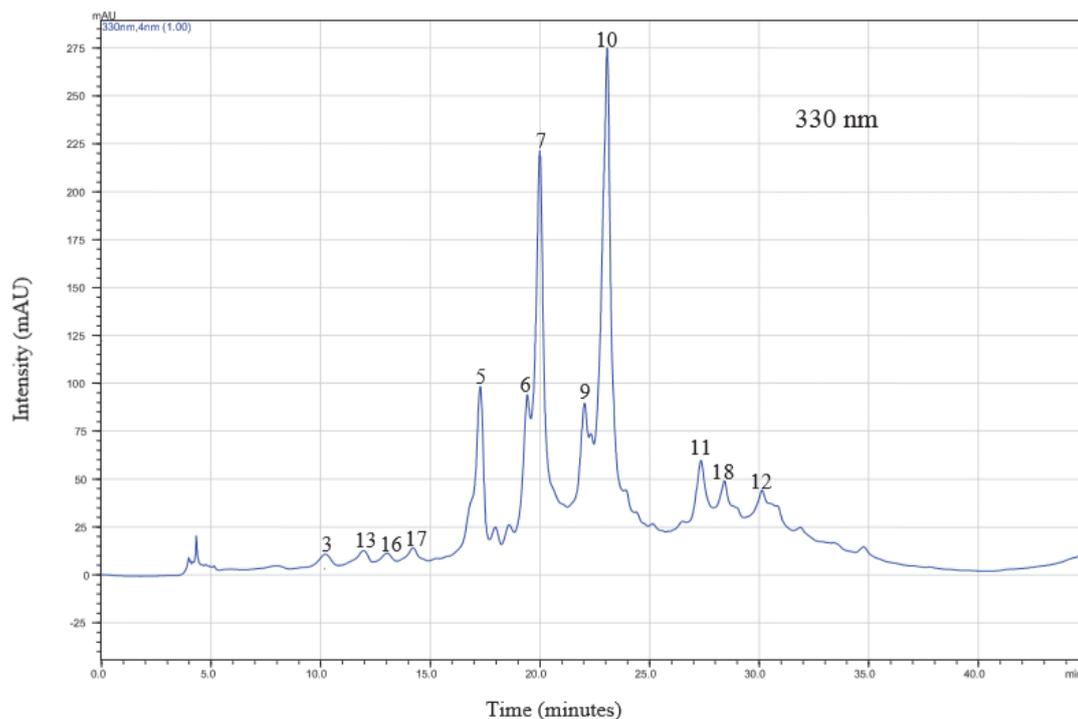
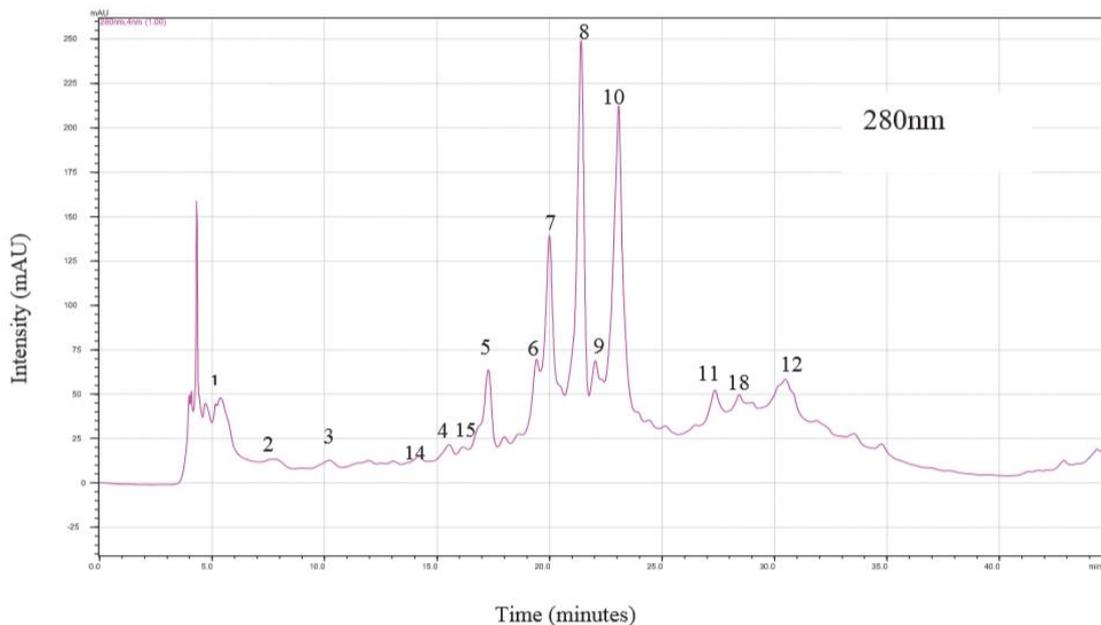


Figura 4. Perfil de HPLC del extracto de hoja de olivo (Cultivar 'Frantoio') obtenido con etanol acuoso al 80% como disolvente: relación sólido / líquido de 30 mg / mL y temperatura de $40 \pm 0,5$ °C (1) hidroxitirosol; (2) tirosol; (3) ácido cafeico; (4) ácido ferúlico; (5) verbascósido; (6) rutina; (7) luteolina 7-O-glucósido; (8) oleuropeína; (9) luteolina-4-O-glucósido; (10) apigenina 7-O-glucósido; (11) luteolina; (12) apigenina; (13) vainillina; (14) ácido p-cumárico; (15) ácido o-cumárico; (16) (17) (18) desconocido. La detección se realizó a 280 nm y 330 nm [19].

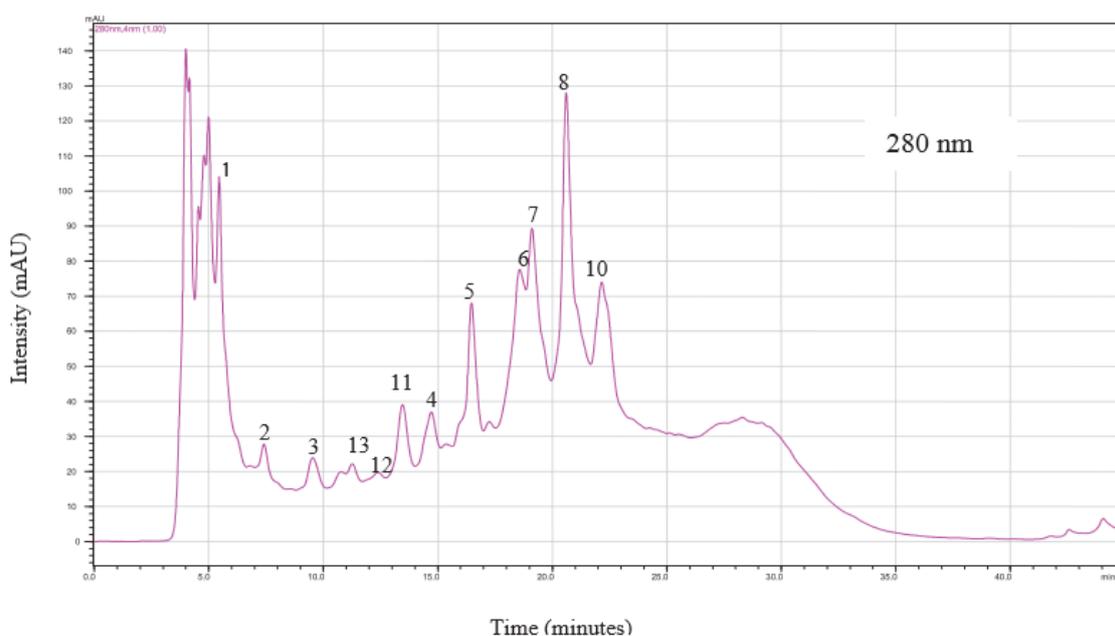
El análisis HPLC-DAD del extracto de hoja de olivo utilizando agua hirviendo [19] solo permitió la identificación de 12 compuestos fenólicos (Figura 5): hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, verbascósido, oleuropeína, luteolina 7-O-glucósido, rutina, apigenina-7-O-glucósido y luteolina 4-O-glucósido.

El extracto de hoja de olivo obtenido utilizando agua hirviendo (infusión) tuvo un perfil (Tabla 3) en el que la oleuropeína (pico 8) era el compuesto más abundante, con un 35,71% del total de compuestos identificados. El ácido cafeico fue el compuesto menos abundante, correspondiente al 0,53% del total de compuestos fenólicos. Otros compuestos fenólicos principales son luteolina 7-O-glucósido (26,21%), luteolina 4-O-glucósido (10,84%), verbascósido (6,67%) y rutina (7,33%). La vainillina se detectó en cantidad traza ($\leq 0,02\%$).

Tabla 3. Tiempo de retención y concentración de los principales compuestos fenólicos presentes en la infusión de hoja de olivo [19].

Peak no	Compound Name	Retention time (minutes)	Concentration (mg/kg dry matter)	% Absolute
1	hydroxytyrosol	5.5	411±11	1.75
2	Tyrosol	7.3	222±27	0.95
3	Caffeic acid	10.3	124±22	0.53
4	Ferulic acid	15.7	395±6	1.68
5	Verbascoside	17.4	1564±16	6.67
6	Rutin	19.4	1720±226	7.33
7	Luteolin-7-O-glucoside	20.1	6146±48	26.21
8	Oleuropein	21.4	8375±105	35.71
9	Luteolin-4-O-glucoside	23.1	2543±16	10.84
10	Apigenin-7-O-glucoside	23.4	1136±187	4.84
11	P-Coumaric acid	13.6	509±6	2.17
12	Vanillin	12.0		≤ 0.02
13	unknown	6.1		
14	unknown	11.2		

*Concentrations are expressed as mean \pm SEM (n=3), absolute% was expressed as percentage of individual phenolic compounds in the total extract



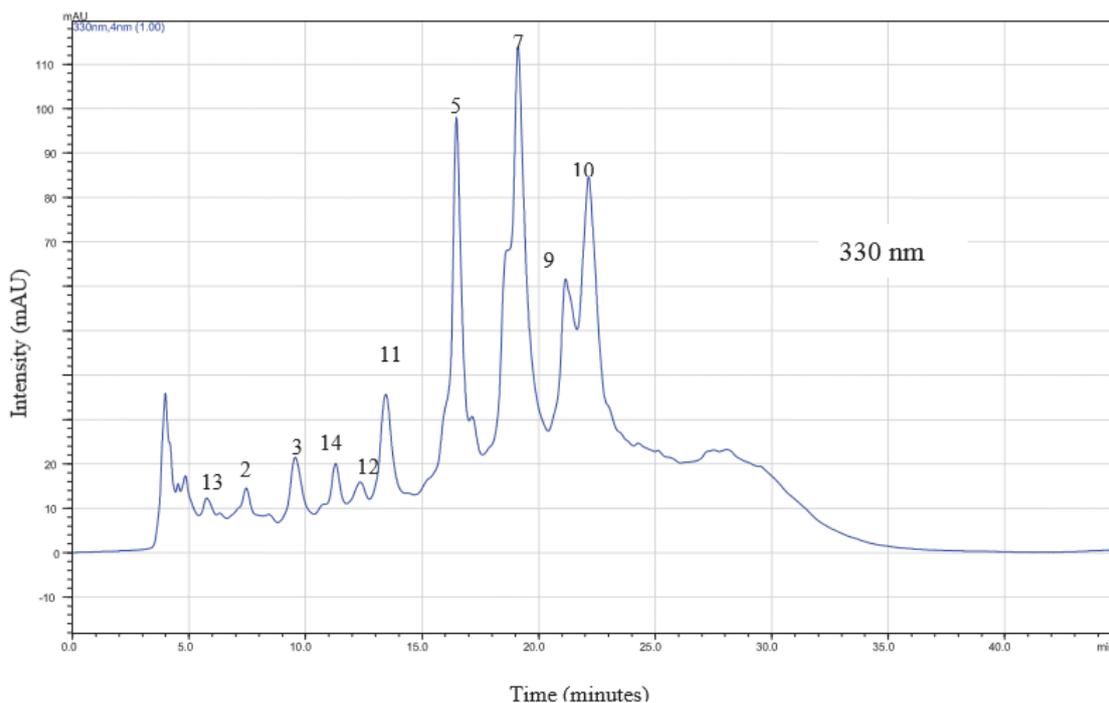


Figura 5. Perfil de HPLC del extracto de hoja de olivo (cultivar 'Frantoio') obtenido con agua hirviendo (1) Hidroxitirosol; (2) tirosol; (3) ácido cafeico; (4) ácido ferúlico; (5) verbascósido; (6) rutina; (7) luteolina 7-O-glucósido; (8) oleuropeína; (9) luteolin-4-O-glucósido; (10) apigenina 7-O-glucósido; (11) ácido p-cumárico. La detección se realizó a 280 nm y 330 nm [19].

El compuesto más abundante en ambos estudios fue la oleuropeína, con un 44,31% cuando se emplea etanol acuoso (80%) como disolvente y un 35,71% en agua hirviendo.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

2.1. Objetivo general

Estudiar los avances científicos en la obtención de extractos naturales de hoja de olivo, y proponer líneas de investigación que utilicen tecnologías de membrana para concentrar estos extractos ricos en compuestos antioxidantes como hidroxitirosol y oleuropeína.

2.2. Objetivos específicos

La consecución del objetivo general se ha planteado mediante una metodología que comprende los siguientes objetivos específicos.

- Revisión bibliográfica sobre el interés y la obtención de extractos naturales de la hoja de olivo.
- Propuesta de un nuevo proceso que parte de un extracto natural acuoso y utiliza tecnologías de membranas combinadas con carbón activado (CA). En concreto se estudiará una etapa de decoloración mediante un proceso combinado de ultrafiltración con CA, seguido de una etapa de

concentración mediante nanofiltración y posterior liofilización. Se pretende con esta tecnología eliminar la etapa de evaporación a vacío, de alto consumo energético, que es necesaria en el tratamiento de extractos obtenidos con disolventes orgánicos o alcoholes, previa a la etapa de liofilización.

- Otros objetivos formativos: aplicación de técnicas analíticas para el análisis de los extractos de hojas de olivo, análisis de datos y elaboración de conclusiones, entre otros.

3. ANTECEDENTES

3.1. Extracción de compuestos fenólicos de hojas de olivo

3.1.1. Secado de las hojas de olivo

La hoja de olivo fresca generalmente necesita secado y molienda antes de la extracción. El secado se lleva a cabo para eliminar el agua de las hojas protegiéndolas así contra el deterioro y la degradación por acción enzimática. Al moler las hojas secas, se reduce el tamaño de partícula y se facilita la entrada del disolvente en las células de las hojas. De esta forma se mejora la eficacia y la capacidad de extracción.

Algunos investigadores han estudiado el secado al aire, secado por microondas y la liofilización.

El secado al aire puede darse a temperatura ambiente o temperaturas elevadas durante diferentes períodos de tiempo. Se necesita un control cuidadoso de la temperatura durante el secado, ya que puede causar degradación de los polifenoles [5]. Malik y col. [4] estudiaron que el secado al aire a 25 °C o a temperaturas más elevadas como 30 °C y 40 °C da como resultado una buena recuperación de oleuropeína; sin embargo, el secado a 60 °C produce pérdidas sustanciales de polifenoles debido a la degradación de oleuropeína y otros compuestos fenólicos.

La liofilización es una forma de evitar la degradación térmica. Las hojas se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se liofilizan antes de la extracción. La eliminación del agua a través de la liofilización generalmente no afecta de forma significativa a los compuestos fenólicos y permite que las muestras se conserven durante períodos de tiempo más largos.

Sin embargo, en la etapa de descongelación de las hojas de olivo congeladas se ha observado frecuentemente una fuerte reducción de los niveles de oleuropeína. Este hecho, posiblemente, se debe a la rotura de la membrana celular durante la congelación y, en consecuencia, a la liberación de enzimas activas degradantes de oleuropeína durante la descongelación. Además, pequeños errores en el manejo de la muestra causarían fácilmente resultados inconsistentes cuando se congela y se almacena a -80 °C [4].

Se comprobó que el secado por microondas evita la hidrólisis del éster de saponinas que ocurre durante el secado al aire, reportándose concentraciones más altas de oleuropeína después de usar este método de secado [16].

El secado por infrarrojos ha sido sugerido recientemente como un buen método para preservar las hojas de olivo porque permite la retención del color verde de las hojas

frescas. Mediante secado por infrarrojos se eliminó la humedad de las hojas frescas (más del 85% en peso) en un corto período de tiempo (que varía entre 162 minutos a 42 °C y 15 minutos a 70 °C). El contenido de fenoles totales en las hojas de olivo secadas por infrarrojos fue mayor que en las hojas frescas [7].

En general, independientemente del método de secado utilizado, se han encontrado mayores niveles de oleuropeína en hojas secas que en hojas frescas, probablemente debido a la conversión de glucósido de oleuropeína en oleuropeína por acción de la β -glucosidasa presente en las hojas de olivo [8].

3.1.2. Extracción

La extracción con disolventes fue el método principalmente adoptado por la mayoría de los investigadores para extraer compuestos fenólicos de hojas de olivo. La extracción con disolventes es un proceso diseñado para separar compuestos solubles por difusión desde una matriz sólida hacia una matriz líquida.

La extracción asistida por ultrasonidos es más rápida y más completa en comparación con los métodos tradicionales. Puede llevarse a cabo mediante mezcla de la muestra sólida molida con el disolvente adecuado utilizando un baño ultrasónico, donde se establece la temperatura de trabajo y el tiempo de extracción, o mediante el uso de una sonda ultrasónica donde las variables de operación son la potencia y el tiempo. El uso de ultrasonidos puede aumentar el rendimiento de extracción y acortar el tiempo de extracción [20].

La extracción asistida por microondas es también un método efectivo para acelerar el proceso y reducir el tiempo de extracción. Se ha comprobado que la extracción completa de compuestos bioactivos de la hoja de olivo se puede lograr en 8 minutos y 25 minutos cuando se utiliza extracción asistida por microondas y por ultrasonidos, respectivamente. La alta recuperación y los bajos costos de mantenimiento hacen estos procesos posibles para la implementación industrial [5].

La extracción con fluidos supercríticos facilita enormemente el proceso de extracción y reduce el tiempo de extracción debido a la baja viscosidad y alta densidad de fluido supercrítico. También puede minimizar la degradación al funcionar en ausencia de luz y aire [13].

Cabe destacar que, tanto el rendimiento de extracción como la capacidad antioxidante de los extractos, están influenciados por el disolvente utilizado y por las condiciones de operación. Debido a la diferente polaridad y potencial antioxidante de los compuestos extraídos, los disolventes más polares son más eficaces en la recuperación cuantitativa de compuestos fenólicos que los disolventes no polares y el metanol es un buen disolvente para la extracción de compuestos fenólicos de hojas de olivo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que su uso puede alcanzar niveles inaceptables de toxicidad en los residuos de los extractos finales.

En sustitución del metanol, el etanol y el agua son los disolventes más utilizados por razones de seguridad y abundancia [21]. De Leonardis y col. [1] comprobaron que el etanol era efectivo como disolvente para la extracción de los compuestos fenólicos contenidos en las hojas de olivo, y que el agua tiene un papel importante en el proceso de extracción al aumentar la difusión de polifenoles extraíbles a través de los tejidos vegetales [1].

También hay que tener en cuenta que los cambios en la concentración de etanol modifican las propiedades físicas del disolvente, como densidad, viscosidad dinámica y constante dieléctrica. La solubilidad de los compuestos también se ve modificada por cambios en la concentración de etanol, y esto puede influir en la extracción de los fenólicos. En un estudio realizado por Mylonaki y col. [22] para investigar el efecto de la concentración de etanol en el rendimiento total de extracción de compuestos fenólicos, utilizaron 40%, 50% y 60% etanol (v/v). Los resultados mostraron que la concentración de etanol en el medio tenía efecto bifásico, ya que un nivel intermedio de etanol (50%) parecía proporcionar el menor rendimiento. En contraste, las tendencias observadas al disminuir o aumentar la concentración de etanol indicaron que la extracción de polifenoles fue favorecida en ambos casos. Esto se debe a que muchos de los compuestos fenólicos de la hoja de olivo son glucósidos, y se puede suponer que su solubilidad puede ser mayor en mezclas del 40% de etanol (v/v) que del 50% de etanol (v/v). Por el contrario, la oleuropeína, que es menos polar, sería más soluble en etanol al 60% (v/v) que al 50% (v/v) [22].

Japón-Luján y col. [5] sugirieron que el etanol acuoso al 80% (v/v) era el disolvente óptimo para la extracción de los compuestos fenólicos específicos de la hoja de olivo en sustitución de disolventes más tóxicos (metanol, éter dietílico, cloroformo) y obtener así extractos ricos en compuestos fenólicos bioactivos para uso humano

Lee y col. [17] también informaron acerca de los flavonoides totales y los contenidos fenólicos fueron significativamente mayores en los extractos con el 80% de etanol (v/v), butanol y acetato de etilo que los extractos obtenidos con hexano, cloroformo y agua

La temperatura es uno de los factores que influye significativamente en el rendimiento de la extracción, ya que tiene impacto en la solubilidad, la velocidad de transferencia de materia por difusión y la estabilidad de los compuestos fenólicos. Un aumento de la temperatura proporciona la disminución de la viscosidad y el aumento de la velocidad de difusión. Sin embargo, las altas temperaturas pueden degradar los compuestos fenólicos.

Diversos estudios muestran el efecto de la temperatura en la extracción de compuestos fenólicos de hojas de olivo. Generalmente, el aumento de la temperatura repercute favorablemente en el requerimiento de un menor tiempo de extracción. Cuando se usó etanol como disolvente, el proceso de extracción se realizó a temperatura ambiente (uso más frecuente) o temperaturas de 40 °C durante 24-48 horas bajo agitación [5].

El pH del medio de extracción es otro factor a controlar, ya que afecta al grado de solubilidad e influye en la posible solubilización de las fracciones hidrolizables. Para estudiar la influencia del pH del medio sobre los extractos de hoja de olivo, se utilizaron como disolventes soluciones acuosas diluidas de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio a pH 2 y pH 12, respectivamente. Al comparar los extractos obtenidos se demostró que la cantidad de compuestos fenólicos bioactivos extraídos a pH 12 disminuyó en un 27% para apigenina-7-glucósido, 35% para oleuropeína y luteolina-7-glucósido y 40% para verbascósido, en comparación con los valores obtenidos a pH 8, probablemente debido a la hidrólisis del enlace éster. Sin embargo, la concentración de los analitos obtenidos a pH 2 fue similar a la del extracto a pH 8 [5].

La ebullición de las hojas secas también fue un método muy eficiente para extraer oleuropeína, resultando en un 96% de recuperación de este compuesto [4]. En este estudio, los extractos de hoja de olivo se obtuvieron hirviendo 5 g de polvo de hoja de

olivo seco en 100 mL o 150 mL de agua. La Tabla 4 muestra las concentraciones totales de fenoles y oleuropeína en los dos extractos de agua hirviendo. Cuanto mayor es la relación sólido-disolvente, mayor fue la concentración total de fenoles y oleuropeína en el extracto. Sin embargo, si la cantidad de sólido es muy elevada, el proceso de difusión se ve dificultado y la extracción es menos eficaz. Por ello, la relación sólido-disolvente es uno de los parámetros de operación que requieren ser optimizados para realizar un proceso eficaz de extracción.

Tabla 4. Contenido total de compuestos fenólicos y de oleuropeína en el extracto de hoja de olivo usando agua hirviendo [4].

Condiciones de extracción	Disolvente: relación sólida (20:1)	Disolvente: relación sólida (30:1)
Contenido fenólico total* (mg ácido cafeico / g de materia seca)	13,39 ± 0,13	16,51 ± 0,84
Concentración de oleuropeína* (mg / kg materia seca)	13225 ± 546	18694 ± 241

*Los resultados se expresan como valor medio ± SEM (n=3)

Malik y col. [4] obtuvieron un 50% menos de compuestos fenólicos usando agua como disolvente que utilizando etanol. Hubo casi un 67% menos de oleuropeína en los extractos de agua que en los extractos de etanol.

A pesar de que la infusión es un método tradicional de hacer hierbas medicinales, conviene tener en cuenta que produce extractos con una concentración mucho menor de compuestos fenólicos importantes, y además puede haber degradación de esos compuestos durante la ebullición [5].

3.2. Aprovechamiento de los extractos

Los extractos de hojas de olivo presentan multitud de beneficios, como actividad antiinflamatoria y antitrombótica, antimicrobiana, antihipertensiva e hipoglucémica, entre otras. A continuación, se detallan brevemente estos beneficios.

Además de la actividad antioxidante y vasodilatadora, la agregación antiplaquetaria y los efectos antiinflamatorios de la oleuropeína y el hidroxitirosol se han empleado en modelos preclínicos experimentales, demostrando inhibir la oxidación inducida por sulfato de cobre de lipoproteínas de baja densidad.

Gracias a la actividad antimicrobiana, la hoja de olivo puede ayudar en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades infecciosas causadas por bacterias, virus, levaduras y hongos. El extracto de hoja de olivo se usa para el tratamiento de infecciones como bronquitis y amigdalitis, infecciones fúngicas que ocurren en la vagina e infecciones virales que producen fiebre. En un estudio *in vitro* [2], se descubrió que el tirosol es el mejor compuesto antifúngico, seguido de la catequina y la oleuropeína. Los extractos pueden ser más beneficiosos que los compuestos aislados, ya que el componente bioactivo puede cambiar sus propiedades en presencia de otros constituyentes presentes en los extractos. Por ello, hoy en día, la

mayoría de los productos que hay en el mercado se hacen directamente con hojas recién cortadas, ya que proporcionan todo el espectro natural de biofenoles y se maximizan los beneficios para la salud.

En un estudio preclínico [2] se ha demostrado la acción profiláctica del extracto de hoja de olivo para reducir la presión sanguínea. Mediante ensayos *in vivo* se ha verificado el efecto antihipertensivo de la hoja de olivo, al disminuir la presión arterial. Las acciones antihipertensivas y reductoras del colesterol han sido confirmadas en humanos a través de este estudio.

González y col. [23] informaron que la actividad hipoglucémica máxima se obtuvo de las muestras recolectadas en los meses de invierno. Uno de los compuestos responsables de esta actividad fue el oleuropeósido, que mostró actividad a una dosis de 0,16 g/kg. Este compuesto también demostró actividad antidiabética en animales con diabetes inducida por aloxana. La actividad hipoglucémica de este compuesto puede ser el resultado de dos mecanismos: la potenciación de la liberación de insulina inducida por glucosa y el aumento de la absorción periférica de glucosa.

La hoja de olivo también es astringente y antiséptica. El extracto de hoja de olivo es beneficioso para el tratamiento del resfriado común, la tos y la gripe. García-Villalba y col. [24] investigaron la biodisponibilidad y el metabolismo del extracto y sugirieron que las mujeres posmenopáusicas podrían ser una población objetivo para la ingesta de compuestos fenólicos de oliva en la prevención de procesos relacionados con la edad y el estrés oxidativo, como la osteoporosis.

Debido a todos estos beneficios, los extractos de hoja de olivo están teniendo gran interés para enriquecer aceites comestibles. En concreto, se ha estudiado el uso de extracto de hoja de olivo nanoencapsulado para controlar la estabilidad oxidativa del aceite de soja [2].

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiales y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo con 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: carbón activado en polvo Norit (Norit 97876, Sigma-Aldrich), acetato de sodio (99%, Merck), 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), cloruro de hierro (III) hexahidratado (>99,9%, Panreac), ácido clorhídrico (37%, Acros Organics), sulfato de hierro (II) heptahidratado (>99%, Merck).

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).

4.2. Membranas

En los experimentos de ultrafiltración (UF) se utilizó una membrana cerámica tubular de TiO₂ con un corte molecular nominal de 100 kDa. Las experiencias de nanofiltración (NF) se realizaron con una membrana polimérica plana. Las características de ambas membranas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de las membranas utilizadas en este trabajo.

Membrana	Fabricante	Proceso	Material	Geometría	Área (cm ²)	Peso molecular nominal límite, NMWL (Da)
NF270	Dow-Filmtec	NF	Poliamida	Plana	14,6	270
UF100	Tami	UF	TiO ₂	Tubular	47	100000

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. Cuantificación de compuestos de interés

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.

- La concentración de compuestos antioxidantes, flavonoides y fenoles totales se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis midiendo la absorbancia a 475 nm, utilizando un espectrofotómetro Hitachi U-2000 de doble haz y microcubetas de cuarzo de 1 cm de ancho.
- Capacidad antioxidante (método FRAP). Con este método se determina el poder reductor de las muestras (extractos de hojas de olivo secas en este caso). Se basa en la capacidad de reducir el Fe (III) hasta Fe (II) [25]. 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 FeCl₃ 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 FeSO₄ 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 [26]. La capacidad o actividad antioxidante (AA) de la muestra se expresa como mg FeSO₄/g hojas de olivo secas.
- 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) [27]. 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 hojas de olivo secas.

4.4. Equipos y procedimiento experimental

4.4.1. 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 un molino Retsch SM100, hasta una granulometría final $\leq 500 \mu\text{m}$, 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.

4.4.2. 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 en este caso agua como disolvente. La extracción se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad, bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura de 30 °C, velocidad de agitación de 150 rpm, tiempo de extracción de 18 horas y relación masa/volumen de 30 g hojas de olivo/L de agua.

El extracto obtenido se sometió a centrifugación y posterior filtración a vacío del sobrenadante, utilizando papel de filtro Whatman de 0,45 mm con el fin de separar las partículas sólidas. El volumen de extracto obtenido fue 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.

4.4.3. Decoloración del extracto mediante adsorción con carbón activado y ultrafiltración

En la Figura 6 se muestra una fotografía del dispositivo utilizado en el proceso combinado de adsorción con carbón activado (CA) y ultrafiltración (UF). La alimentación que contiene el extracto con carbón activado se recircula a lo largo de la membrana tubular, separándose de forma continua una corriente de permeado, mientras que el retenido retorna al tanque.

En este caso, se realizaron experimentos previos con agua Milli-Q, y se acondicionó la membrana utilizando 200 mL de agua Milli-Q antes de su uso.



Figura 6. Fotografía del dispositivo utilizado en la decoloración del extracto acuoso mediante un proceso combinado de adsorción con CA y UF.

Para seleccionar la presión de operación óptima se realizaron una serie de experimentos previos con carbón activado en agua, a 30 °C, con el fin de medir la densidad de flujo de permeado (J_p) a diferentes presiones comprendidas entre 0,25 y 1 bar (no mostrado). La densidad de flujo de permeado se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad de flujo de permeado } (J_p) = \frac{V_p(L)}{t(h) \times A(m^2)} \quad (1)$$

donde V_p es el volumen de permeado recogido a lo largo del tiempo, t , y A el área superficial de la membrana.

Una vez seleccionada la presión óptima (1 bar) para dicha membrana, se llevó a cabo el proceso de ultrafiltración del extracto de hojas de olivo con carbón activado.

4.4.4. Concentración del extracto mediante nanofiltración

El permeado obtenido en la etapa anterior se concentró mediante nanofiltración (NF) utilizando una celda de alta presión Sterlitech HP4750 Stirred Cell (Figura 7). En este caso se realizaron experimentos previos con agua Milli-Q, y se acondicionó la membrana utilizando 200 mL de agua Milli-Q antes de su uso.

Para seleccionar la presión de operación óptima se realizaron una serie de experimentos, operando siempre con una velocidad de agitación sobre la superficie de la membrana de 300 rpm y midiendo la densidad de flujo de permeado, J_p , con agua a 30 °C para presiones comprendidas entre 10 y 30 bar (no mostrado).

Una vez seleccionada la presión de trabajo en 20 bar, se procedió a la concentración del permeado de UF obtenido en la etapa anterior, utilizando la membrana de NF.



Figura 7. Fotografía del dispositivo utilizado para la concentración del extracto mediante nanofiltración.

4.4.5. Obtención de extractos secos mediante 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.

Para la realización de estos experimentos se utilizó un equipo Labconco Freeze Dry System (presión de operación $1,5 \cdot 10^{-4}$ bar; tiempo de operación de 48 horas), situado en el laboratorio de Tecnología de los Alimentos.

Las muestras liofilizadas fueron el extracto acuoso inicial y el retenido de la etapa de nanofiltración. Estas muestras se congelaron a -80 °C durante al menos 12 horas antes de ser liofilizadas.

Posteriormente se realizó una reconstitución de ambos extractos liofilizados, redisolviéndolos en agua con la finalidad de comparar sus propiedades.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron en primer lugar una serie de experimentos en tubos de centrifuga, para analizar la cantidad de carbón activado (CA) a utilizar y el pH. Se utilizaron 2, 5 y 8 mg de CA por mL de extracto a pH natural (pH = 4,21) y a pH 3. Las muestras se mantuvieron en el agitador orbital durante 12 h, a 150 rpm y 30 °C. Posteriormente se centrifugaron y se filtraron para medir su absorbancia a 475 nm. Los resultados mostrados en la Figura 8a indican un mayor grado de decoloración a pH 3 y un ligero aumento con el contenido de CA. Sin embargo, la Figura 8b, que muestra el contenido de fenoles totales en los sobrenadantes, revela que hay adsorción de fenoles por el CA y que ésta es mayor a pH =3 y crece significativamente con la proporción de CA añadido a la muestra. A la vista de estos resultados, se seleccionó como una primera opción una proporción de masa de CA / volumen de extracto de 5 mg/mL.

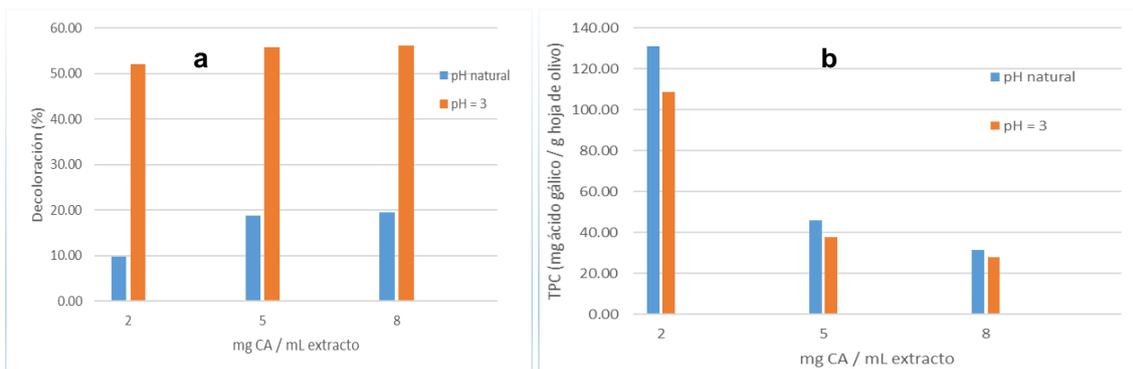


Figura 8. Efecto del pH y de la concentración de carbon activado sobre el grado de decoloración (a) y contenido de fenoles totales (b) del extracto acuoso de hojas de olivo.

En las Figuras 9a y 9b se muestra la disminución de la densidad de flujo de permeado y el grado de decoloración de los permeados (a 475 nm) a lo largo del tiempo, respectivamente, en el proceso continuo de ultrafiltración con carbón activado. Los ensayos se realizaron con una proporción inicial de masa de CA / volumen de extracto de 5 mg/mL y a pH = 3. La presión aplicada fue de 1 bar.

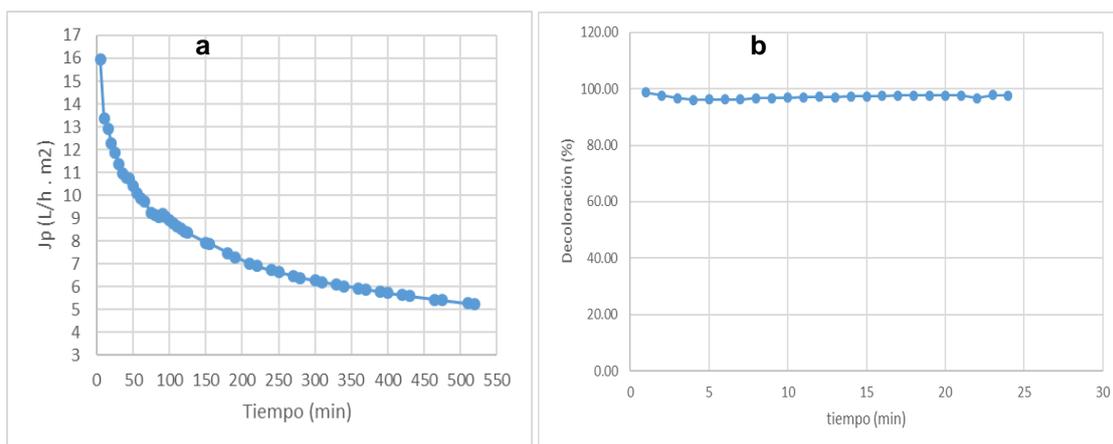


Figura 9. Variación de la densidad de flujo de permeado (a) y del grado de decoloración de los permeados (b) en el proceso continuo de decoloración del extracto mediante el proceso combinado de adsorción con CA y UF.

La disminución de J_p se debe al aumento de la concentración de sólidos (CA) sobre la superficie de la membrana, como consecuencia de la forma de operación en modo concentración, lo que conduce a un aumento de la resistencia a la permeación, y, por tanto, una disminución en el flujo de permeado con el tiempo de operación.

El flujo de permeado inicial del sistema de ultrafiltración fue de 15,952 L/m² h, disminuyendo gradualmente con el tiempo hasta alcanzar valor 5,62 L/m² h, lo que supone una reducción de J_p del 65% durante 500 min de operación hasta alcanzar un factor de concentración en volumen final ($FCV = V_0/V_r$) de 2,5, siendo V_0 el volumen de alimentación inicial y V_r el volumen de retenido.

Conviene destacar que el uso de CA en la UF de extractos presenta una importante ventaja relacionada con el menor ensuciamiento de la membrana. El CA forma una

capa de adsorbente sobre la superficie de la membrana que impide que determinados compuestos coloreados alcancen dicha superficie y la ensucien. En ausencia de CA, el ensuciamiento de la membrana es muy severo y se requieren procesos de limpieza muy agresivos para su regeneración, con la consiguiente disminución de la vida media de la membrana.

En la etapa siguiente se procedió a realizar la concentración del extracto decolorado mediante un proceso de nanofiltración. Para ello se utilizó el dispositivo mostrado en la Figura 7, utilizando como alimentación 120 mL del permeado obtenido en la etapa de decoloración mediante CA + UF. La presión transmembranal utilizada fue de 20 bar. La disminución de la densidad del flujo de permeado durante la etapa de NF se muestra en la Figura 10. El grado de concentración alcanzado se corresponde con un FCV = 2 en un tiempo de 16 min.

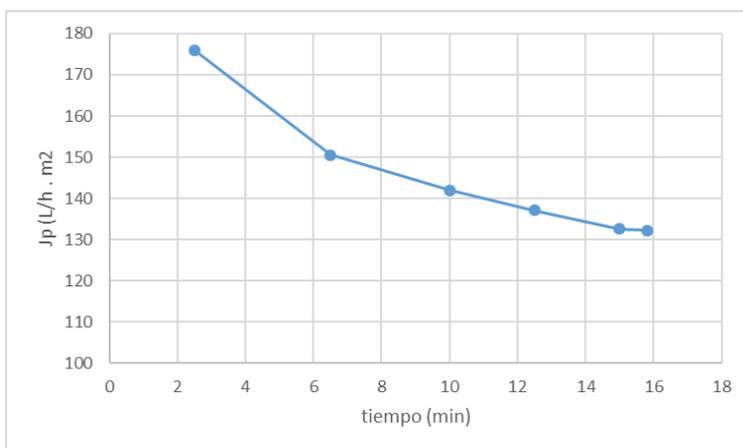


Figura 10. Variación de la densidad de flujo de permeado en la etapa de nanofiltración.

En nanofiltración, el valor inicial de J_p fue de 175,973 L/m² h y el valor final de 132,196 L/m² h, lo que supone una reducción de J_p del 25%. Esta reducción se debe al ensuciamiento de la membrana y a la formación de una capa altamente concentrada de polifenoles en las cercanías de la superficie de la membrana que produce una fuerte resistencia al flujo de permeado. En la Figura 11 se muestra una fotografía de la membrana tras finalizar la operación de NF. En ella se observa un ensuciamiento leve que hace técnicamente viable el proceso de NF. A este respecto, experiencias en el laboratorio han demostrado la imposibilidad de realizar la NF de extractos hidroalcohólicos debido a la gran cantidad de compuestos coloreados, incluso con una etapa previa de pretratamiento por UF, que colapsan la membrana de NF y hacen imposible realizar la concentración.

Conviene recordar que la viabilidad técnica del proceso de NF para la concentración del extracto se ve favorecida por dos hechos importantes: el primero por la ausencia en el extracto acuoso de muchos compuestos coloreados insolubles en agua (extracto inicial), y el segundo por el uso del permeado decolorado procedente de la etapa previa de decoloración mediante el proceso combinado de CA + UF.

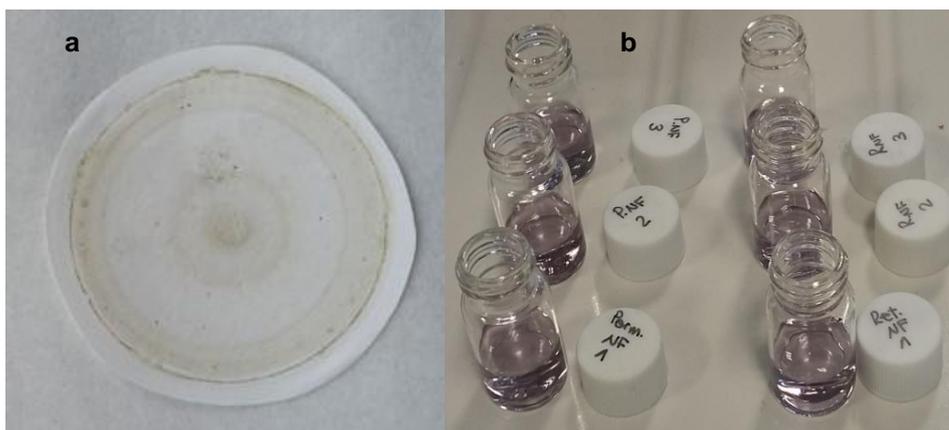


Figura 11. Fotografías de la membrana de NF tras el proceso de concentración hasta un FCV = 2 (a) y de los permeados y retenidos de NF (b).

El retenido final obtenido tras la concentración por NF se liofilizó para obtener un extracto seco (retenido NF liofilizado). Este extracto seco fue posteriormente rehidratado con agua y analizado.

El contenido en fenoles totales (TPC), medido mediante el método Folin-Ciocalteu, y la capacidad antioxidante analizada mediante el método FRAP de las diferentes fracciones de los procesos de UF + CA y NF se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Capacidad antioxidante y concentración de fenoles totales (TPC) de las muestras.

Muestra	Capacidad antioxidante (mg FeSO ₄ /g hoja olivo)	TPC (mg ácido gálico/g hoja olivo)
Extracto inicial	39,43	8,15
Permeado UF	2,89	5,87
Permeado NF	0,56	0,12
Retenido NF	4,77	1,35
Extracto inicial liofilizado	161,25	55,05
Retenido NF Liofilizado	23,62	10,13

En los resultados mostrados en la Tabla 6 se puede observar que el extracto seco decolorado procedente del retenido de la etapa de NF, una vez liofilizado y reconstituido en agua, contiene tan solo un 14% y un 18% de la capacidad antioxidante y del contenido fenólico total (TPC), respectivamente, del extracto seco acuoso inicial. Esta pérdida de compuestos bioactivos se debe principalmente a los compuestos adsorbidos por el CA en la etapa de decoloración, tal como se muestra en la Figura 7b.

Un resultado sorprendente mostrado en la Tabla 6 es el valor de TPC del retenido de NF. Este resultado es inferior al TPC del permeado de UF, por lo que siendo la NF un proceso de concentración de fenoles, se considera que el resultado de 1,35 mg ácido gálico/g de hoja de olivo podría ser anómalo y requiere ser confirmado.

El principal mecanismo de rechazo de solutos en NF es el tamizado, de tal manera que las moléculas de tamaño mayor que el corte molecular de la membrana quedan

retenidas en un 90%. En el estudio realizado por Khemakhem y col. [6] se obtuvieron extractos acuosos de hoja de olivo que posteriormente fueron tratados de forma secuencial por microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración. La capacidad antioxidante aumentó después de realizar la NF, correlacionándose principalmente con los fenoles totales y oleuropeína contenida en el extracto de hojas de olivo. En este estudio, más del 95% de los compuestos fenólicos presentes en extractos de hoja de olivo fueron retenidos por la membrana de NF. Comparando este resultado con el mostrado en la Tabla 6, se puede observar que el rechazo ofrecido por la membrana ($R = (C_r - C_p)/C_r$) es del 91%, un valor bastante similar al de referencia.

Debido al estado de alarma por la pandemia del Covid-19, la parte experimental ha quedado inconclusa. De esta manera, varias de las experiencias contempladas en el diseño inicial no se han podido realizar. Entre ellas la confirmación del TPC en el retenido de NF, como ya se ha comentado, la repetición de experiencias a partir de extractos iniciales con mayor relación masa de hoja de olivo / volumen de agua, la UF del extracto sin CA y la obtención de los perfiles fenólicos por HPLC de los extractos secos liofilizados.

6. CONCLUSIONES

Se ha estudiado la extracción de compuestos bioactivos de las hojas de olivo, fundamentalmente fenoles, utilizando agua a 30 °C, y la decoloración y concentración de los extractos mediante una primera etapa de ultrafiltración con carbón activado (CA + UF) y una segunda etapa de concentración mediante nanofiltración (NF).

Las principales conclusiones de este estudio experimental, inconcluso debido al estado de alarma por la pandemia del coronavirus Covid-19, son las siguientes:

- La combinación de las tecnologías de CA + UF y NF sobre extractos acuosos permiten la obtención de extractos sin color y concentrados de compuestos fenólicos de elevada capacidad antioxidante que pueden ser de interés para su aplicación en la industria alimentaria.
- Se ha demostrado la viabilidad técnica de la tecnología aplicada en este estudio y por tanto el beneficio económico que puede representar la obtención de extractos secos liofilizados sin requerirse la etapa de evaporación a vacío, lenta y de alto consumo energético, pero necesaria cuando se utilizan medios alcohólicos para la extracción.
- Se requiere mejorar los resultados finales obtenidos en este estudio (retenido NF liofilizado) por lo que es necesario la optimización de las condiciones de operación de cada una de las etapas involucradas: extracción, decoloración y concentración.
- Los resultados obtenidos permiten orientar una futura experimentación en relación con los siguientes aspectos: a) la necesidad de optimizar la temperatura y la relación masa sólido / volumen de agua en la etapa de extracción, b) la necesidad de realizar la UF del extracto con membranas de bajo corte molecular sin CA para comprobar la retención de compuestos coloreados y el grado de decoloración de los permeados, c) optimizar la etapa de NF con diferentes membranas y condiciones de operación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. de Leonardis, A. Aretini, G. Alfano, V. Macciola, G. Ranalli. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity, *Eur. Food Res. Technol.* 226 (2008) 653–659, doi: 10.1007/s00217-007-0574-3
- [2] O. Benavente-García, J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuño, J.A. del Río. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food Chem.* 68 (2000) 457–462, doi: 10.1016/S0308-8146(99)00221-6
- [3] D. Tura, K. Robards. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants, *J. Chromatogr. A.* 975 (2002) 71–93, doi: 10.1016/S0021-9673(02)00879-8
- [4] N.S.A. Malik, J.M. Bradford. Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves, *J. Food. Agric. Environ.* 6 (2008) 8–13, doi: 10.1234/4.2008.1130
- [5] R. Japón-Luján, J.M. Luque-Rodríguez, M.D. Luque de Castro. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, *J. Chromatogr. A.* 1108 (2006) 76–82, doi: 10.1016/j.chroma.2005.12.106
- [6] I. Khemakhem, O.D. Gargouri, A. Dhouib, M.A. Ayadi, M. Bouaziz. Oleuropein rich extract from olive leaves by combining microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration, *Sep. Purif. Technol.* 172 (2017) 310–317, doi: 10.1016/j.seppur.2016.08.003
- [7] N. Boudhrioua, N. Bahloul, I.B. Slimen, N. Kechaou. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves, *Ind. Crops Prod.* 29 (2009) 412–419, doi: 10.1016/j.indcrop.2008.08.001
- [8] S. Silva, L. Gomes, F. Leitão, A.V. Coelho, L. Vilas Boas. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves, *Food Sci. Technol. Int.* 12 (2006) 385–395, doi: 10.1177/1082013206070166
- [9] M.M. Delgado-Povedano, F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro. Selective ultrasound-enhanced enzymatic hydrolysis of oleuropein to its aglycon in olive (*Olea europaea* L.) leaf extracts, *Food Chem.* 220 (2017) 282–288, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.011
- [10] P. Vogel, I.K. Machado, J. Garavaglia, V.T. Zani, D. de Souza, S.M. Dal Bosco. Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health, *Nutr. Hosp.* 31 (2015) 1427–1433, doi: 10.3305/nh.2015.31.3.8400
- [11] E. Nikolaiivits, A. Termentzi, A.-L. Skaltsounis, N. Fokialakis, E. Topakas. Enzymatic tailoring of oleuropein from *Olea europaea* leaves and product identification by HRMS/MS spectrometry, *J. Biotechnol.* 253 (2017) 48–54, doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.05.020
- [12] S.N. El, S. Karakaya. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health, *Nutr. Rev.* 67 (2009) 632–638, doi: 10.1111/j.1753–4887.2009.00248.x

- [13] S. Sahin, M. Bilgin, M.U. Dramur. Investigation of oleuropein content in olive leaf extract obtained by supercritical fluid extraction and Soxhlet methods, *Sep. Sci. Technol.* 46 (2011) 1829–1837, doi: 10.1080/01496395.2011.573519
- [14] C. Soler-Rivas, J.C. Espín, H.J. Wichers, Oleuropein and related compounds, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1013–1023, doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C
- [15] A. Ranalli, S. Contento, L. Lucera, M. di Febo, D. Marchegiani, V. di Fonzo. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.), *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 434–340, doi: 10.1021/jf051647b
- [16] C. Savourmin, B. Baghdikian, R. Elias, F. Dargouth-Kesraoui, K. Boukef, G. Balansard. Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 618–621, doi: 10.1021/jf000596+
- [17] O.-H. Lee, B.-Y. Lee. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3751–3754, doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.052
- [18] V. Goulas, V.T. Papoti, V. Exarchou, M.Z. Tsimidou, I. Gerothanassis. Contribution of flavonoids to the overall radical scavenging activity of olive (*Olea europaea* L.) leaf polar extracts, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3303–3308, doi: 10.1021/jf903823x
- [19] H. Luo, Extraction of antioxidant compounds from olive (*Olea europaea*) leaf, Massey University, Albany, New Zealand (2011)
- [20] S. Albu, E. Joyce, L. Paniwnyk, J.P. Lorimer, T.J. Mason. Potential for the use of ultrasound in the extraction antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry, *Ultrason. Sonochem.* 11 (2004) 261–265, doi: 10.1016/j.ultsonch.2004.01.015
- [21] A. Moure, J.M. Cruz, D. Franco, J.M. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, M.J. Núñez, J.C. Parajó. Natural antioxidants from residual sources, *Food Chem.* 72 (2001) 145–171, doi: 10.1016/S0308-8146(00)00223-5
- [22] S. Mylonaki, E. Kiassos, D.P. Makris, P. Kefalas. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 977–985, doi:10.1007/s00216-008-2353-9
- [23] M. González, A. Zarzuelo, M. Gámez, M.P. Utrilla, J. Jiménez, I. Osuna. Hypoglycemic activity of olive leaf, *Planta Med.* 58 (1992) 513–515, doi: 10.1055/s-2006-961538
- [24] R. García-Villalba, M. Larrosa, S. Possemiers, F.A. Tomás-Barberán, J.C. Espín. Bioavailability of phenolics from an oleuropein-rich olive (*Olea europaea*) leaf extract and its acute effect on plasma antioxidant status: comparison between pre- and postmenopausal women, *Eur. J. Nutr.* 53 (2014) 1015–1027, doi: 10.1007/s00394-013-0604-9

- [25] I.F.F. Benzie, J.J. Strain. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70–76, doi: 10.1006/abio.1996.0292
- [26] S. Rebolleda, M.T. Sanz, J.M. Benito, S. Beltrán, I. Escudero and M.L. González San José. Formulation and characterisation of wheat bran oil-in-water nanoemulsions, *Food Chem.* 167 (2015) 16–23, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.097
- [27] K. Downes, G.A. Chope, L.A. Terry. 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 Biol. Technol.* 55 (2010) 36–44, doi: 10.1016/j.postharvbio.2009.08.003