



**UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS**

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Curso 2020/2021

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Área de Ingeniería Química

***RECUPERACIÓN DE AZÚCARES Y
POLIOLES PRESENTES EN HOJAS DE
OLIVO MEDIANTE UN PROCESO
COMBINADO DE EXTRACCIÓN Y
MEMBRANAS***

Laura Porres Provedo

Marzo 2021

Tutor: José Manuel Benito Moreno



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

**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
CURSO: 2020/2021**

D. José Manuel Benito Moreno informa de que la alumna Dña. Laura Porres Provedo ha realizado el trabajo "Recuperación de azúcares y polioles presentes en hojas de olivo mediante un proceso combinado de extracción y membranas" bajo su tutela, y considera que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indiquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 18 de marzo de 2021

Fdo.: José Manuel Benito Moreno

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

Dña. Laura Porres Provedo y D. José Manuel Benito Moreno, autora y tutor 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 18 de marzo de 2021

Fdo.: Laura Porres Provedo

Fdo.: José Manuel Benito Moreno

Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos de investigación PID2019-104950RB-I00, financiado por la Agencia Estatal de Investigación, y BU050P20 y BU301P18, financiados por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional

ÍNDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJECTIVES	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1. Productos y reactivos utilizados	4
3.2. Membranas	5
3.3. Preparación de la muestra	5
3.4. Extracción sólido-líquido	5
3.5. Concentración del extracto mediante procesos con membranas	6
3.6. Caracterización y cuantificación de compuestos de interés	7
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN	7
4.1. Extracción sólido-líquido y pretratamiento del extracto obtenido	7
4.2. Concentración del extracto mediante ultrafiltración	11
4.3. Concentración del extracto mediante nanofiltración	15
5. CONCLUSIONES	18
BIBLIOGRAFÍA	19

ABSTRACT

Olive oil is the main source of nutritional fats in Spain. During its production process, a large amount of lignocellulosic material is generated as waste, mainly olive leaves. These leaves can be used as raw material in biorefineries, due to their high content of phenolic compounds (mainly oleuropein and hydroxytyrosol), sugars and polyols. The main objective of this work has been to study the technical feasibility of a combined water extraction / membrane process for the recovery of sugars and polyols (mainly mannitol, a sugar alcohol used as a sweetener in the food industry) present in olive leaves of the "Serrana de Espadán" variety supplied by Seicas-Mediles (Teresa, Castellón). The extraction of sugars and polyols from dried and ground olive leaves was carried out using Milli-Q water as solvent in a water bath at 50 °C for 24 h, with a 1:20 (w/v) solid/solvent ratio. The obtained extract was concentrated by membrane treatments performed in a high pressure stirred cell, using several flat disc polymeric membranes with different molecular weight cut-offs to obtain a final retentate with most of the soluble carbohydrates, which were characterized and quantified by HPLC-RID. Experimental results showed that a microfiltration (MF) pretreatment of the extract was needed to remove most of the suspended solids and macromolecules, thus minimizing membrane fouling in subsequent ultrafiltration (UF) and nanofiltration (NF) experiments. Best results, with a 99.27% mannitol recovery and more than 99% sugars and polyols rejections, were obtained using a NF90 nanofiltration membrane (200 Da cut-off) under optimal operating conditions (15 bar, 20 °C, 600 rpm), with a minimum loss of compounds of interest and a mannitol concentration of 5.19 g/L in the final retentate.

Keywords: Olive leaves, sugars, mannitol, solid-liquid extraction, microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration.

1. INTRODUCCIÓN

El olivo (*Olea europaea* L.) es una de las primeras plantas cultivadas por el ser humano, cuyo origen se remonta a unos 3000-5000 años antes de Cristo en Palestina, aunque se han hallado hojas fósiles de especies antepasadas del olivo de 35000 años de antigüedad en el sur de las Islas Cícladas, en Grecia. Los restos más antiguos encontrados en la Península Ibérica son los de El Garcel (Almería), pertenecientes al Neolítico (5000 a.C.).

El olivo es la única especie de la familia *Oleaceae* con fruto comestible, del cual se obtiene tanto el aceite de oliva como las aceitunas, alimentos básicos en la dieta mediterránea. El aceite de oliva es actualmente en España el alimento que constituye la principal fuente de grasas nutricionales. En el año 2019 se consumieron en nuestro país 355,85 millones de litros de los tres tipos de aceite de oliva (184,92 de aceite de oliva, 32,56 de aceite de oliva virgen y 138,37 de aceite de oliva virgen extra), con una cuota en volumen del 66,3% del total de aceite consumido y un consumo anual de 7,72 L por habitante (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020).

Debido a las propiedades saludables atribuidas al aceite de oliva, durante las últimas dos décadas se ha incrementado notablemente el cultivo de olivos: se calcula que existen más de 8 millones de hectáreas de cultivo, con más de 1500 millones de olivos, en el mundo, el 98% de las cuales están situadas en la cuenca mediterránea (Peralbo-Molina y Luque de Castro, 2013), siendo España el principal productor y exportador mundial de aceite de oliva. Durante el proceso de obtención de aceite de oliva se generan una serie de subproductos en las almazaras, entre los que destacan los residuos líquidos (alpechín y aguas de lavado) y principalmente los sólidos: orujo, alperujo, huesos de aceituna y ramas y hojas de los olivos.

El presente trabajo se centra en el aprovechamiento de las hojas de olivo. Estos residuos se generan principalmente en la poda de los olivos durante la cosecha y procesamiento de las aceitunas (unos 25 kg anuales por árbol) y en el proceso de separación previo a la molienda de las aceitunas (un 10% del peso de las aceitunas, aproximadamente 1 kg adicional de hojas por cada olivo) (Molina-Alcaide y Yáñez-Ruiz, 2008). En Europa se genera anualmente un volumen aproximado de 10,5 millones de toneladas de biomasa residual y subproductos del aceite de oliva, 9,6 millones de toneladas de subproductos sujetos a valoración (orujo, hojas y hueso) y en torno a 3 millones de toneladas de residuos de poda del olivo (Manzanares y col., 2017).

A pesar de las importantes cantidades generadas de este tipo de residuos, actualmente se desecha la mayor parte y se quema, con el consiguiente aumento de emisiones de CO₂, o bien se deja en el propio olivar como residuo orgánico. En ocasiones sí que se realiza una valorización energética de dichos residuos, empleándose como combustible para generar calor y electricidad (Guinda, 2006). Sin embargo, es fundamental desarrollar nuevos sistemas o tecnologías para aprovechar correctamente estos subproductos, potenciando la sostenibilidad ambiental y minimizando la generación final de residuos. Este problema no es exclusivo de los subproductos de almazara: en Europa, aproximadamente el 33% de los productos alimenticios de consumo humano se convierten en residuos, aumentando hasta el 46% en el caso de frutas y verduras.

Es importante considerar la valorización de residuos, ya que es un pilar fundamental de la economía circular, que involucra además varios sectores (sector primario, sector secundario de transformación y consumidores finales) y que tiene beneficios tanto medioambientales como económicos. Asimismo, los subproductos alimentarios son fuente natural de diversos biocompuestos (proteínas, fibra soluble, oligosacáridos, fosfolípidos, terpenos, fenoles, etc.), de los cuales existe una fuerte demanda en otros

sectores industriales, como el sector de la alimentación humana y animal, la cosmética, la nutracéutica o la industria química (ITACyL, 2021).

Muchos de los compuestos bioactivos presentes en el aceite de oliva y en las aceitunas de mesa, y que proporcionan beneficios nutricionales saludables, como los compuestos fenólicos o polifenoles, también están presentes en las hojas de olivo. Además de estos compuestos, las hojas de olivo también contienen otras sustancias bioactivas de interés como alcoholes de azúcares o polioles, que contienen muchos grupos hidroxilo en su estructura. Los compuestos presentes en la hoja del olivo se pueden agrupar en fenoles simples (hidroxitirosol, tirosol y sus glucósidos), ácidos benzoicos (gálico, vanílico, salicílico, hidroxibenzoico, protocatéquico, vanillina), ácidos cinámicos (cinámico, cafeico, cumarínico, ferúlico, clorogénico, homovanílico), secoiridoides (oleuropeína, 3,4-dihidroxifeniletíl-4-formil-3-formilmetil-4-hexenoato, oleuropeína aglicona, oleurosido, ligstrósido, ligstrósido aglicona), flavonoides (apigenina, hesperidina, luteolina, quercetina, quercitrina, rutina), ácido elenólico, verbascósido y otros compuestos bioactivos (amirina, beta-caroteno, eritrodol, ácido maslínico, ácido oleanólico, beta-sitosterol, escualeno, stigmasterol, tocoferol, ácido ursólico, uvaol, etc.). Entre todos los citados en el grupo de los polifenoles destacan la oleuropeína, verbascósido, luteolina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-glucósido y quercetina, cuyas concentraciones los convierten en los principales biofenoles identificados en las hojas de olivo. Además, todos ellos tienen importantes propiedades biológicas, por lo que la extracción y purificación son una opción excelente para el aprovechamiento y la explotación de las hojas de olivo (Lama-Muñoz y col., 2020; Şahin y Bilgin, 2018; Tsimidou y Papoti, 2010; Zagklis y Paraskeva, 2018).

Por otra parte, también son de gran importancia los polioles, dentro de los cuales destaca el manitol (Figura 1), un hexitol derivado de la manosa o fructosa cuya concentración es elevada en las hojas de olivo y juega un papel importante en la regulación del estrés osmótico de las mismas, pudiendo actuar también como neutralizador de especies de oxígeno reactivo (*ROS scavenger*) (Şahin y Bilgin, 2018). El manitol es el poliol más abundante en el reino vegetal, pudiendo encontrarse de forma natural en alimentos como la remolacha, el apio, las aceitunas o las algas marinas, estando además presente en los exudados de los árboles y en sus ramas y hojas. A escala industrial, el manitol se emplea como edulcorante natural y funcional en la industria alimentaria (aditivo E421) y tiene aplicaciones en diversos ámbitos como en medicina, donde se puede usar como sustituto del plasma sanguíneo y para reducir la tensión ocular en tratamientos de glaucoma, y en la industria química y farmacéutica, donde su actividad diurética hace recomendable su uso en sueros y dietas de enfermos con cálculos renales, así como en algunas dietas para diabéticos; también se emplea como excipiente de medicamentos.

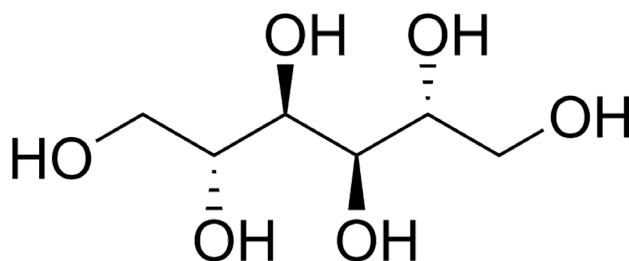


Figura 1. Estructura química de la molécula de manitol.

El manitol se sintetiza industrialmente a partir de la hidrogenación catalítica de jarabes de glucosa o fructosa, como puede ser el jarabe de maíz con alto contenido en fructosa (HFCS, *high fructose corn syrup*) (Schiweck y col., 1994), pero también es interesante su extracción a partir de fuentes naturales como las hojas de olivo y una buena alternativa basada en biomasa.

En el presente trabajo se ha estudiado la recuperación de azúcares y polioles, principalmente manitol, presentes en hojas de olivo, mediante un proceso combinado de extracción con agua y concentración de los extractos utilizando procesos con membranas. La investigación realizada servirá como paso previo para la futura purificación y secado de estos concentrados mediante diferentes técnicas (evaporación, secado por spray, secado con CO₂ supercrítico (PGSS drying), etc.).

2. OBJECTIVES

The main objective of this work has been to study the technical feasibility of a combined water extraction/membrane process for the recovery of soluble carbohydrates (sugars and polyols, mainly mannitol) present in olive leaves generated as a by-product of olive oil production process (more specifically, in the olive tree pruning). The purpose is to take advantage of this agrifood by-product, 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 compounds using water as solvent.
- To characterize the extracts obtained by means of liquid chromatography (HPLC-RID) and to quantify their main soluble carbohydrates.
- To study the technical viability of a membrane treatment (microfiltration followed by ultrafiltration or nanofiltration process) using a high-pressure stirred cell and several flat disc organic membranes to perform the concentration of the extracts obtained.
- To check the effectiveness of the selected membrane process as a concentration stage in terms of soluble carbohydrates, mainly mannitol, recovery.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Productos y reactivos utilizados

Los experimentos se llevaron a cabo con hojas generadas en la poda de olivos de la variedad "Serrana de Espadán", suministradas por Maicas-Sediles (Teresa, Castellón).

Los patrones empleados para la caracterización y cuantificación de los extractos y los diferentes permeados mediante HPLC fueron los siguientes: manitol (>98%, Sigma-Aldrich), xilosa (>99%, Sigma-Aldrich), galactosa (>99%, Glentham), arabinosa (>99%, Sigma-Aldrich), glucosa (>99,5%, Sigma-Aldrich), sacarosa (>99,5%, Sigma-Aldrich) y fructosa (>99%, Fluka).

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 microfiltración (MF), 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 con un área efectiva de 14,6 cm².

Tabla 1. Características de las membranas utilizadas.

Membrana	Proceso	Fabricante	Material	Peso molecular nominal/Diámetro de poro
V0.1	MF	Synder	Fluoruro de polivinilideno (PVDF)	0,1 µm
ST	UF	Synder	Polietersulfona (PES)	10 kDa
MK	UF	Synder	Polietersulfona (PES)	30 kDa
LY	UF	Synder	Polietersulfona (PES)	100 kDa
BY	UF	Synder	Fluoruro de polivinilideno (PVDF)	100 kDa
US100	UF	Microdyn Nadir	Polisulfona (PSU)	100 kDa
NF90	NF	Dow Filmtec	<i>Thin film composite</i> Poliamida (PA-TFC)	200 Da

3.3. Preparación de la muestra

Las hojas de olivo se secaron en un horno convencional a 45 °C durante varios días para reducir su contenido de humedad hasta valores inferiores al 10% (Kashaninejad y col., 2020). A continuación, se realizó una separación de las hojas unidas a las ramas, desechando estas últimas. Posteriormente, las hojas se molieron utilizando un molino de cuchillas (Retsch SM100, Retsch Technology GmbH) para obtener un tamaño de partícula comprendido entre 0,5 y 1 mm, con el fin de aumentar la superficie de contacto y mejorar el rendimiento de extracción posterior de los compuestos de interés. Finalmente, las hojas secas y molidas se almacenaron en el frigorífico a 4 °C hasta su uso posterior, para evitar su degradación.

3.4. Extracción sólido-líquido

Se realizó una extracción sólido-líquido de los componentes de interés presentes en las hojas de olivo secas y molidas, utilizando agua Milli-Q como disolvente, con una relación 1:20 (peso/volumen) determinada como óptima en experimentos previos del grupo de investigación. La extracción se llevó a cabo en un baño de agua (Grant Instruments OLS 200) a 50 °C con agitación durante 24 horas, utilizando 4 matraces Erlenmeyer de vidrio con tapa roscada de 500 mL de capacidad (12,5 g de hojas de olivo y 250 mL de agua en cada matraz).

Una vez realizada la extracción, el extracto obtenido se filtró a vacío en un matraz Kitasato con papel de filtro de laboratorio de 120 mm hasta una presión de 920 mbar, con el fin de separar las partículas sólidas. El extracto filtrado se almacenó en botes de plástico en el frigorífico a 4 °C hasta su uso posterior.

3.5. Concentración del extracto mediante procesos con membranas

Inicialmente se llevó a cabo la centrifugación del extracto obtenido en la etapa anterior a 10000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga Eppendorf 5804 para eliminar los posibles restos sólidos que todavía pudiesen quedar después de la filtración, utilizando tubos Falcon de centrifuga de 50 mL de capacidad. El sobrenadante se almacenó en una probeta y se pesó.

Todos los experimentos con membranas se llevaron a cabo 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 extraíble recubierto de PTFE 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 3 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 el fin de evitar la oxidación de los biocompuestos, 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. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y con una velocidad de agitación entre 400 y 600 rpm sobre la superficie de la membrana.

La 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).

Se realizaron experimentos preliminares con las membranas de ultrafiltración de menor umbral de corte (10 y 30 kDa), utilizando como alimentación el extracto después de centrifugarlo, a una presión de operación de 5 bar. Como se comentará en el apartado 4.1, el rápido ensuciamiento de las membranas indicó la necesidad de pretratar el extracto inicial mediante microfiltración para eliminar los sólidos en suspensión y otras macromoléculas todavía presentes en el mismo. Este pretratamiento mediante MF se llevó a cabo utilizando la membrana V0.1 (cuyas características se muestran en la Tabla 1) a temperatura ambiente, una presión de operación de 3 bar y una agitación de 400 rpm hasta alcanzar un factor de concentración en volumen (FCV) igual a 2.

El permeado obtenido en el proceso de MF se utilizó posteriormente como alimentación en los experimentos posteriores de UF y NF. Se realizaron varios experimentos de UF a una presión de 7 bar utilizando membranas de 100 kDa y diferentes materiales, así como un experimento final de NF a una presión de 15 bar con una membrana de 200 Da.

Todas las muestras obtenidas (permeados, retenidos y alimentación) tras estos procesos con membranas se conservaron en botes de plástico almacenados a temperaturas de refrigeración hasta su uso o análisis posterior.

3.6. Caracterización y cuantificación de compuestos de interés

La caracterización de los compuestos de interés (azúcares y polioles) de las muestras obtenidas se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detector de índice de refracción, utilizando un equipo HPLC-RID Agilent 1260 con una columna Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Como fase móvil se usó una disolución acuosa de H₂SO₄ 10 mM con un flujo de 0.6 mL/min. La columna y el detector se mantuvieron a 40 °C. Se utilizaron carbohidratos solubles puros (xilosa, galactosa, arabinosa, glucosa, sacarosa y manitol) como patrones para el calibrado. Las muestras (extracto inicial y después de la MF, así como los diferentes permeados obtenidos) se filtraron previamente utilizando filtros de jeringa Millipore de 0,22 µm de tamaño de poro para eliminar posibles restos sólidos o partículas más grandes que pudieran interferir en la medida o estropear el equipo. Las medidas se realizaron por duplicado inyectando 10 o 20 µL de muestra. Este método ha sido desarrollado y puesto a punto por el grupo de investigación *Biotecnología Industrial y Medioambiental* (BIOIND) del Área de Ingeniería Química de la Universidad de Burgos.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

4.1. Extracción sólido-líquido y pretratamiento del extracto obtenido

Como se ha mencionado en el apartado 3.4, inicialmente se realizó una extracción sólido-líquido de los compuestos de interés presentes en las hojas de olivo secas y molidas, utilizando agua Milli-Q como disolvente, bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura de 50 °C, velocidad de agitación de 150 rpm y relación masa/volumen de 0,05 g hojas de olivo secas/mL disolvente, durante un tiempo de extracción de 24 horas.

Se procedió a la extracción de los compuestos presentes en 50 g de hojas de olivo secas y molidas utilizando un volumen de disolvente de 1 L. El extracto obtenido se filtró a vacío para eliminar las partículas sólidas. Se obtuvo un volumen final de extracto de 850 mL, el cual se guardó en botes de plástico a 4 °C hasta su uso posterior.

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones, obtenidas mediante HPLC, de los principales azúcares y polioles para este extracto, siendo la sacarosa y el manitol los componentes mayoritarios. Se obtuvo un extracto final con una concentración de 10,930 ± 0,053 g manitol/kg hojas secas, un buen resultado en comparación con las concentraciones de 34,9–35,9 g/kg obtenidas por otros investigadores mediante extracción acuosa en autoclave a 100–130 °C (López-Linares y col., 2019).

Tabla 2. Concentración de los principales azúcares y polioles presentes en el extracto de hojas de olivo.

Compuesto	Concentración	
	g/L	g/kg hojas secas
Sacarosa	0,349 ± 0,016	1,394 ± 0,065
Glucosa	2,771 ± 0,065	11,082 ± 0,261
Xilosa	0,501 ± 0,008	2,003 ± 0,031
Manitol	2,732 ± 0,038	10,930 ± 0,053
Arabinosa	0,195 ± 0,009	0,782 ± 0,037

El objetivo final de este estudio es obtener un extracto concentrado que conserve la mayor parte de los compuestos de interés. En este trabajo se han utilizado los procesos con membranas para lograrlo. La separación con membranas se basa en la permeación preferencial o el 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. Existe un creciente interés hacia los procesos con membranas en los últimos años, ya que 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 procesos con membranas más utilizados industrialmente son aquellos en los que la presión es la fuerza impulsora: microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (OI), clasificados según el orden decreciente del tamaño de poro de la membrana utilizada y en orden creciente de la presión que es necesario aplicar (Manahan, 2006).

Las principales ventajas de esta tecnología son que puede funcionar sin agregar productos químicos tóxicos ni disolventes orgánicos, el consumo de energía es relativamente bajo y la línea de producción es simple y fácil. Actualmente los procesos con membranas son técnica y económicamente competitivos con muchos de los procesos convencionales de separación. Como desventaja, 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; ii) El *ensuciamiento de la membrana*, fenómeno irreversible debido a la acumulación de solutos directamente sobre la superficie de la membrana o 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).

Inicialmente se realizaron experimentos preliminares de concentración utilizando las membranas de ultrafiltración ST y MK, de menor umbral de corte (10 y 30 kDa, respectivamente). Se utilizó como alimentación 200 mL de extracto en cada experimento, sin realizar ningún pretratamiento al mismo excepto una centrifugación para eliminar sólidos en suspensión, y se procedió a la ultrafiltración del mismo a temperatura ambiente (20 ± 1 °C), con una presión de operación de 5 bar y una velocidad de agitación de 400 rpm. Se midió el peso de permeado recogido a lo largo del tiempo de duración del proceso y se calculó la densidad de flujo de permeado (J) 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 (≈ 1000 kg/m³ en este trabajo), t el tiempo de recogida de muestra en horas y A_m es el área efectiva de la membrana (0,00146 m²).

El proceso de concentración se da por finalizado al alcanzar un factor de concentración en volumen (FCV) de 2, 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 2 se muestra la variación de la densidad de flujo de permeado (J) a lo largo del tiempo para estos dos experimentos preliminares. Se puede apreciar la rápida disminución de J (un 50%, aproximadamente) en los primeros minutos de operación en el caso de la membrana de menor umbral de corte (10 kDa). La densidad de flujo de permeado de la membrana de 30 kDa es sensiblemente superior, como cabría esperar, pero disminuye drásticamente a medida que transcurre el proceso de ultrafiltración y alcanza un valor final de J similar ($\approx 17 \text{ L/m}^2 \text{ h}$). Cabe destacar que ambos experimentos tuvieron que detenerse antes de lo previsto, debido a que el elevado grado de ensuciamiento de las membranas apenas permitió alcanzar un FCV de 1,45 y 1,62 para las membranas de 10 y 30 kDa, respectivamente, después de 3 horas de operación.

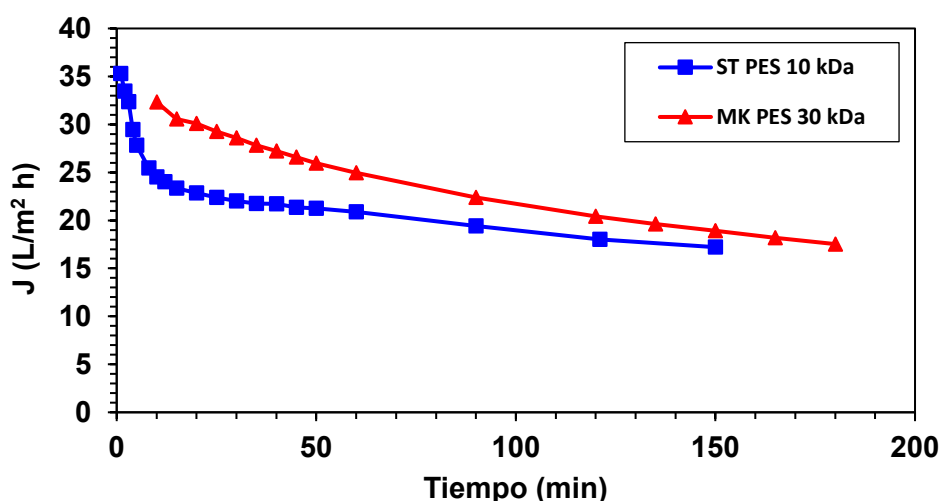


Figura 2. Variación de la densidad de flujo de permeado (J) frente al tiempo durante la ultrafiltración del extracto utilizando las membranas de polietersulfona (PES) ST y MK a 5 bar, 400 rpm y temperatura ambiente.

Se puede concluir que no es posible concentrar directamente el extracto mediante ultrafiltración sin someterlo a un pretratamiento que elimine la mayor parte de los sólidos en suspensión y macromoléculas responsables del gran ensuciamiento de la membrana. Por otra parte, las bajas densidades de flujo de permeado obtenidas también indican la conveniencia de utilizar membranas de mayor corte molecular (100 kDa).

La siguiente etapa consistió en el pretratamiento del extracto mediante microfiltración, utilizando la membrana V0.1, especialmente diseñada, según el fabricante, para la eliminación de sólidos en suspensión. Este pretratamiento mediante MF se llevó a cabo a temperatura ambiente, una presión de operación de 3 bar y una agitación de 400 rpm hasta alcanzar un FCV = 2.

Como puede observarse en la Figura 3, se obtuvo un permeado final transparente, prácticamente libre de sólidos en comparación con la alimentación y el retenido final.

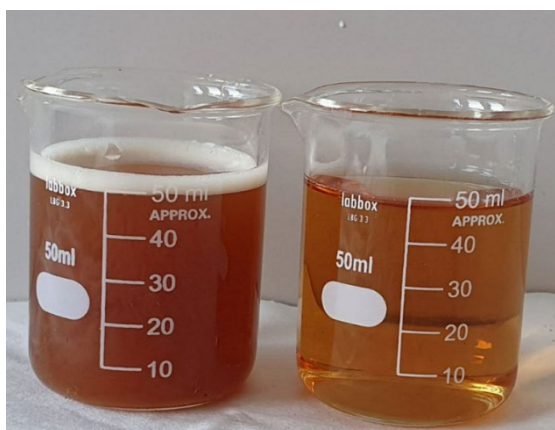


Figura 3. Fotografía del retenido (izquierda) y permeado (derecha) obtenidos tras la microfiltración del extracto.

Las concentraciones de los principales azúcares y polioles en el permeado final, cuyo cromatograma se muestra en la Figura 4, se indican en la Tabla 3 y se comparan con las del extracto inicial utilizado como alimentación. No se ha observado una gran variación en la concentración de estos compuestos en el permeado con respecto al extracto inicial, con retenciones menores del 5–10%, dependiendo del compuesto.

Estos resultados corroboran la idoneidad del pretratamiento del extracto mediante microfiltración. El permeado obtenido en este pretratamiento se utilizó como alimentación en todos los experimentos de UF y NF realizados posteriormente.

Tabla 3. Concentración de los principales azúcares y polioles presentes en el extracto de hojas de olivo antes y después del pretratamiento mediante microfiltración.

Compuesto	Concentración (g/L)	
	Alimentación	Permeado
Sacarosa	0,349 ± 0,016	0,318 ± 0,004
Glucosa	2,771 ± 0,065	2,419 ± 0,004
Xilosa	0,501 ± 0,008	0,480 ± 0,008
Manitol	2,732 ± 0,038	2,668 ± 0,020
Arabinosa	0,195 ± 0,009	0,269 ± 0,071

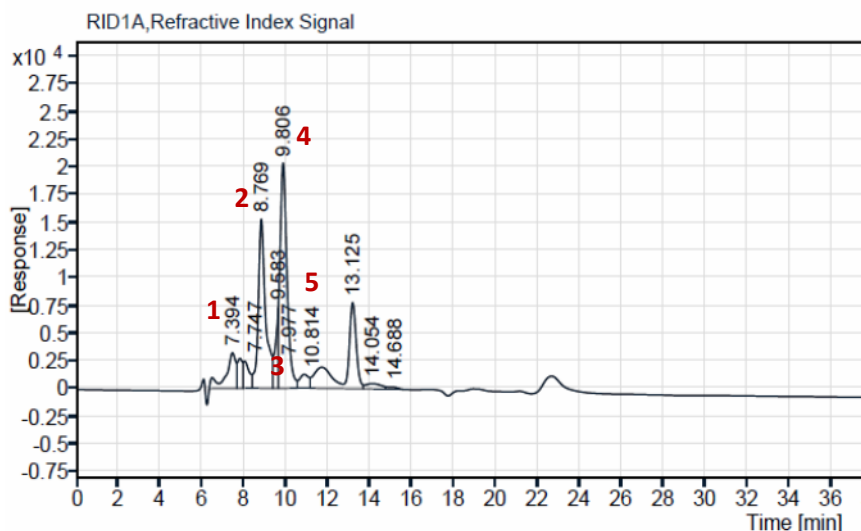


Figura 4. Cromatograma del permeado obtenido tras el pretratamiento del extracto mediante microfiltración. Los picos numerados corresponden a la sacarosa (1), glucosa (2), xilosa (3), manitol (4) y arabinosa (5).

4.2. Concentración del extracto mediante ultrafiltración

Se procedió posteriormente a la ultrafiltración del extracto pretratado, utilizando las 3 membranas de 100 kDa (LY, BY y US100) indicadas en la Tabla 1. Como se ha mencionado anteriormente, en este caso se utilizó como alimentación el permeado obtenido en la etapa de MF del extracto. El volumen de alimentación fue de 200 mL para cada experimento y se procedió a su ultrafiltración a temperatura ambiente, con una presión de operación de 7 bar y una velocidad de agitación de 600 rpm, hasta alcanzar un FCV = 2.

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 de los compuestos de interés en el retenido 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.

También se calculó el porcentaje de recuperación de los distintos compuestos en el retenido final:

$$\% \text{ Recuperación} = \left[1 - \left(\frac{C_p V_p}{C_A V_A} \right) \right] \times 100 \quad (5)$$

La variación de la densidad de flujo de permeado a lo largo del tiempo para los 3 experimentos de UF se muestra en la Figura 5. Se puede observar un comportamiento prácticamente idéntico entre las membranas de polietersulfona (LY) y de fluoruro de

polivinilideno (BY), con bajas densidades de flujo de permeado finales. Sin embargo, a pesar de que las 3 membranas tienen el mismo corte molecular, con la membrana US100 se obtuvieron valores de J hasta un 250% superiores a los de las otras dos membranas, alcanzando un FCV = 2 en la mitad de tiempo. Esto se debe a que, según el fabricante, el material del que está hecha la membrana US100 es polisulfona especialmente tratada para ser altamente hidrofílica.

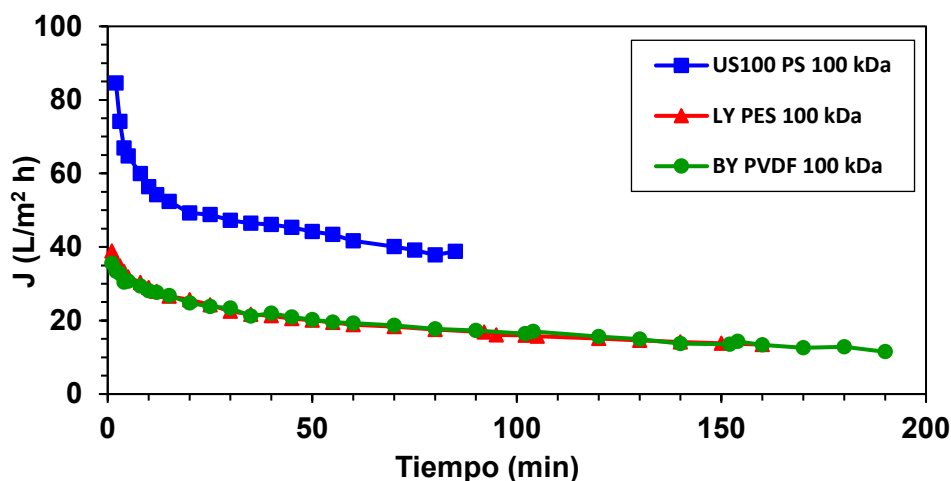


Figura 5. Variación de la densidad de flujo de permeado (J) frente al tiempo durante la ultrafiltración del extracto utilizando las membranas de 100 kDa.

Las fotografías de los permeados y retenidos finales obtenidos después de los experimentos de UF se muestran en la Figura 6. En todos los casos se obtuvo un permeado transparente con un ligero color marrón, lo que indica que sólo una pequeña parte de los solutos han atravesado la membrana y pasado al permeado.

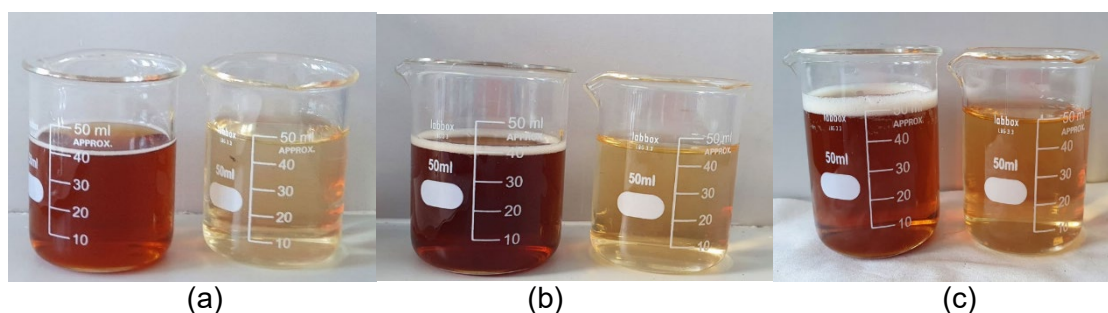
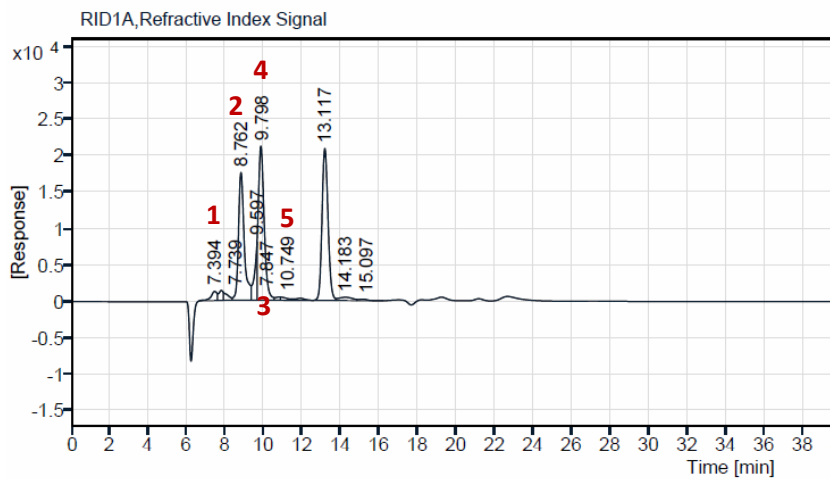
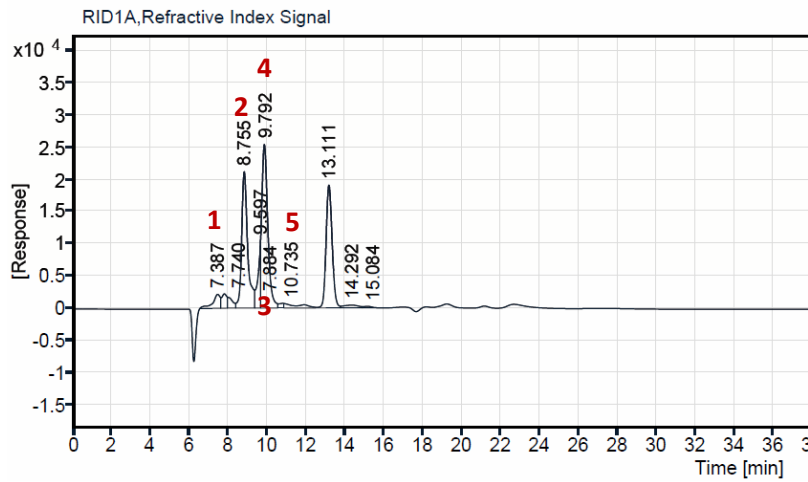


Figura 6. Fotografías de los retenidos (izquierda) y permeados (derecha) obtenidos después de los experimentos de concentración mediante ultrafiltración utilizando las membranas de 100 kDa: (a) PES (LY); (b) PVDF (BY); (c) PS (US100).

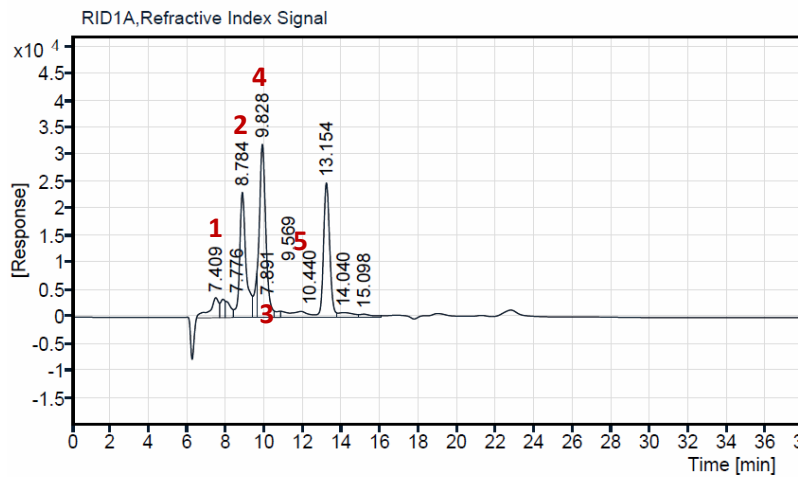
Los elevados valores de J obtenidos con la membrana US100 se ven contrarrestados por el color más oscuro del permeado (Figura 6c), que indica una menor retención de compuestos de interés en el retenido. Las medidas de HPLC realizadas a los permeados (Figura 7) confirmaron posteriormente esta observación, como se puede apreciar en los resultados mostrados en la Tabla 4.



(a)



(b)



(c)

Figura 7. Cromatogramas de los permeados obtenidos después de los experimentos de concentración mediante ultrafiltración utilizando las membranas de 100 kDa: (a) PES (LY); (b) PVDF (BY); (c) PS (US100). Los picos numerados corresponden a la sacarosa (1), glucosa (2), xilosa (3), manitol (4) y arabinosa (5).

Tabla 4. Concentración de los principales azúcares y polioles presentes en la alimentación, permeados (ambas medidas mediante HPLC) y retenidos (calculadas mediante la Ec. (4)) de los experimentos de UF utilizando las membranas de 100 kDa. Se indica también el porcentaje de retención de dichos compuestos, Ec. (3), y el de recuperación de los mismos en el retenido final, Ec. (5).

Membrana LY (PES)	Concentración (g/L)				
	Sacarosa	Glucosa	Xilosa	Manitol	Arabinosa
Alimentación	0,318	2,419	0,480	2,668	0,269
Permeado	0,075	1,193	0,231	1,283	0,078
Retenido	0,538	3,528	0,705	3,921	0,442
R (%)	76,42	50,68	51,88	51,91	71,00
% Recuperación	88,80	76,57	77,14	77,16	86,23

Membrana BY (PVDF)	Concentración (g/L)				
	Sacarosa	Glucosa	Xilosa	Manitol	Arabinosa
Alimentación	0,318	2,419	0,480	2,668	0,269
Permeado	0,129	1,451	0,314	1,530	0,093
Retenido	0,486	3,277	0,627	3,677	0,425
R (%)	59,43	40,02	34,58	42,65	65,43
% Recuperación	80,93	71,81	69,25	73,05	83,75

Membrana US100 (PS)	Concentración (g/L)				
	Sacarosa	Glucosa	Xilosa	Manitol	Arabinosa
Alimentación	0,318	2,419	0,480	2,668	0,269
Permeado	0,187	1,716	0,326	2,034	0,108
Retenido	0,434	3,042	0,617	3,230	0,412
R (%)	41,19	29,06	32,08	23,76	59,85
% Recuperación	72,36	66,66	68,08	64,17	81,13

La retención de los compuestos de interés, y su recuperación en el retenido final, es mayor en el caso de la UF con la membrana de polietersulfona (LY) que con la de PVDF (BY). Los datos de la Tabla 4 indican que dichos parámetros son sensiblemente menores en el caso de la membrana de polisulfona (UF100), que es la que presentaba un mayor valor de J. En todo caso, la retención de manitol es de un 51,91% como máximo cuando se usa la membrana LY y de sólo un 23,76% si se utiliza la US100 (Figura 8), lo que indica que se está perdiendo en el permeado entre un 48 y un 76% del manitol presente en la alimentación dependiendo de la membrana utilizada, por lo que no se consigue alcanzar el objetivo propuesto. Este porcentaje de retención de polisacáridos es menor que el encontrado en la bibliografía para experimentos de UF de efluentes generados en la industria vinícola (Giacobbo y col., 2013).

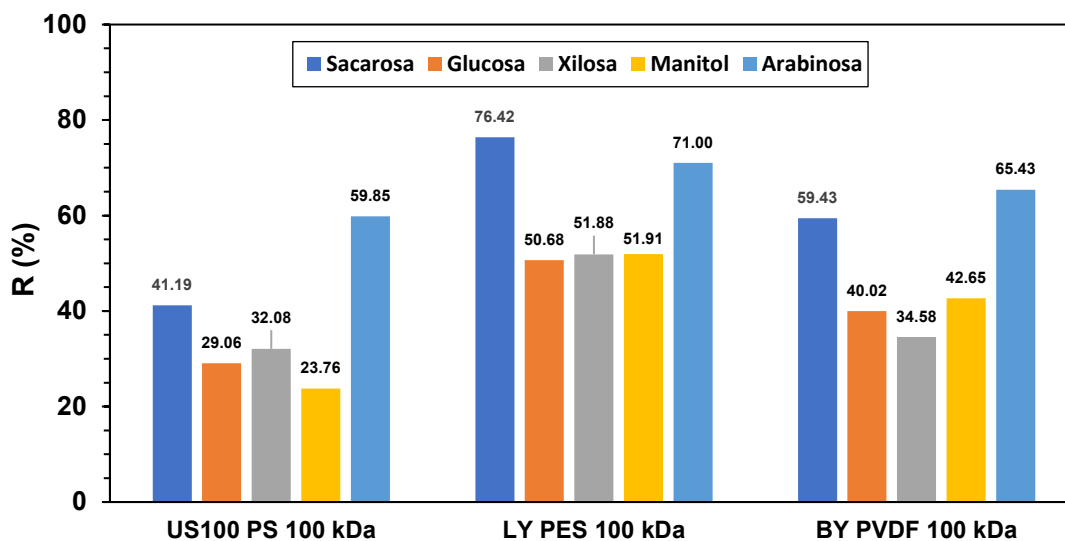


Figura 8. Comparación de los porcentajes de retención de los distintos azúcares y polioles obtenidos con las tres membranas de ultrafiltración empleadas en este trabajo.

4.3. Concentración del extracto mediante nanofiltración

Finalmente, con el fin de mejorar la retención de los compuestos, se estudió también la nanofiltración del extracto pretratado mediante MF. Para ello se utilizó la membrana de poliamida (NF90) de 200 Da de corte molecular. El volumen de alimentación fue en este caso de 100 mL y se procedió a la NF a temperatura ambiente, con una presión de operación de 15 bar y una velocidad de agitación de 600 rpm, hasta alcanzar también un FCV = 2, con el fin de poder comparar los resultados con los obtenidos anteriormente mediante UF.

Como puede verse en la Figura 9, aunque el valor de la densidad de flujo de permeado es menor, debido al mucho menor corte molecular de la membrana de NF (200 Da frente a 100 kDa), la disminución de J a lo largo del tiempo para esta membrana de NF (51%) es menos acusada que la que tenía lugar con las membranas de UF (54–68%, Figura 5), logrando concentrar 2 veces la alimentación (FCV = 2) en menos de 3 horas de proceso, con una J final de 8 L/m² h frente a los 11,5 L/m² h alcanzados con las membranas LY y BY de 100 kDa.

La fotografía de las corrientes finales obtenidas después de la nanofiltración (Figura 10) muestra un permeado prácticamente incoloro, indicativo de una muy baja concentración de solutos en el mismo. Los cromatogramas mostrados en la Figura 11 confirman la ausencia de prácticamente todos los azúcares y polioles en el permeado y su presencia en el retenido final, apreciándose unos picos y áreas mucho mayores en éste que en el permeado.

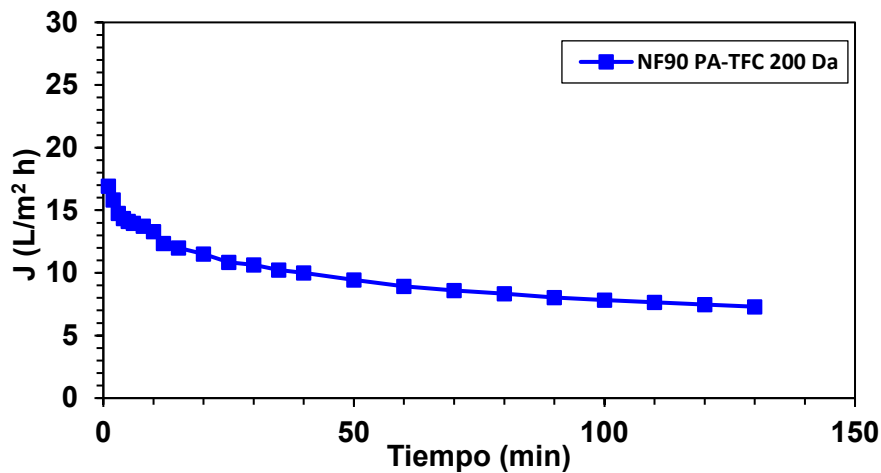
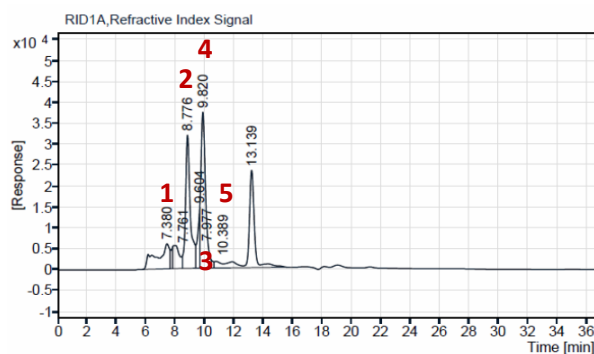


Figura 9. Variación de la densidad de flujo de permeado (J) frente al tiempo durante la nanofiltración del extracto utilizando la membrana de 200 Da.

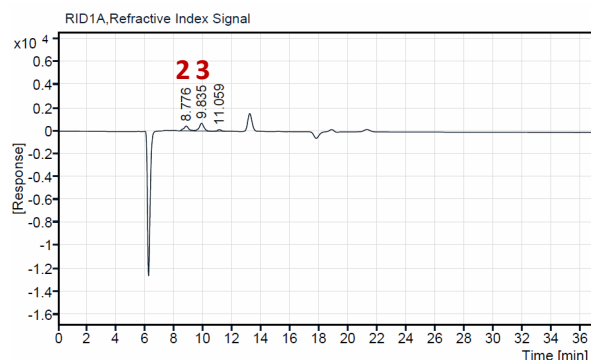


Figura 10. Fotografía del retenido (izquierda) y permeado (derecha) obtenidos después del experimento de concentración mediante nanofiltración utilizando la membrana NF90 (200 Da).

En la Tabla 5 se recogen las concentraciones de los diferentes compuestos de interés tras el proceso de NF, tanto en la alimentación inicial como en las corrientes finales de permeado y retenido. Con la concentración del extracto mediante nanofiltración se consigue un porcentaje de retención de azúcares y polioles superior al 98,5%, con excepción de la glucosa (85,53%). El porcentaje de recuperación de estos compuestos en el retenido de NF final es superior al 92%, siendo del 99,27% para el manitol (con una concentración final de aproximadamente 5,2 g/L en el retenido), muy superior al obtenido en los experimentos de concentración mediante UF (Figura 12).



(a)



(b)

Figura 11. Cromatogramas del retenido (a) y el permeado (b) obtenidos después del experimento de concentración mediante nanofiltración utilizando la membrana NF90 (200 Da). Los picos numerados corresponden a la sacarosa (1), glucosa (2), xilosa (3), manitol (4) y arabinosa (5).

Tabla 5. Concentración de los principales azúcares y polioles presentes en la alimentación, permeado (ambas medidas mediante HPLC) y retenido (calculadas mediante la Ec. (4)) del experimento de NF utilizando la membrana NF90 (200 Da). Se indica también el porcentaje de retención de dichos compuestos, Ec. (3), y el de recuperación de los mismos en el retenido final, Ec. (5).

Membrana NF90 (PA-TFC)	Concentración (g/L)				
	Sacarosa	Glucosa	Xilosa	Manitol	Arabinosa
Alimentación	0,318	2,419	0,480	2,668	0,269
Permeado	0	0,350	0,006	0,040	0
Retenido	0,624	4,407	0,935	5,193	0,527
R (%)	100	85,53	98,75	98,50	100
% Recuperación	100	92,91	99,39	99,27	100

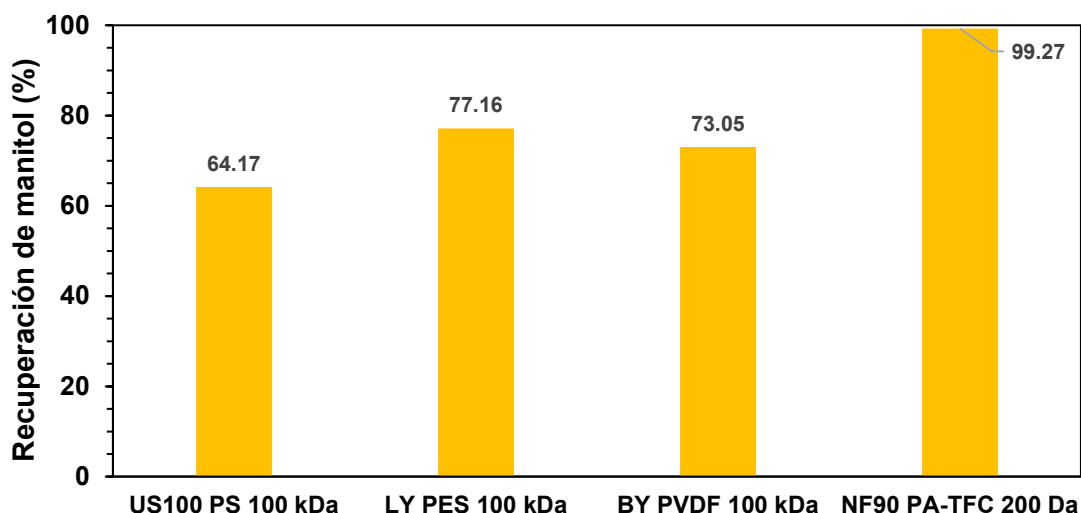


Figura 12. Porcentaje de recuperación de manitol en el retenido final para las diferentes etapas de concentración del extracto utilizando las membranas de UF y NF.

A diferencia de los experimentos de UF, en este caso sí se consigue el objetivo propuesto, ya que se logra retener la mayoría de los compuestos de interés en general y de manitol en particular, con poca o ninguna pérdida de los mismos en el permeado. Este permeado podría usarse para la limpieza posterior de la membrana o recircularse de nuevo a la etapa de extracción sólido-líquido para su reutilización.

5. CONCLUSIONES

Se ha estudiado la viabilidad técnica de un proceso combinado de extracción con agua y concentración de los extractos utilizando procesos con membranas para la recuperación y concentración de azúcares y polioles, principalmente manitol, presentes en hojas de olivo de la variedad “Serrana de Espadán”. La extracción de estos compuestos se llevó a cabo con agua Milli-Q a 50 °C durante 24 horas, con una relación sólido/disolvente 1:20 (peso/volumen), obteniendo un extracto final con una concentración, determinada mediante HPLC-RID, de $10,930 \pm 0,053$ g manitol/kg hojas secas.

La concentración del extracto se llevó a cabo mediante procesos con membranas, con el fin de obtener una corriente final de retenido que conserve la mayor parte de los compuestos de interés. Los experimentos preliminares de ultrafiltración del extracto, previamente sometido a una centrifugación para eliminar los sólidos en suspensión, utilizando membranas poliméricas planas en una celda de alta presión a 5 bar y temperatura ambiente, mostraron un rápido ensuciamiento de las membranas que impidió una concentración adecuada. Estos resultados indicaron la imposibilidad de concentrar directamente el extracto mediante ultrafiltración sin someterlo a un pretratamiento que elimine la mayor parte de los sólidos en suspensión y macromoléculas con el fin de minimizar el ensuciamiento de la membrana.

El pretratamiento del extracto mediante microfiltración (MF), utilizando la membrana V0.1 fabricada en PVDF y con un tamaño de poro de $0,1 \mu\text{m}$, realizado a temperatura ambiente y a una presión de operación de 3 bar hasta alcanzar un FCV = 2, dio como resultado un permeado final transparente, prácticamente libre de sólidos en suspensión

en comparación con la alimentación y el retenido final, con retenciones menores del 5–10% de azúcares y polioles. Este permeado se utilizó como alimentación en todos los experimentos realizados posteriormente.

Los resultados de la ultrafiltración del extracto pretratado, utilizando membranas de 100 kDa de umbral de corte y fabricadas en diferentes materiales, realizados a 7 bar hasta alcanzar un FCV = 2, indicaron un comportamiento prácticamente idéntico entre las membranas de polietersulfona (LY) y de fluoruro de polivinilideno (BY), con bajas densidades de flujo de permeado (J) finales. Sin embargo, con la membrana de polisulfona altamente hidrofílica (US100) se obtuvieron valores de J hasta un 250% superiores a los de las otras dos membranas, alcanzando un FCV = 2 en la mitad de tiempo, pero obteniendo un retenido final con una menor concentración de los compuestos de interés. La retención de estos compuestos de interés es mayor en el caso de la UF con la membrana de polietersulfona (LY) que con la de PVDF (BY). La retención de manitol es de un 51,91% como máximo cuando se usa la membrana LY y de sólo un 23,76% si se utiliza la US100, lo que indica que se está perdiendo en el permeado entre un 48 y un 76% del manitol presente en la alimentación, dependiendo de la membrana utilizada, por lo que no se consigue alcanzar el objetivo propuesto.

Finalmente, se estudió también la nanofiltración del extracto pretratado con el fin de mejorar la retención de los compuestos, utilizando una membrana de poliamida (NF90) de 200 Da de corte molecular y operando a 15 bar de presión hasta alcanzar también un FCV = 2. Se observó una disminución de J menos acusada (51%) que la que tenía lugar con las membranas de UF (54–68%), obteniendo un permeado final incoloro, y un porcentaje de recuperación en el retenido final superior al 99% para prácticamente todos los compuestos de interés, siendo del 99,27% para el manitol (con una concentración final de 5,19 g/L en el retenido), muy superior al obtenido en los experimentos de concentración mediante UF. En este caso sí se logra alcanzar el objetivo propuesto, obteniendo un retenido con la mayor parte de los compuestos de interés en general y de manitol en particular, con poca o ninguna pérdida de los mismos en el permeado. Este permeado podría reutilizarse para la limpieza posterior de la membrana o recircularse de nuevo a la etapa de extracción sólido-líquido.

BIBLIOGRAFÍA

Giacobbo, A., Oliveira, M., Duarte, E.C.N.F., Mira, H.M.C., Bernardes, A.M., de Pinho, M.N. (2013). "Ultrafiltration based process for the recovery of polysaccharides and polyphenols from winery effluent". *Separation Science and Technology*, 48, 438–444. <https://doi.org/10.1080/01496395.2012.725793>

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. <https://doi.org/10.1080/10408690091189293>

Guinda, Á. (2006). "Use of solid residue from the olive industry". *Grasas y Aceites*, 57(1), 107–115. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.26>

ITACyL (2021). "Valoración de subproductos". <http://www.itacyl.es/investigacion-e-innovacion/i-i-alimentaria/valoracion-de-subproductos> (Última consulta: 9 de marzo de 2021)

Kashaninejad, M., Sanz, M.T., Blanco, B., Beltrán, S., Niknam, S.M. (2020). "Freeze dried extract from olive leaves: valorisation, extraction kinetics and extract

characterization". *Food and Bioproducts Processing*, 124, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.015>

Lama-Muñoz, A., Contreras, M.M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., Castro, E. (2020). "Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids". *Food Chemistry*, 320, 126626. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126626>

López-Linares, J.C., Moya, M., Peláez, L., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., Castro, E. (2019). "Valorización de hoja de almazara en el contexto de una biorrefinería. Extracción acuosa en autoclave". *Afinidad*, 76(586), 93–102. <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/359037/451063>

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

Manzanares, P., Ruiz, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., Gallego, F.J., López-Linares, J.C., Castro, E. (2017). "Residual biomass potential in olive tree cultivation and olive oil industry in Spain: valorization proposal in a biorefinery context". *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(3), e0206. <https://revistas.inia.es/index.php/sjar/article/view/10868>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2020). "Informe del consumo alimentario en España 2019". Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/eu/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/default.aspx> (Última consulta: 12 de marzo de 2021)

Molina-Alcaide, E., Yáñez-Ruiz, D.R. (2008). "Potential use of olive by-products in ruminant feeding: a review". *Animal Feed Science and Technology*, 147, 247–264. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.021>

Peralbo-Molina, Á., Luque de Castro. M.D. (2013). "Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry". *Trends in Food Science and Technology*, 32, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.007>

Şahin, S., Bilgin, M. (2018). "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. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8619>

Schiweck, H., Bär, A., Vogel, R., Schwarz, E., Kunz, M. (1994). "Sugar alcohols". En: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A25, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 413–437.

Tsimidou, M.Z., Papoti, V.T. (2010). "Bioactive ingredients in olive leaves". En: V.R. Preedy, R.R. Watson (Eds.) *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Academic Press, London, pp. 349–356.

Zagklis, D.P., Paraskeva, C.A. (2018). "Isolation of organic compounds with high added values from agro-industrial solid wastes". *Journal of Environmental Management*, 216, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.083>