

TRABAJO DE FINAL DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

**EVALUACIÓN DE RESINAS POLIMÉRICAS PARA
LA RECUPERACIÓN DE POLIFENOLES
PROCEDENTES DE HOJAS DE OLIVOS**



Memoria y Anexos

Autor/a: Verónica Ramos
Director/a: José Luis Cortina Pallas
Co-Director/a: Mònica Reig Amat
Tutora externa: Mercè Granados Juan
Convocatoria: Enero 2022

1. RESUMEN

Debido a la constante búsqueda de contribuir en la economía circular a través de la valorización y reciclaje de los residuos, y tomando en cuenta que la producción de aceite de oliva es una de las actividades industriales más importantes en el país, se estudian soluciones sostenibles para la recuperación de polifenoles a partir de residuos de la industria del aceite de oliva y de los cultivos de olivos. Para ello, se investigan los mejores métodos para su extracción, separación y purificación, con el objetivo de convertirlos en productos de alto valor añadido para otras industrias.

En este proyecto, se realizó la extracción de polifenoles a partir de las hojas de olivo, siendo este un subproducto a aprovechar del cultivo de olivos y una importante fuente de antioxidantes. Para la extracción se utilizó cloruro de colina y glicerol en una relación molar 1:5 con 30% de agua como disolvente eutéctico profundo, caracterizado por ser amigable ecológicamente. Posteriormente, en una primera etapa, se evaluaron diferentes resinas poliméricas (no funcionalizadas y de intercambio iónico) para la purificación de los polifenoles a través de la metodología “batch”, esto con el fin de seleccionar la resina con mayor rendimiento. Se obtuvo que los adsorbentes no funcionalizados (PAD 900, PAD 950, PAD 610, MN-202) presentaron un mayor porcentaje de recuperación de los compuestos de polifenoles de interés (3-hidroxitirosol, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico) que las resinas de intercambio iónico (A869, A520e, A500p). Los estudios realizados de adsorción y desorción demostraron que las resinas PAD 900 y MN-202, con una relación sólido:líquido de 1:20 de cantidad de resina:volumen de extracto, alcanzaron un porcentaje de recuperación mayor al 90% en cuatro de los cinco compuestos de interés.

En una segunda etapa, se procedió a estudiar la cinética de adsorción de las resinas seleccionadas. La adsorción del 3-hidroxitirosol fue menos eficiente para la resina PAD 900, mientras que para la resina MN-202 presentó un porcentaje de adsorción mayor, siendo éste superior al 60%. Así mismo, se observó que el equilibrio de interacción entre la resina y el volumen del extracto se alcanzó a los 60 minutos para ambas resinas. Para la optimización de la desorción según el porcentaje de etanol empleado (20%, 50%, 80%, 90% y 100%) se obtuvo que es suficiente un porcentaje de 80% etanol para obtener una recuperación mayor al 80% en al menos cuatro de los cinco compuestos de interés. Finalmente, para el estudio de la cinética de desorción en las resinas seleccionadas, se obtuvo que la resina PAD 900 tuvo un porcentaje de desorción superior al 70% en cuatro de los cinco compuestos de interés, mientras que para MN-202 solo tres de los cinco compuestos de interés alcanzaron una desorción mayor al 70%.

2. RESUM

A causa de la recerca constant de contribuir a l'economia circular a través de la valorització i reciclatge dels residus, i tenint en compte que la producció d'oli d'oliva és una de les activitats industrials més importants al país, s'estudien solucions sostenibles per a la recuperació de polifenols a partir de residus de la indústria de l'oli d'oliva i dels cultius d'oliveres. Per això, s'investiguen els millors mètodes per a l'extracció, la separació i la purificació, amb l'objectiu de convertir-los en productes d'alt valor afegit per a altres indústries.

En aquest projecte, es va realitzar l'extracció de polifenols a partir de les fulles d'olivera, aquest és un subproducte a aprofitar del cultiu d'oliveres i una important font d'antioxidants. Per a l'extracció es va utilitzar clorur de colina i glicerol en una relació molar 1:5 amb 30% d'aigua com a dissolvent eutèctic profund, caracteritzat per ser amigable ecològicament. Posteriorment, en una primera etapa, es van avaluar diferents resines polimèriques (no funcionals i d'intercanvi iònic) per a la purificació dels polifenols a través de la metodologia "batch", per tal de seleccionar la resina amb més rendiment. Es va obtenir que els adsorbents no funcionalitzats (PAD 900, PAD 950, PAD 610, MN-202) van presentar un percentatge més alt de recuperació dels compostos de polifenols d'interès (3-hidroxitirosol, luteolina-7-glucòsida, apigenina-rutinòsid, kaemp -7-glucosida i àcid p-cumàric) que les resines d'intercanvi iònic (A869, A520e, A500p). Els estudis realitzats d'adsorció i desorció van demostrar que les resines PAD 900 i MN-202, amb una relació sòlid: líquid de 1:20 de quantitat de resina: volum d'extracte, van assolir un percentatge de recuperació major al 90% en quatre dels cinc compostos d'interès.

En una segona etapa, es va estudiar la cinètica d'adsorció de les resines seleccionades. L'adsorció del 3-hidroxitirosol va ser menys eficient per a la resina PAD 900, mentre que per a la resina MN-202 va presentar un percentatge d'adsorció més gran, sent aquest superior al 60%. Així mateix, es va observar que l'equilibri d'interacció entre la resina i el volum de l'extracte va arribar als 60 minuts per a les dues resines. Per a l'optimització de la desorció segons el percentatge d'etanol emprat (20%, 50%, 80%, 90% i 100%) es va obtenir que n'hi ha prou amb un percentatge de 80% etanol per obtenir una recuperació major al 80% almenys quatre dels cinc compostos d'interès. Finalment, per a l'estudi de la cinètica de desorció a les resines seleccionades, es va obtenir que la resina PAD 900 va tenir un percentatge de desorció superior al 70% en quatre dels cinc compostos d'interès, mentre que per a MN-202 només tres dels cinc compostos d'interès van assolir una desorció superior al 70%.

3. ABSTRACT

Due to the ongoing effort to support the circular economy by valuing and recycling waste, and taking into account that the production of olive oil is one of the country's most significant industrial activities, sustainable solutions for the recovery of polyphenols from waste from the olive oil industry and olive cultivation are being researched. As a result, research is being done to find the best methods for extracting, separating, and purifying them in order to turn them into high-value added products for other industries.

This project involved the extraction of polyphenols from olive leaf, being a byproduct of olive farming and a valuable source of antioxidants. As a deep-solvent eutectic known for being environmentally friendly, choline chloride and glycerol were used for extraction at a ratio of 1:5 with 30% water. To choose the resin with the best performance, various polymer resins (both non-functional and ion exchange) were subsequently tested in the first stage for the purification of polyphenols using the “batch” methodology. It was discovered that the non-functionalized adsorbents (PAD 900, PAD 950, PAD 610, and MN-202) had a higher percentage of recovered polyphenol of interest (3-hydroxytyrosol, luteolin-7-glucoside, apigenin-rutinoside, kaempferol-7-glucoside, and acid p-coumaric) than the ion exchange resins (A869, A520e, A500p). The adsorption and desorption studies showed that the resins PAD 900 and MN-202, with a solid-to-liquid ratio of 1:20 for resin quantity to extract volume, achieved a higher recovery percentage of 90% in four of the five target compounds.

In a subsequent stage, the selected resins' adsorption cinétique was investigated. While the adsorption of 3-hydroxytyrosol was less effective for resin PAD 900, it was more effective for resin MN-202, with an adsorption percentage that was more than 60%. As a result, it was observed that for both resins, the equilibrium of interaction between the resin and the amount of the extract was reached after 60 minutes. According to the optimization of the desorption following the ethanol content used (20%, 50%, 80%, 90%, and 100%), it was found that an ethanol 80% is adequate to obtain a recovery greater than 80% in at least four of the five interest compounds. Finally, it was shown that the resin PAD 900 had a desorption percentage greater than 70% in four out of the five interest polyphenols, but MN-202 only had a desorption percentage greater than 70% in three out of the interest compounds.

4. AGRADECIMIENTOS

Se hace inevitable pensar que este trabajo no hubiese sido posible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este proyecto llegue a un feliz término. Por esta razón, para ser justa y consecuente con ellos, es para mí un verdadero honor utilizar estas líneas para expresarles mis eternos agradecimientos a todos los involucrados.

Primero, agradezco a la vida, al universo y a mi fe por las experiencias vividas, por el camino recorrido, por los obstáculos que me fortalecieron, por las lecciones aprendidas, por el crecimiento personal y profesional que es lo que me ha traído hasta este momento. Gracias a mis padres, Marilena Calero y César Ramos por ser siempre el motor que impulsa mis sueños y esperanzas, por ser mis guías, ejemplo de perseverancia y fortaleza y mi más grande apoyo incondicional y por su gran amor.

Gracias a la Universidad Simón Bolívar y a todos sus profesores por ser fuente de conocimiento, de experiencias y de grandes oportunidades a lo largo de estos años. Gracias a la Universitat Politècnica de Catalunya y la Universitat de Barcelona por abrirme sus puertas y permitirme aprender y crecer como profesional. Gracias a José Luis Cortina, mi tutor, por la oportunidad y por confiar en mí para la realización de este trabajo. Gracias a Mercè Granados, Sonia Sentellas y Xavi Saurina por su dedicación, consejos y seguimiento diario del proyecto en el laboratorio. Gracias a Mònica por sus respectivas sugerencias y correcciones al trabajo. Gracias a Aina por su constante apoyo, por su paciencia y por ser guía no solo para este trabajo sino también en mi vida.

Agradezco profundamente a Omaira Sardá y Manuel Zambrano por su cálida hermandad y apoyo incondicional, a mis mujeres con propósitos, Mayrim Calles y Carllys Peña, por estar siempre presente y por sus palabras de aliento. A Samuel Zambrano y Pedro Pérez por su apoyo invaluable en las distintas etapas de mi vida. Gracias a ustedes por ser familia.

Agradezco a mis amigos de siempre, a los que también me han visto crecer y evolucionar y a los que me han apoyado de una u otra manera: Tephi, Osmary, Gabito, Hector L., Danichin, Jesús S., Valen, Egidio, Andrés J., Bea A., y Joseline. Agradezco a los amigos que llegaron a mi vida durante este gran viaje y de quienes he aprendido muchísimo: Nadi Rocha, Carmencita, Alejo, Giulia, Megan, Alessio y Hannes por ser la familia que Barcelona me dió, a los amigos de la *Unidad de Atención a la Víctima*, a Bea F., Nerea, José V., Alessandro, David, Camilo y Patrick por su cariño y compañía en esta gran aventura.

A todos ustedes, gracias por los buenos momentos, por vivir las conexiones, por las enseñanzas, por ver en mí el potencial que puedo dar, por creer en mí incluso cuando ni yo misma creía.

Por su apoyo incondicional, mis logros también son suyos. Gracias totales.

ÍNDICE

1. RESUMEN	II
2. RESUM	III
3. ABSTRACT	IV
4. AGRADECIMIENTOS	v
5. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos del trabajo	2
■ Objetivos específicos	2
1.2. Alcance del trabajo	3
1. ESTADO DEL ARTE	4
1.1. Oliva (<i>Olea europaea</i>)	4
1.1.1. Variedad Arbequina	5
1.1.2. Variedad Verdiella	6
1.2. Producción del aceite de oliva	6
1.3. Polifenoles	8
1.3.1. Ácidos fenólicos	8
1.3.2. Flavonoides	9
1.3.2.1. Grupo de isoflavonas, flavonoides y chalconas.	9
1.3.2.2. Grupo de flavonoles y proantocianidinas	9
1.3.2.3. Grupo de antocianidinas	9
1.3.3. Amidas polifenólicas	10
1.4. Polifenoles naturales presentes en las hojas de oliva	10
1.5. Disolventes eutécticos profundos	11
1.6. Adsorbentes poliméricos	12
1.7. Extracción, separación y purificación de polifenoles	14
1.8. Economía circular	15
1.8.1. Definición de economía circular	15
2. METODOLOGÍA	16
2.1. Reactivos e instrumentación	16
2.1.1. Muestra	16
2.1.2. Resinas	16
2.1.3. Patrones	18
2.1.4. Solventes	18
2.1.5. Otros reactivos	18

2.1.6. Instrumentación	19
• Equipo HPLC-UV	19
• Otros instrumentos	19
2.2. Procedimientos	19
2.2.1. Preparación de patrones	19
2.2.2. Preparación del solvente eutéctico profundo	19
2.2.3. Extracción sólido-líquido (Lixiviación)	20
2.2.4. Purificación de polifenoles utilizando resinas poliméricas	21
2.2.4.1. Experimento en batch con resinas no funcionalizadas	21
2.2.4.2. Experimento en batch con resinas de intercambio iónico	22
2.2.4.3. Adsorción y optimización en la desorción de resinas seleccionadas	22
2.2.4.4. Desorción de las resinas seleccionadas	23
2.2.5. Análisis cromatográficos de polifenoles	23
3. RESULTADOS EXPERIMENTALES	26
3.1. Experimentos en batch	26
3.2. Selección de la resina polimérica a optimizar	26
3.2.1. Estudios de purificación de extractos de polifenoles con resinas poliméricas no funcionalizadas	26
3.2.1.1. Adsorción y desorción	26
3.2.2. Estudios de purificación de extractos de polifenoles con resinas poliméricas de intercambio iónico.	30
3.2.2.1. Adsorción y desorción	30
3.2.3. Comparación entre las resinas poliméricas no funcionalizadas y de intercambio iónico	32
3.3. Estudios de purificación de polifenoles con resinas seleccionadas	33
3.3.1. Cinética de adsorción	33
3.3.2. Optimización de desorción según el contenido de etanol	34
3.3.3. Cinética de desorción	36
4. ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL	40
5. ANÁLISIS ECONÓMICO	43
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS	50

5. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se tiene que en Europa un 12% de los alimentos se desperdicia en la etapa de manipulación y almacenamiento previo a la transformación, un 5% se pierde en la etapa de procesamiento y un 9% se desperdicia en la etapa de distribución y comercialización, siendo estas cifras causa de preocupación a nivel mundial por las consecuencias económicas, sociales y sobre todo por el coste medioambiental que acarrear (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2022). Es por esto que, de acuerdo a los objetivos sostenibles mundiales, han surgido nuevos modelos económicos, como la economía circular, que busca aprovechar los residuos industriales para generar un recurso útil para otras industrias, reduciendo así el consumo de recursos naturales y la generación de desperdicios industriales (Geissdoerfer, M. et al. 2016).

En este contexto, se ha visto que el cultivo de olivos es una de las actividades agrícolas más importantes realizadas en los países mediterráneos, en especial en España, siendo estos países los que proporcionan el 98% de la producción de aceitunas mundial (Souliem, S. et al. 2016). Las hojas de olivo representan uno de los principales subproductos tanto del cultivo como de la industria de transformación de la aceituna y se acumulan en grandes volúmenes durante la poda de los árboles, el cual representa el 10% del peso de las aceitunas recolectadas ya sea para ser consumidas como aceitunas de mesa o para la extracción de aceite de oliva. Dichas hojas de olivo han despertado gran interés puesto que investigaciones recientes demuestran que tienen un efecto positivo en la salud debido a su alto contenido en polifenoles, siendo estos compuestos beneficiosos debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, entre otros. (Clodoveo, M. L. 2021)

Tomando en consideración la cantidad enorme de residuos de hojas de olivo generados sin aplicaciones prácticas que causan problemas económicos y medioambientales debido a su retirada, almacenamiento y eliminación y considerando que es un recurso beneficioso para el hombre que se puede aprovechar utilizándose para obtener productos de valor añadido como antioxidantes, oligosacáridos, proteínas mediante procesos químicos, surge el interés de la revalorización de estos subproductos a través del diseño de métodos de extracción más rentable y sostenible para preparar los extractos de hojas de olivo.

En este estudio, la metodología utilizada para la extracción de los compuestos de polifenoles es la extracción sólido-líquido y dado que se buscan disolventes más amigables con el medio ambiente, se utiliza en este caso los disolventes eutécticos profundos, el cual está formado por un aceptor de enlaces de hidrógenos y donador de enlaces de hidrógeno y tienen la característica principal de que su punto de fusión es mucho menor al punto de fusión de los compuestos por separado (Smith, E. L. et al, 2014).

La separación y purificación de polifenoles, supone un proceso complicado puesto que se trata de mezclas complejas, es por esto que una opción práctica para la separación y purificación de los polifenoles es utilizar procesos de adsorción y desorción con resinas poliméricas. Dicho proceso consiste en retener los polifenoles que están en el extracto sobre la superficie de una resina para luego ser desorbidos con un líquido, que al tratarse de la industria agroalimentaria se limita fundamentalmente a agua y etanol (Cáceres, A. 2021). Dichos procesos son estudiados en batch con las resinas y una vez realizado el mismo, se utiliza la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV para la determinación de los polifenoles de interés y así poder evaluar su retención y recuperación.

1.1. Objetivos del trabajo

El objetivo principal de este proyecto es estudiar la purificación de los polifenoles procedentes del extracto de hojas de olivo a través de la evaluación de diferentes resinas poliméricas.

■ Objetivos específicos

- Evaluar diferentes resinas poliméricas (no funcionalizadas y de intercambio iónico) a las mismas condiciones para seleccionar la que proporciona los mejores rendimientos tanto en la adsorción como en la desorción de los polifenoles en el extracto de hojas de olivo.
- Estudiar la cinética de adsorción y desorción de las resinas seleccionadas mediante los estudios realizados en batch.
- Optimizar la elución de las resinas seleccionadas en función a las propiedades del eluyente.

1.2. Alcance del trabajo

Este trabajo forma parte del proyecto de Caracterización y revalorización de residuos de industrias agroalimentarias llevado a cabo por el grupo de investigación RECYCLE, del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Barcelona.

Este trabajo se divide en dos partes: en la primera parte se evalúan las capacidades de adsorción y desorción a un solo tiempo de resinas poliméricas no funcionalizadas y de intercambio iónico. Para esto se realiza extracción sólido:líquido a una condición (80°C durante 2 horas) con la muestra de hojas de olivo y solventes eutécticos profundos a una sola relación sólido:líquido (1:20). Para éste último sólo se utiliza cloruro de colina con glicerol a una sola condición de preparación (Relación molar 1:5 con 30% agua a 60°C), queda fuera de este trabajo las pruebas con diferentes tipos de solventes eutécticos profundos y a distintas condiciones. Para las resinas de intercambio iónico se modifica el pH del extracto original a solo un pH básico para conocer la influencia del pH en la etapa de adsorción. Finalmente, a partir del porcentaje de recuperación se seleccionan las resinas que presentan un mejor rendimiento.

En una segunda etapa, se estudia la cinética de adsorción y desorción de las resinas seleccionadas y se optimiza la etapa de desorción en función al porcentaje del eluyente. Se utiliza solo etanol como eluyente. Queda fuera del alcance del trabajo el estudio de las isotermas de adsorción y desorción, así como también otros procesos de extracción y de purificación.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. Oliva (*Olea europaea*)

El olivo (*Olea europaea*) es un árbol perenne subtropical de la familia Oleaceae, las cuales se encuentran distribuidas en regiones tropicales y templadas en el mundo, como los países de la cuenca mediterránea. La familia Oleaceae posee 35 especies, en donde se destaca la *Olea europea* como la única que posee un fruto comestible. Los árboles pueden llegar hasta una altura de quince metros con un tronco leñoso de corteza gris verdusca que alcanza una coloración negra con el tiempo, tal como se muestra en la Figura 1.1.



Figura 1.1 Ejemplificación de un árbol de olivo erguido. (Barranco Navero, D. et al 2000)

Las hojas de la *Olea europea* son simples y con una forma elíptica o lanceolada con un color verde oscuro brillante por la presencia de cera, estas pueden alcanzar un largo entre 30 a 80 mm. Cabe destacar que la hoja de *Olea europaea* posee un peso en seco elevado debido, entre otros factores, al bajo contenido de agua. En el mismo orden de ideas, las hojas de este árbol tienen características distintas de acuerdo a la edad, en donde el contenido de flavonoides y fenoles es mayor para hojas jóvenes. (García Molano, J. F.; 2012)

Las distintas variedades de *Olea europea* se originaron a medida que el cultivo se extendió a lo largo del Mediterráneo, utilizando distintas técnicas bajo distintos factores como: el suelo y el clima. Cabe destacar que las distintas variedades fueron beneficiadas por la reproducción de estos árboles de olivo con olivos silvestres. El Catálogo Mundial de Variedades de Oliva (World Catalogue of Olive Varieties) fue realizado por el Consejo Internacional del Aceite de Oliva para establecer los criterios para caracterizar los distintos

tipos de olivo, los cuales son: sección de “passport”, características morfológicas y consideraciones comerciales y agrícolas.

En primera instancia, los datos de “passport” indican la información general de la variedad: nombre común, sinónimos, origen, distribución y propósito en la producción. Luego, las características morfológicas se dividen en cualitativas y cuantitativas, en donde se destacan los atributos presentes en: el árbol, la hoja, la inflorescencia, el fruto y el endocarpo. Finalmente, las consideraciones agronómicas y comerciales permiten definir el perfil del cultivo, la relación con las temporadas y el entorno.

1.1.1. Variedad Arbequina

Este tipo de olivo también se conoce como: “Arbequí”, “Arbequín”, “Blancal” y es originario de España; específicamente, esta variedad es la de mayor importancia en la comunidad de Cataluña. Sin embargo, es posible conseguir la Arbequina en Aragón y Andalucía. Este tipo de olivo se utiliza principalmente para la producción de aceite, debido a su resistencia al frío y a la salinidad, como también sus excelentes propiedades organolépticas. La fruta puede ser recogida por camiones agitadores debido a que la fuerza de separación se considera media. Entre las características morfológicas del árbol de esta variedad se encuentra que su hábito de crecimiento es hacia los alrededores, sus hojas son de forma elíptica, de longitud corta y de ancho medio y su fruto son esféricos simétricos de bajo peso (Barranco Navero, D. et al 2000). En la Figura 1.2 se muestra un ejemplo de la variedad arbequina.



Figura 1.2. Detalle de los frutos y las hojas de la variedad Arbequina (Barranco Navero, D. et al; 2000)

1.1.2. Variedad Verdiella

Este tipo de árbol de olivo es originario de España y es cultivado con mayor preponderancia en Lérida (Comunidad de Cataluña). Esta variedad se considera resistente al frío, susceptible a la sequía y tolerante a pestes y enfermedades. El contenido de aceite es medio con una gran estabilidad, pero con dificultad de ser extraído. Entre las características del árbol se encuentra que se distribuyen sobre áreas grandes, las hojas son de forma elíptica como lanza, de longitudes cortas y de ancho estrecho y sus frutos tienen forma de ovoides, débilmente simétrico y de bajo peso (Barranco Navero, D. et al 2000). En la Figura 1.3 se muestra un ejemplo de dicha variedad.



Figura 1.3. Detalle de los frutos y las hojas de la variedad Verdiella (Barranco Navero, D. et al 2000)

1.2. Producción del aceite de oliva

La producción del aceite de oliva data de la antigüedad, desde el reino de Mesopotamia , y confluye con métodos modernos de cultivo en la actualidad. Luego de la fase agrícola del árbol de olivo, el proceso productivo para el aceite de oliva se presenta en 5 fases generales, como se ejemplifica en la Figura 1.4.

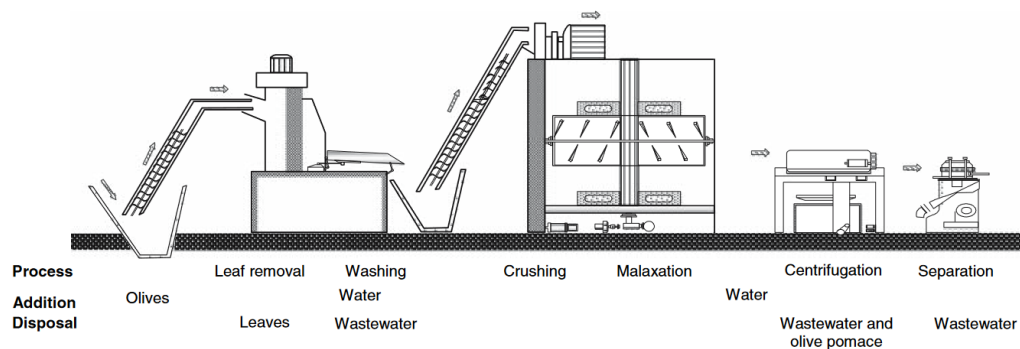


Figura 1.4. Ejemplificación de un proceso de extracción de aceite de oliva (comienza con la disposición de las hojas y ramas, prosigue con el lavado de las olivas. Posteriormente, la zona de triturado y mezclado. Finalmente, termina con la centrifugación y el filtrado final del aceite de oliva) (Kapellakis, Iosif 2007).

- **Alimentación, separación de hojas y limpieza:** corresponde a la primera fase del proceso, en donde se acondicionan los frutos para el tratamiento mecánico y se evita el ingreso de agentes contaminantes. Esto se realiza a partir de la separación de las hojas y la limpieza de los frutos.
- **Trituración:** permite la separación de los obstáculos que no permiten la extracción del aceite por las vacuolas, como lo es la piel del fruto.
- **Mezclado:** la pasta obtenida por la fase de la trituración, se mezcla lentamente durante 30 minutos en un malaxador, el cual consiste en un sistema rotatorio con cuchillas. El mezclado de las pastas de oliva puede poseer una corriente de agua caliente para disminuir la viscosidad del aceite y mejorar su producción. Por otro lado, la velocidad de mezclado es baja, entre 19 a 20 rpm, debido a que permite un efecto de coalescencia en el seno de la pasta aceitosa y mejora la separación entre el agua y el aceite de oliva.
- **Extracción del aceite de oliva:** después del proceso de mezclado, la pasta que contiene aceite de oliva, restos de los tejidos de la oliva, agua y pequeños pedazos del resto del árbol, deben llevarse a cabo tres tipos de extracción:
 - Proceso a presión: consiste en el uso de una prensa hidráulica para expulsar los líquidos de la pasta. Tanto los fluidos oleosos, como el agua presente. Normalmente, este proceso es completamente manual.
 - Proceso de centrifugado: este proceso utiliza un decantador giratorio para separar las distintas fases se encuentran inmiscuidas entre sí, pero no solubilizadas.

- Proceso de filtración selectiva: también se conoce como Sinolea y consiste en la filtración selectiva a través del conocimiento de la tensión superficial de ambos. El aceite posee menor tensión superficial que el agua, por lo que tenderá a mojar y cubrir el soporte metálico del equipo, de esta manera, separando ambos compuestos de la pasta.
- Centrifugación final del aceite: se lleva a cabo una última centrifugación a una velocidad baja, independientemente de los procesos realizados anteriormente.

Desde el momento que se empieza el primer paso para extraer el aceite de oliva, se empiezan a generar productos secundarios que pueden poseer o no un valor comercial. En este proceso, se identifican tres subproductos: pulpa, ramas y hojas y el agua de desecho del molino. La pulpa mantiene un valor comercial, a diferencia de las hojas y ramas, las cuales terminan como biomasa para la agricultura o como combustible vegetal. Por otro lado, el agua de desecho del molino es una amenaza ambiental debido a que es ligeramente ácida y los mismos compuestos fenólicos son la razón de la toxicidad de estos efluentes, debido a que sus formas libres no son comunes fuera del sistema vegetal y genera un desbalance en los ciclos presentes en el suelo. (Kapellakis, Iosif 2007)

1.3. Polifenoles

Los polifenoles se definen como compuestos orgánicos que poseen uno o más anillos fenólicos y principalmente, son de origen vegetal. La formación de los polifenoles en la planta se realiza en el metabolismo secundario y forma parte de las funciones metabólicas principales de la planta. Los polifenoles se caracterizan de acuerdo a los números de anillos fenólicos y los distintos grupos funcionales que puedan contener, de esta forma, los principales tipos de polifenoles son: ácidos fenólicos, isoflavonas, neoflavonoides, chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, proantocianidinas, antocianidinas y amidas polifenólicas.

1.3.1. Ácidos fenólicos

Son compuestos no flavonoides que son derivados del ácido benzóico y el ácido cinámico fundamentados en esqueletos C1-C6 y C3-C6. Los ácidos fenólicos libres se encuentran en las frutas y vegetales, pero en los granos y semillas, estos compuestos se encuentran en su forma enlazada.

1.3.2. Flavonoides

Se caracterizan por tener un esqueleto estructural C6-C3-C6, en donde la naturaleza fenólica se encuentra en los anillos C6, como se muestra en la figura. Las variaciones en el anillo cromano dan cabida a una subdivisión de los flavonoides: antocianinas, flavan-3-oles, flavonas, flavanonas y flavonoles. Dependiendo de dónde se encuentre el enlace entre el anillo cromano y el anillo aromático, se clasifica como: isoflavonas y neoflavonoides. La estructura básica presente en los flavonoides son agliconas, a pesar de que en el material vegetal se encuentran como glucósidos.

1.3.2.1. Grupo de isoflavonas, flavonoides y chalconas.

Las isoflavonas poseen uno de los anillos aromáticos conectado al anillo cromano al átomo de carbono C3, mientras que los neoflavonoides poseen dicho enlace en el carbono C4. Por otro lado, las chalconas no poseen un anillo cromano. Las isoflavonas son las más comunes dentro de este grupo y se encuentran en las leguminosas, mientras que los neoflavonoides no son comunes en los alimentos. Las chalconas se encuentran en manzanas y cervezas.

1.3.2.2. Grupo de flavonoles y proantocianidinas

Los flavonoles, o catequinas, no poseen un doble enlace entre el carbono C2 y C3, tampoco un grupo carbonilo en el carbono C4 en el anillo cromano. Tomando en cuenta la estructura y la hidroxilación en el carbono C3, los flavonoles poseen dos centros quirales tal que forman 4 diastómeros. En un principio, los flavonoles se encuentran en la piel de la uva, manzanas y arándanos; mientras que los flavonoles monoméricos son los flavonoides más importantes presentes en las hojas de té y el grano de cacao. Por otro lado, las proantocianidinas son el producto de la catálisis ácida de la catequina y la epicatequina. Tanto los flavonoles y las proantocianidinas son consideradas como antioxidantes fuertes.

1.3.2.3. Grupo de antocianidinas

Este grupo de compuestos son los responsables de los colores presentes en las flores y frutos, específicamente, los colores: rojo, azul y violeta y el pigmento del arroz negro. Las principales antocianidinas presentes en el mundo vegetal son: cianidina, delphinidina y pelargonidina.

1.3.3. Amidas polifenólicas

Estos polifenoles poseen un grupo funcional nitrogenado y los mayores exponentes en alimentos de estos compuestos son: capsaicinoides y avenantramidas. El primero es el responsable del sabor picante en los chiles y se ha reportado un efecto antioxidante y antiinflamatorio importante; mientras que la avenantramidas se encuentra en la avena y ha exhibido un efecto antioxidante moderado. (Tsao, R. 2010)

1.4. Polifenoles naturales presentes en las hojas de oliva

La composición de compuestos antioxidantes de las hojas de olivo (*Olea europaea*) consiste, principalmente, en 5 compuestos: oleuropeósidos (oleuropeína y verbacósido), flavonas (luteolin-7-glucósido, apigenin-7-glucósido, diosmetin-7-glucósido, luteolina y diosmetina), flavonoles (rutina), flavan-3-oles (catequina) y fenoles sustituidos (tirosol, hidroxitirosol, vainillina, ácido vanílico y ácido caféico). En la Tabla 1.7 se muestran los porcentajes de polifenoles presentes en la hoja de *Olea europaea* (Benavente-García et al. 2000).

Tabla 1.1. Composición de algunos polifenoles presentes en la hoja de olivo (*Olea europaea*) a partir del estudio realizado por Benavente-García, et al.

Compuestos fenólicos	% Absoluto	Compuestos fenólicos	% Absoluto
Hidroxitirosol	1.46	Luteolin-7-glucósido	1.38
Tirosol	0.71	Verbascósido	1.11
Catequina	0.04	Apigenin-7-glucósido	1.37
Ácido Caféico	0.34	Diosmetin-7-glucósido	0.54
Ácido vanílico	0.63	Oleuropeína	24.54
Vainillina	0.05	Luteolina	0.21
Rutina	0.05	Diosmetina	0.05

(Benavente-Garcia et al. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves)

1.5. Disolventes eutécticos profundos

Este tipo de solventes se definen como una mezcla eutéctica de ácidos y bases de Bronsted-Lowry o Lewis que posee un punto de fusión menor que los compuestos por separado. Anteriormente, se utilizaban los líquidos iónicos (Ionic Liquids, IL's), los cuales poseen semejantes propiedades físicas, sin embargo, los solventes eutécticos profundos (Deep eutectic solvents, DES's) poseen una ventaja debido a su simplicidad en la formulación y su toxicología. Normalmente, los solventes eutécticos profundos se encuentran conformados por una sal de amonio cuaternario y una sal metálica o un dador de enlaces de hidrógeno. De esta manera, la deslocalización de los electrones entre el enlace del halogenuro y la estructura dadora de enlaces de hidrógeno genera el efecto de disminución del punto de fusión de la solución. En la ecuación 1 se presenta una fórmula general para los solventes eutécticos profundos, donde Cat^+ es el catión, X^- es la base de Lewis o Bronsted, Y es el ácido de Lewis o Bronsted con el número de átomos (z) que interactúan del ácido con el anión (Smith, E. L. et al, 2014).



A partir de los compuestos complejantes utilizados, se tiene la siguiente caracterización de los solventes:

- **Tipo I de DE's:** conforman a la mezcla de sales de cloruro y sales de amonio cuaternario, análogos al sistema haluro de metal/sales de imidazolio.
- **Tipo II de DE's:** para el caso de estos solventes, se utilizan haluros de metales no hidratados y el cloruro de colina.
- **Tipo III de DE's:** estas son las mezclas de cloruro de colina y dadores de enlaces de hidrógeno, como lo son: amidas, ácidos carboxílicos y alcoholes.
- **Tipo IV de DE's:** a partir de las investigaciones de Abbott et al., este tipo de soluciones utiliza metales de transición como cationes en soluciones eutécticas a temperatura de ambiente. (Smith, E. L. et al 2014).

Ruesgas-Ramon, M. et al (2017) realizó una compilación de los resultados de distintos estudios para la recuperación de compuestos polifenólicos a partir del uso de solventes eutécticos, en donde dividió la investigación de acuerdo a: ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y estilbenos. Para el caso de los ácidos fenólicos, Peng et al. (2016), referenciado dentro del artículo, estudió la extracción de: ácido clorogénico, ácido caféico, ácido 3,5-cafeoilquínico, ácido 3,4-cafeoilquínico y ácido 4,5-cafeoilquínico, en donde obtuvo que la extracción depende del radio molar entre el cloruro de colina y los dadores de enlaces de hidrógeno. De esta manera, se obtuvo que el mejor radio dependió de la pareja de cloruro de colina/donor de enlaces de hidrógeno, para el caso del estudio realizado se obtuvo que, para un radio molar de 2:1, los pares más eficientes de extracción fueron: cloruro de colina/1,3-butanodiol para el ácido clorogénico y el ácido

3,5-cafeoilquínico; cloruro de colina/ácido propanodioico para el ácido caféico; cloruro de colina/urea para el ácido 3,4-cafeoilquínico y cloruro de colina/etilenglicol para el ácido 4,5-cafeoilquínico. Cabe destacar que las extracciones fueron mayores en comparación con la realizada con el agua y, por otro lado, aumentó la tasa de producción con la adición de agua (10% en composición).

De la misma manera, se realizó un estudio en la extracción de flavonoides con solventes eutécticos por parte de Duan et al. (2016), referenciado en el artículo de Ruesgas-Ramón, et al (2017), en donde encontró que la icariina es altamente extraíble con disolventes eutécticos en base a L-prolina, con los mejores resultados obtenidos cuando se utilizaba una mezcla de ácido láctico/L-prolina en relación de 1:1 molar. (Ruesgas-Ramón, M. et al 2017)

1.6. Adsorbentes poliméricos

Los adsorbentes poliméricos, también denominadas resinas poliméricas, disponen de una estructura porosa definida y una elevada área superficial (Purolite 2023). En la Figura 1.5 se muestra un ejemplo de resina porosa. El área superficial toma un papel importante en el proceso de adsorción, debido a que es un indicador de los sitios activos donde los compuestos pueden relacionarse con la matriz polimérica; por lo tanto, el tamaño de los poros debe de ser controlado, tal que sea posible la entrada de la molécula a la matriz y mantener el área superficial alta.

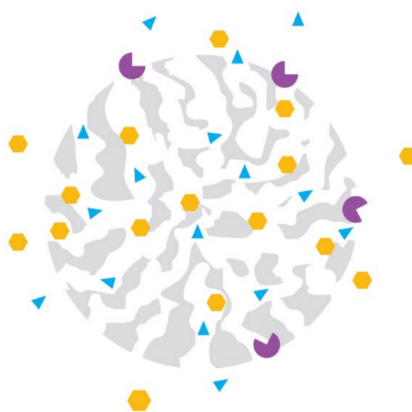


Figura 1.5. Diagrama de un adsorbente poroso en donde se puede apreciar la presencia de distintas moléculas y la capacidad de penetración de las moléculas (Purolite 2021)

Además de las características físicas, la eficacia de la adsorción viene determinada por los siguientes factores:

- **Características del solvente:** el tipo de solvente debe ser adecuado para la molécula a ser separada cumpliendo con la similitud entre las polaridades

del compuesto: polar o apolar. La polaridad del solvente también afecta la reactividad de la superficie de la resina de adsorción.

- **Interacciones químicas:** dentro de la matriz polimérica, los compuestos pueden reaccionar de acuerdo a su polaridad: de manera hidrofóbica (con fuerzas intermoleculares débiles) o hidrofílica (con la formación de enlaces o puentes de hidrógeno)
- **Tamaño molecular:** la solvatación del analito y el tamaño de la molécula son factores que afectan la adsorción a través de los poros.
- **Capacidad:** este parámetro es directamente proporcional al área superficial del adsorbente. A pesar de que, al aumentar la capacidad, incrementa la cantidad de analito adsorbido, es posible obtener un problema con el proceso de elución posterior.

Las resinas pueden ser clasificadas de acuerdo a la actividad presente en su superficie y, de esta forma, a la composición química de la misma. La clasificación es la siguiente (Purolite 2023):

- **Resinas aromáticas:** poseen una gran capacidad de atracción de moléculas aromáticas y, por la naturaleza de los anillos aromáticos, una gran afinidad a los compuestos hidrofóbicos. Este grupo se subdivide en las siguientes resinas:
 - Polidivinilbenceno: tiene una base de divinilbenceno y es moderadamente hidrofóbico. Abarca las resinas: PuroSorb PAD400, PuroSorb PAD500, PuroSorb PAD600, PuroSorb PAD900 y PuroSorb PAD1200.
 - Poliestireno entrecruzado con divinilbenceno: está basado en un esqueleto de poliestireno y polidivinilbenceno entrecruzado. Abarca las resinas: Macronet MN200, Macronet MN202 y Macronet MN270.
- **Resinas alifáticas de metacrilato:** exhibe una hidrofobicidad menor a las resinas aromáticas y poseen una mayor afinidad a compuestos con cadenas alifáticas o ciclos. En un ambiente no polar, se generan puentes de hidrógeno por la interacción del grupo carbonilo presente en la matriz del poliéster con grupos hidroxilos o nitrogenados.
 - Metacrilato: se basan en un copolímero de éster y, por ende, es más hidrofílico que el polidivinilbenceno. Abarca las resinas: PuroSorb PAD610 y PuroSorb PAD950. (Purolite)

Jin et al (2020) realizaron los estudios para la adsorción y desorción de compuestos polifenólicos pertenecientes al alga parda marina (*Ecklonia cava*) a partir de resinas macroporosas. Se variaron los distintos tipos de resinas de acuerdo a matriz polimérica y tamaño de poro, utilizando los siguientes: SP850 (Estireno-divinilbenceno y 1.2 g/mL porosidad), HP2MG (polimetacrilato y 1.2 mL/g de porosidad), XAD2

(Estireno-divinilbenceno y 0.65 mL/g de porosidad), XAD7HP (Acrílico y 0.5 mL/g de porosidad) y XAD16N (estireno-divinilbenceno y 0.55 mL/g de porosidad). Se demostró que las resinas HP2MG y XAD7HP poseen la mejor eficiencia de adsorción/desorción de compuestos fenólicos. Entre los factores que se tomaron en cuenta para la explicación de este fenómeno se encuentra el tamaño del poro, en donde un tamaño muy pequeño de poro puede ser contraproducente para la difusión, creando estancamiento en la superficie del material. (et al. 2020)

1.7. Extracción, separación y purificación de polifenoles

En la extracción de polifenoles de la hoja de olivo coexisten los métodos manuales e instrumentales, en donde la eficacia de cada método depende de: la naturaleza del solvente, el radio soluto-solvente, la temperatura y el tamaño de partícula; así como el pretratamiento de las hojas: limpieza, molido, secado y homogeneización. Uno de los parámetros generales del solvente para el procedimiento de extracción es la viscosidad, la cual se desea que sea baja para aumentar la transferencia de masa. (Dini and Grumetto 2022)

De entre los mecanismos de extracción manuales, se utilizan los siguientes:

- **Percolación:** en este proceso el material vegetal se utiliza como un lecho fijo en donde el solvente se hace pasar por los espacios vacíos del arreglo de la muestra. Este proceso, normalmente, se realiza a temperatura ambiental, sin embargo, es posible calentar el solvente para mejorar el proceso de difusión.
- **Maceración:** consiste en colocar el material vegetal procesado en pedazos más pequeños o en un polvo moderado, en un sistema cerrado con el solvente sin adición de calor a presión atmosférica.
- **Decocción:** consiste en el uso del agua con un tratamiento térmico, hasta alcanzar la ebullición, para mejorar la difusión del compuesto deseado. Luego, el agua con el compuesto es enfriada para su purificación. Debido a que este proceso requiere de calor durante toda la extracción, sólo puede utilizarse para analitos termoresistentes.
- **Extracción de la fase sólida:** también se conoce como lixiviación, en donde una mezcla de sólidos se coloca en contacto con el solvente y, el compuesto deseado, se disuelve y el sólido remanente puede ser separado. (Swami Handa et al 2018)

Los métodos de extracción de polifenoles también permiten el uso de condiciones extremas de temperaturas, presión o adición de un componente químico. Estos procesos se listan como: extracción con fluidos supercríticos (CO₂), campos eléctricos pulsados, la extracción asistida por enzimas, entre otros (Zhang, Li-Gen and Wen-cai 2018).

Posterior al proceso de extracción, se obtiene una mezcla del solvente con el analito y la presencia de contaminantes. Por lo tanto, se utilizan métodos de separación basados en

las propiedades físicas y de los compuestos, en donde la cromatografía toma un papel preponderante. Entre los procesos de purificación, se tienen los siguientes:

- **Separación por adsorción:** este método se basa en la diferencia de afinidad de cada uno de los componentes en la mezcla del producto de la extracción con el medio poroso en donde se existen relaciones de puentes de hidrógeno e interacciones electroestáticas. Posteriormente, se utiliza la adsorción para llevar a cabo el proceso de cromatografía y la posterior separación de estos componentes.
- **Separación por el coeficiente de partición:** este proceso utiliza el principio de la extracción líquido-líquido, en donde se mide la solubilidad de la muestra en una fase estacionaria líquida y la fase móvil es otro líquido. De esta manera, se lleva a cabo un proceso de cromatografía por partición.
- **Separación por el tamaño molecular:** este método toma en cuenta la retención de moléculas grandes a través de membranas semipermeables, en donde estas se caracterizan a partir del tamaño de poro. Por otro lado, es posible llevar a cabo un proceso de cromatografía de gel filtrante, en donde las moléculas más pequeñas poseen mayor retención en la fase móvil.
- **Separación basada en la fuerza iónica:** este procedimiento se realiza con resinas con una superficie iónica (catiónica o aniónica), en donde las moléculas con grupos funcionales ionizables (ácidos carboxílicos, grupos nitrogenados y alcaloides) son separadas debido a su diferencia de distribución de carga (Zhang, Li-Gen and Wen-cai 2018).

Li et al (2011) realizó estudios con respecto a la capacidad de adsorción de flavonoides y Oleuropeína con resinas de adsorción biopolimérica de distintos tamaños de poro, polaridad y área específica. Esta investigación se fundamentó a partir de las desventajas del uso de la cromatografía a las muestras debido al consumo de solvente, toxicidad para el área laboral, contaminación ambiental y tiempos largos de proceso. Como resultado, el autor obtuvo que la resina LSA-21 (semipolar, área superficial específica de 658 m²/g y tamaño de poro promedio de 7 nm) es la más adecuada para llevar a cabo la purificación. En primera instancia, la composición química de la resina fue indispensable para explicar el comportamiento de la resina, debido a que tanto los flavonoides como la oleuropeína son ácidos débiles y son más afines a una polaridad débil.

1.8. Economía circular

1.8.1. Definición de economía circular

A lo largo de la historia, la economía circular ha sido definida de acuerdo a distintas características, como lo son: el alcance, la relación con la sustentabilidad, el enfoque del significado, entre otros aspectos. Kirchner et al (2017) define el concepto como:

“La economía circular describe un sistema económico basado en modelos de negocios que reemplazan el concepto de “término de vida” con la reducción, el reuso alternativo, el reciclaje y la recuperación de materiales en los procesos de producción/distribución y consumo en la operación en el nivel micro (productos, compañías, consumidores), meso (parques eco-industriales) y macro (ciudad, región, nación y más allá), con el propósito de alcanzar el desarrollo sustentable, el cual implica la creación de calidad ambiental, prosperidad económica y equidad social, para beneficiar las generaciones actuales y futuras. ” (Kirchherr et al. 2017: 224-225)

Sin embargo, el concepto generado por el autor no representa todos los elementos que engloban el concepto, como los son las 9 R's. Por lo tanto, Elkins et al (2019) propusieron un concepto más general con la intención de incluir las aristas en común presentes en la economía circular: “La economía circular es aquella con un impacto ambiental bajo y que hace buen uso de los recursos naturales, a través de la alta eficiencia en los recursos y en la prevención de desechos, especialmente en el sector de manufactura; y una disposición mínima de término de vida útil de los materiales” (Elkins et al. 2019. 14). La síntesis del concepto se acuñó a partir de las características claves compartidas entre las definiciones académicas: enfoque en el ambiente, eficiencia y control de emisiones, importancia del sector secundario (manufactura) y disposición en el término de la vida útil.

2. METODOLOGÍA

2.1. Reactivos e instrumentación

2.1.1. Muestra

La muestra de estudio fueron hojas de olivos (*Olea europaea*) de diferentes tipos identificados como Albelda Arbequina y Albelda Verdiella y “Planta” (especie no identificada) provenientes de diferentes árboles de olivos de la localidad de Aragón, España y que fueron recolectados en septiembre del 2022. Dichas hojas de olivos fueron trituradas hasta obtener tamaños de partículas menores a 2mm para ser mezcladas y almacenadas en frío como una muestra única.

2.1.2. Resinas

Como resinas no funcionalizadas se consideraron las siguientes: PuroSorb PAD900, PuroSorb PAD950, PuroSorb PAD610 y Macronet MN-202 (Figura 2.1.). En el caso de las resinas de intercambio iónico se utilizaron el A860, A520E y A500Plus.

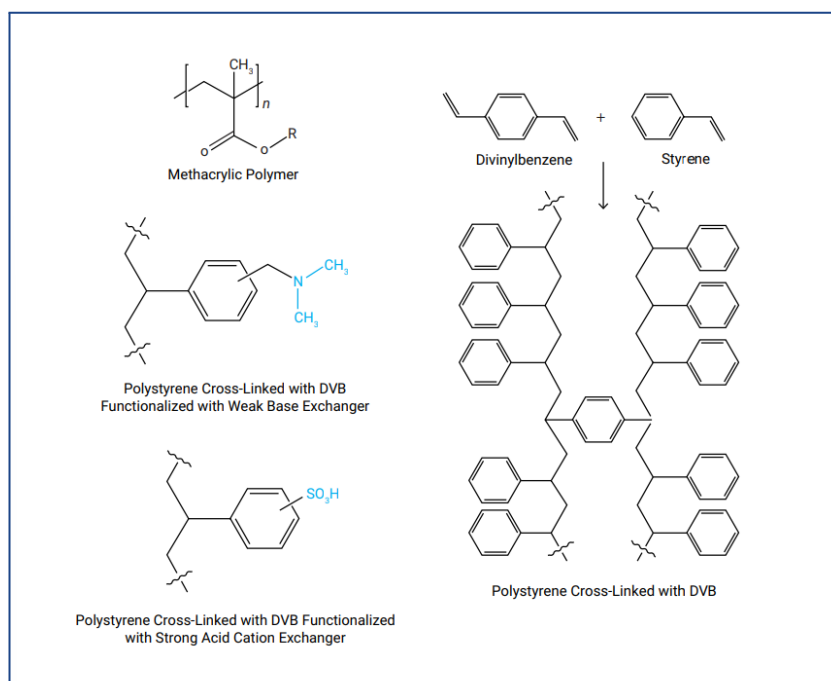


Figura 2.1. Estructuras poliméricas de PuroSorb y polímeros Macronet (Purolite 2021)

2.1.3. Patrones

Se utilizaron, como referencia, los siguientes patrones de polifenoles: 3-Hidroxitirosol, Luteolina-Glucosida, Isoquercetin-Glucosida (quercetina-3-O-glucosido), Luteolina, ácido p-cumárico y ácido tánico. A continuación, se muestran las estructuras químicas de los patrones (Figura 2.1)

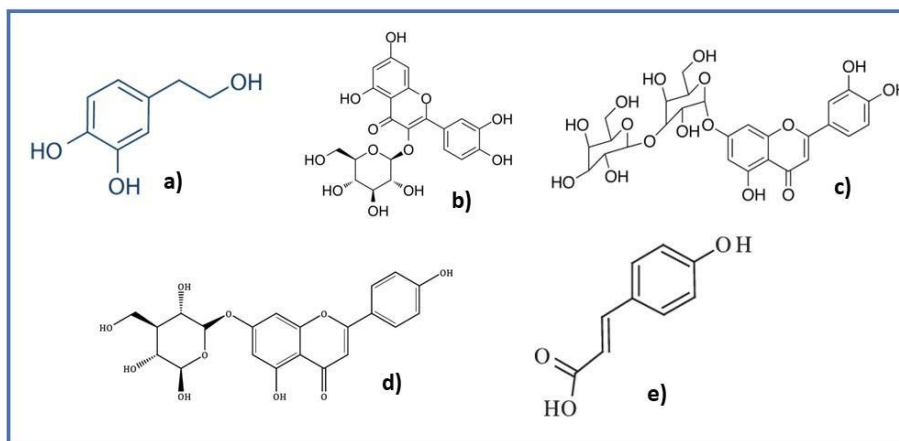


Figura 2.2. Estructura química de los compuestos fenólicos patrón utilizados en la investigación: a) 3-hidroxitirosol, b) Isoquercetina , c) Luteolin-Glucósido, d) apigenina-rutinósido y e) ácido p-cumárico.

2.1.4. Solventes

Para la elaboración del solvente eutéctico profundo se utilizaron cloruro de colina (ChCl) (Thermofisher, Kandel, Alemania) como el aceptor de enlaces de hidrógeno y glicerol (Gly) (Thermofisher, Kandel, Alemania) como el donador de enlaces de hidrógeno.

Se utilizó agua Milli-Q purificada con el sistema de purificación de agua Milli-Q Gradiente A10 (Merck Millipore) y etanol (para HPLC, Merck, Darmstadt, Alemania).

2.1.5. Otros reactivos

Acetonitrilo (para HPLC, Merck, Darmstadt, Alemania), dimetilsulfóxido (DMSO) (PanReac, Castellar del Vallés, España), ácido fórmico (98-100% v/v), HCl (37% v/v, Merck, Darmstadt, Alemania), carbonato de potasio (K_2CO_3).

2.1.6. Instrumentación

- **Equipo HPLC-UV**

Se trabajó con Agilent Technologies 1200 Series System (Alemania), equipado con una bomba cuaternaria (G1311A), inyector automático (G1329A), desgasificador (G1322A) y detector de serie de diodos (G1315A) que proporciona un rango de longitudes de 190 a 400 nm y que fue controlado con el software Agilent ChemStation.

- **Otros instrumentos**

Agitador rotatorio MRH-04, pH-metro CRISON basic 20, purificador, un agitador con placa calefactora (IKA RCT basic, Friburgo de Brisgovia, Alemania) y centrífuga Rotina 420 (Hettich, Tuttlingen, Alemania).

2.2. Procedimientos

2.2.1. Preparación de patrones

Para la preparación de las soluciones de patrones de polifenoles se diluyeron las soluciones de 1000 mg/L correspondientes a cada uno de los patrones, obteniendo así 5 mg/L de cada uno todas ellas en dimetilsulfóxido.

2.2.2. Preparación del solvente eutéctico profundo

El procedimiento utilizado ha sido estudiado previamente por el grupo Recycle perteneciente al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Barcelona y es el que se emplea actualmente en los experimentos debido a que, en estudios previos de extracción realizados, este es el que mejor rendimiento ha generado. Para la preparación del solvente se utilizó cloruro de colina (ChCl) y glicerol (Gly) con una relación molar de 1:5, es decir que por cada mol de ChCl se tenían 5 moles de glicerol. Ambos compuestos fueron pesados para luego agregar la cantidad de agua correspondiente al 30% y finalmente ser mezclados en baño maría a 60 °C en constante agitación hasta obtener un líquido incoloro y homogéneo. Las condiciones en las que se preparó el solvente eutéctico profundo se pueden ver reflejadas en la Tabla 2.1, así mismo como las cantidades utilizadas de cada uno de los compuestos.

Tabla 2.1. Condiciones de preparación del solvente eutéctico profundo.

Temperatura	60 °C	
Velocidad de agitación	340 rpm	
Tiempo de agitación	2 horas	
Cantidades de compuestos	Cloruro de colina	74 ml
	Glicerol	235 ml
	Agua Milli-Q	166 ml

2.2.3. Extracción sólido-líquido (Lixiviación)

La extracción de los compuestos de polifenoles provenientes de las hojas de olivo se realizó poniendo en contacto la muestra de hojas de olivos con el solvente eutéctico profundo en una relación de 1:20. Es decir, que la relación sólido-líquido que se utilizó como referencia, debido a estudios previos realizados por el grupo de investigación de la Universidad de Barcelona, fue de 0,5 g de la muestra de hojas de olivo con 10 ml de solvente eutéctico profundo. Como en este caso se buscaba un volumen de extracto grande se dividió el volumen total requerido en 18 frascos de 30 ml cada uno, para lograr la homogeneidad de los extractos. En cada frasco se pesó la muestra de hojas de olivo correspondiente y se añadió el solvente eutéctico profundo. Es así, como en la Tabla 2.2 se puede ver reflejado las condiciones en las que se realizó extracción mediante el baño maría, cabe destacar que la temperatura del agua debe de ser siempre constante para este proceso puesto que es un factor clave en el mismo.

Tabla 2.2. Condiciones de la extracción de los compuestos de polifenoles

Temperatura del agua	80 °C	
Velocidad de agitación	730 rpm	
Temperatura del agitador	111 °C	
Tiempo de agitación	2 horas	
Cantidades de compuestos	Muestra de hojas de oliva total	22,5 g (1,25g c/u)
	Solvente eutéctico profundo total	450 ml (25 ml c/u)

Una vez transcurrido las dos horas, se dejaron enfriar los extractos y tal y como se muestra en la Figura 2.6, se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 min para así separar los sólidos suspendidos presentes en el extracto. Al finalizar la centrifugación, se procedió a extraer el sobrenadante para luego ser homogeneizado y almacenado en frío para su posterior uso en los experimentos.

2.2.4. Purificación de polifenoles utilizando resinas poliméricas

2.2.4.1. Experimento en batch con resinas no funcionalizadas

Experimento de adsorción

Se dispuso dentro de los tubos tipo Falcon de 10 ml, 0,25 g de resina y 5 ml de extracto de hojas de oliva diluido 1:1 con agua Milli-Q y se agitó inicialmente durante 60 min (Figura 2.7). Al finalizar este periodo de tiempo, se extrajeron las muestras de las soluciones que se equilibraron con las resinas, se filtraron con filtros de jeringas y se colocaron en viales de HPLC, para finalmente ser analizadas mediante HPLC-UV. Esto se realizó con el objetivo de evaluar la retención de los polifenoles para cada una de las resinas (PAD900, PAD950, PAD610 y MN202). En el mencionado análisis se tomó en cuenta el extracto antes (control) y después (a los 60 min) de la interacción con la resina.

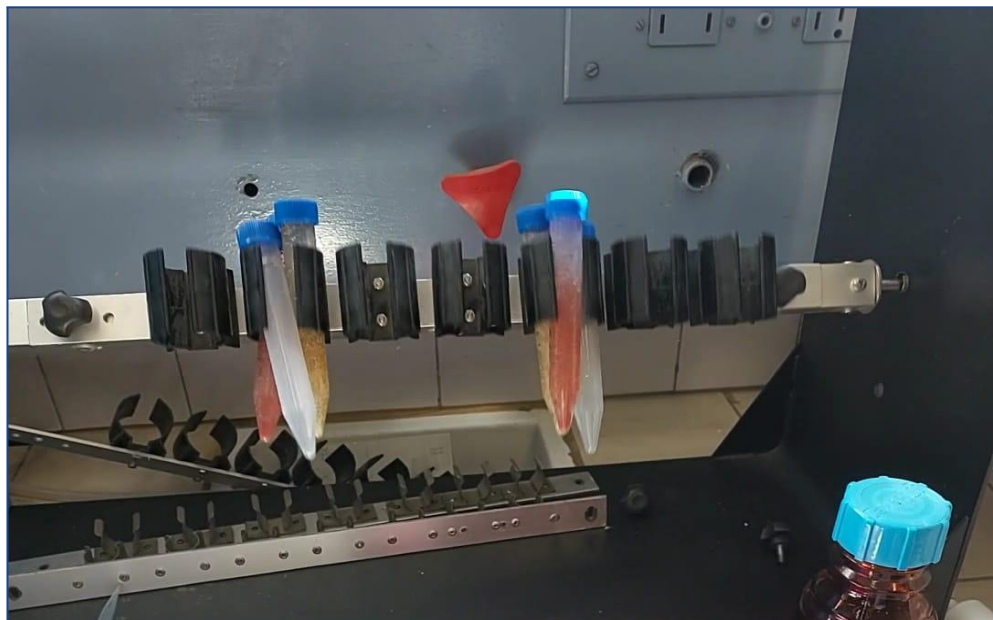


Figura 2.3. Montaje experimental para la purificación de los extractos con resinas poliméricas en batch.

Experimento de desorción

Para esta parte del experimento, se limpiaron previamente las resinas con agua Milli-Q utilizando filtro de papel y se añadieron en los Falcons con 5 ml de eluyente, que en este caso fue 100% etanol. Tomando en consideración que, en estudios previos realizados por el grupo de investigación de la Universidad de Barcelona, se obtuvo que a partir del minuto 30 se lograba llegar a un equilibrio en la cinética de desorción. Se usó este tiempo para la experimentación. Al finalizar este periodo de tiempo, se extrajeron las muestras de las soluciones que se equilibraron con las resinas, se filtraron con filtros de jeringas y se colocaron en viales de HPLC, para finalmente ser analizadas mediante HPLC-UV, con el objetivo de evaluar la efectividad de la elución en función a la recuperación de los compuestos de polifenoles.

2.2.4.2. Experimento en batch con resinas de intercambio iónico

En el caso de las resinas de intercambio iónico, se realizaron los experimentos de adsorción y desorción a las mismas condiciones aplicadas a las resinas no funcionalizadas, con la salvedad de que se realizó la modificación del pH en el extracto para evaluar cómo esto influía en la retención de los compuestos de polifenoles en las resinas. Por tanto se trabajó al pH original del extracto que era igual a 5,3 y a un pH básico igual a 11, utilizando carbonato de potasio 5 M (K_2CO_3). Para la elución se utilizó como solvente el etanol a pH igual a 1, modificado con ácido clorhídrico 0.1 M (HCL).

2.2.4.3. Adsorción y optimización en la desorción de resinas seleccionadas

Una vez seleccionadas las resinas a optimizar se realizó el estudio de la cinética de adsorción. Para el mismo se utilizaron 5 Falcons cada uno con 0,25 g de resina y 5 ml de extracto de hojas de olivo, exceptuando el Falcon correspondiente al minuto 60 debido a que se utilizó 1 g de resina con 20 ml de extracto, con la finalidad de utilizar esta resina para la optimización del eluyente en la desorción. Se tomaron cinco muestras, cada una correspondiente a cada Falcon y se realizaron en un tiempo de 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, filtrándose antes de ser colocados en los viales para finalmente ser analizados en el HPLC. Posteriormente se limpiaron las resinas, correspondiente a la solución equilibrada al minuto 60, con agua Milli-Q y se procedió a colocar en 4 Falcons 0,25 g de resina con 5 ml del eluyente, que en este caso fueron trabajados a diferentes porcentajes de etanol (20%, 50%, 80%, 90%, 100%) y se agitó por 30 minutos. Una vez finalizado el tiempo, se procedió a filtrar y finalmente fue analizado en HPLC-UV con el

objetivo de llegar a conocer el porcentaje de agua/etanol óptimo para la desorción y el tiempo de equilibrio de la carga.

2.2.4.4. Desorción de las resinas seleccionadas

Una vez conocido el porcentaje de etanol, se realizó el estudio de la cinética de la elución. Inicialmente, se colocaron 1,25 g de resina y 25 ml de extracto de hojas de olivo en un Falcon y se agitó por 60 minutos, obteniendo así una solución equilibrada con la resina. Posteriormente, se limpió la resina y se dividió en cinco Falcon, resultando en cada uno 0,25 g de resina, al cual se le agregó 5 ml del eluyente al porcentaje de agua/etanol óptimo y se tomaron las muestras para cada Falcon en un tiempo de 5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min, filtrándose posteriormente y siendo finalmente analizado en el HPLC-UV.

2.2.5. Análisis cromatográficos de polifenoles

Las muestras resultantes fueron analizadas por cromatografía líquida con detección ultravioleta (HPLC-UV). Los compuestos se separaron mediante el uso de una columna Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) de la marca Phenomenex (California, EEUU). Se ha utilizado, como componentes de la fase móvil, una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1% en agua Milli-Q (Canal A) y acetonitrilo (Canal B) a un caudal de 0,7 mL/min y tomando como volumen de inyección 10 μ L. El perfil del gradiente aplicado se muestra en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Gradiente de elución del método cromatográfico

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0.00	97	3
3.00	97	3
18.00	70	30
23.00	35	65
25.00	10	90
27.50	10	90
28.00	97	3
35.00	97	3

Los cromatogramas se adquirieron a diferentes longitudes de onda: 280 nm, 325 nm y 370 nm, siendo éstas las longitudes para la detección UV. En la Figura 2.4 se muestran los polifenoles de interés: 3-hidroxitirosol, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico. Además, se consideraron los máximos de longitud de onda para los compuestos analizados con HPLC-UV (Tabla 2.4).

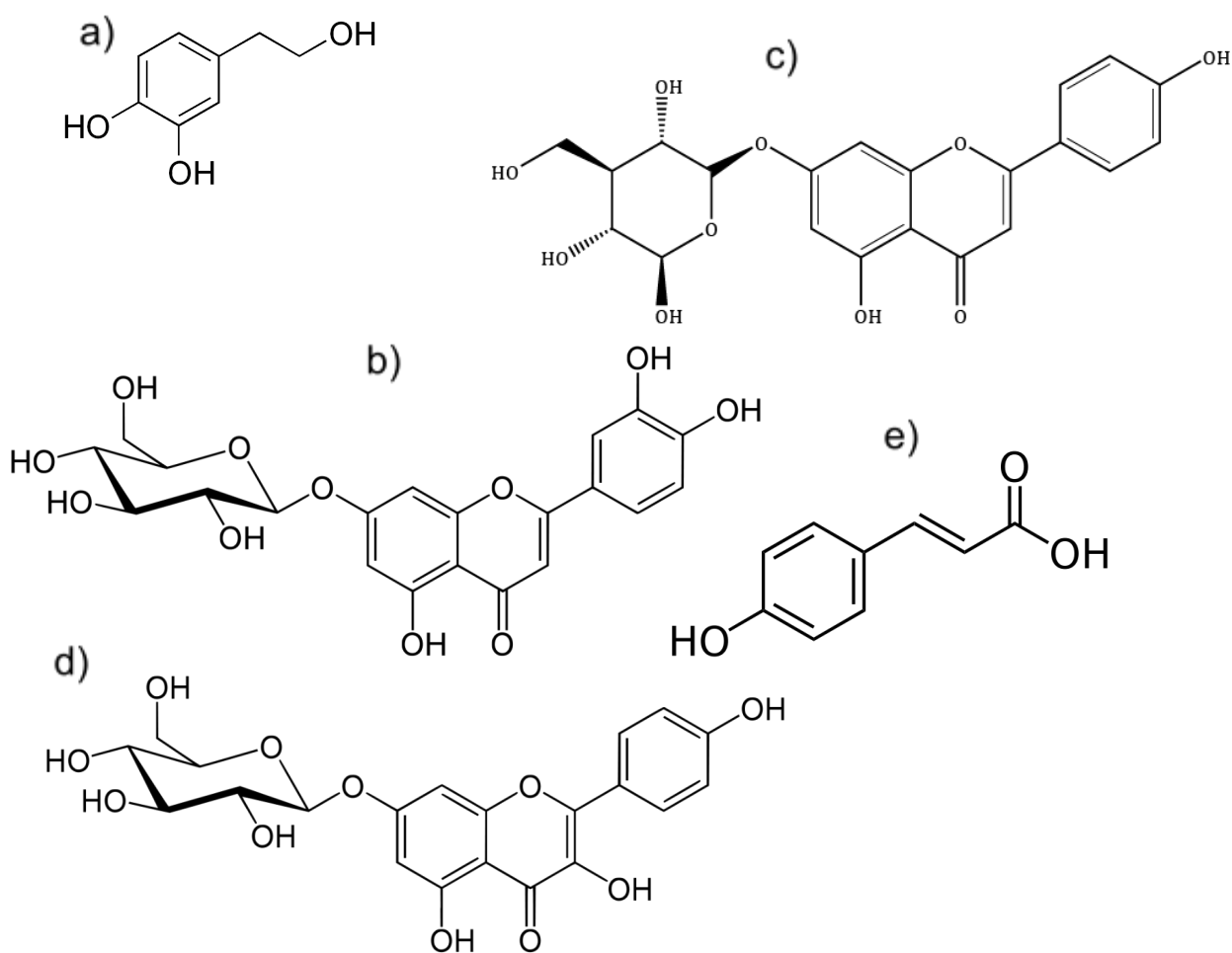


Figura 2.4. Compuestos de polifenoles de interés: a) 3-hidroxitirosol, b) luteolina-7-glucósida, c) apigenina-rutinósido, d) kaempferol-7-glucosida y e) ácido p-cumárico.

Tabla 2.4. Máximo de longitud de ondas de los compuestos

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Longitud de onda (nm)
3 - hidroxitirosol	10.47	280
Luteolina-7-glucósida	18.78	370
Apigenina-rutinósido	19.50	370
kaempferol-7-glucosida	20.54	370
ácido p-cumárico	18.24	325

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.1. Experimentos en batch

Los estudios en batch consistieron en la evaluación de sistemas de resina/extracto para la selección de las resinas que se utilizaron, posteriormente, en la optimización del proceso de purificación de extractos y en el estudio de la cinética de adsorción y desorción de las mismas. Es así como se ha evaluado el comportamiento de diversas resinas poliméricas (no funcionalizadas y de intercambio iónico) en las etapas de retención y recuperación para la purificación del extracto de hojas de olivo, siendo éste el objetivo del presente proyecto.

En los siguientes apartados se muestran los resultados obtenidos de los estudios realizados para la retención de polifenoles mediante los distintos tipos de resinas poliméricas. Considerando que a pesar de que para las resinas de intercambio iónico se trabajaron a las mismas condiciones que las resinas no funcionalizadas, se añadió el estudio de la modificación del pH en el extracto de hojas de olivo diluido en agua 1:1. También se incluyen los resultados obtenidos para los estudios correspondientes a la etapa de desorción en las diversas resinas y el estudio del efecto del porcentaje del etanol para la optimización de las resinas seleccionadas. Aunado a esto, se describen los estudios realizados para la cinética de adsorción y desorción de las resinas seleccionadas.

Para evaluar la eficacia de los procesos de adsorción y desorción se seleccionaron el 3-hidroxitirosol, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico, como los polifenoles de referencia en el extracto.

3.2. Selección de la resina polimérica a optimizar

3.2.1. Estudios de purificación de extractos de polifenoles con resinas poliméricas no funcionalizadas

3.2.1.1. Adsorción y desorción

Para la adsorción se realizaron una serie de experimentos con las resinas PAD610, PAD900, PAD950 y MN-202, con cuatro replicados, considerando la relación de masa resina:volumen de extracto 1:20 (0,25 g:5 mL). Una vez obtenido los cromatogramas por HPLC-UV se realizaron las integraciones de los datos para los compuestos de interés

(3-hidroxitirosol, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico).

Considerando estudios previos realizados por el grupo de investigación de la Universidad de Barcelona y su compatibilidad con la industria alimentaria se utilizó el etanol al 100% como eluyente para la etapa de desorción. De la misma manera que en la etapa de adsorción, se obtuvieron los cromatogramas por HPLC-UV y se realizaron las integraciones de los datos para los polifenoles de interés.

Las capacidades de adsorción ($q_{adsorción}$) y las capacidades de desorción ($q_{desorción}$) se han calculado utilizando la Ecuación 3.1 y Ecuación 3.2 respectivamente para cada uno de las resinas, donde $C_{inicial}$ es la concentración inicial del extracto, $C_{equilibrio}$ es la concentración de la solución en equilibrio después de haber estado en contacto el extracto con la resina a un tiempo determinado, $V_{muestra}$ es el volumen del extracto y m_{resina} es la masa de la resina.

$$q_{adsorción} = \frac{(C_{inicial} - C_{equilibrio}) \left[\frac{mg}{L} \right] \cdot V_{muestra} [L]}{m_{resina} [g]} \left[\frac{mg}{g} \right] \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$q_{desorción} = \frac{C_{equilibrio} \left[\frac{mg}{L} \right] \cdot V_{eluyente} [L]}{m_{resina} [g]} \left[\frac{mg}{g} \right] \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Finalmente, en la Figura 3.1 se muestran los resultados promedios obtenidos del porcentaje de recuperación, con sus respectivos errores, para el 3-hidroxitirosol, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico, calculados a partir de la Ecuación 3.3.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{q_{desorción}}{q_{adsorción}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 3.3}$$

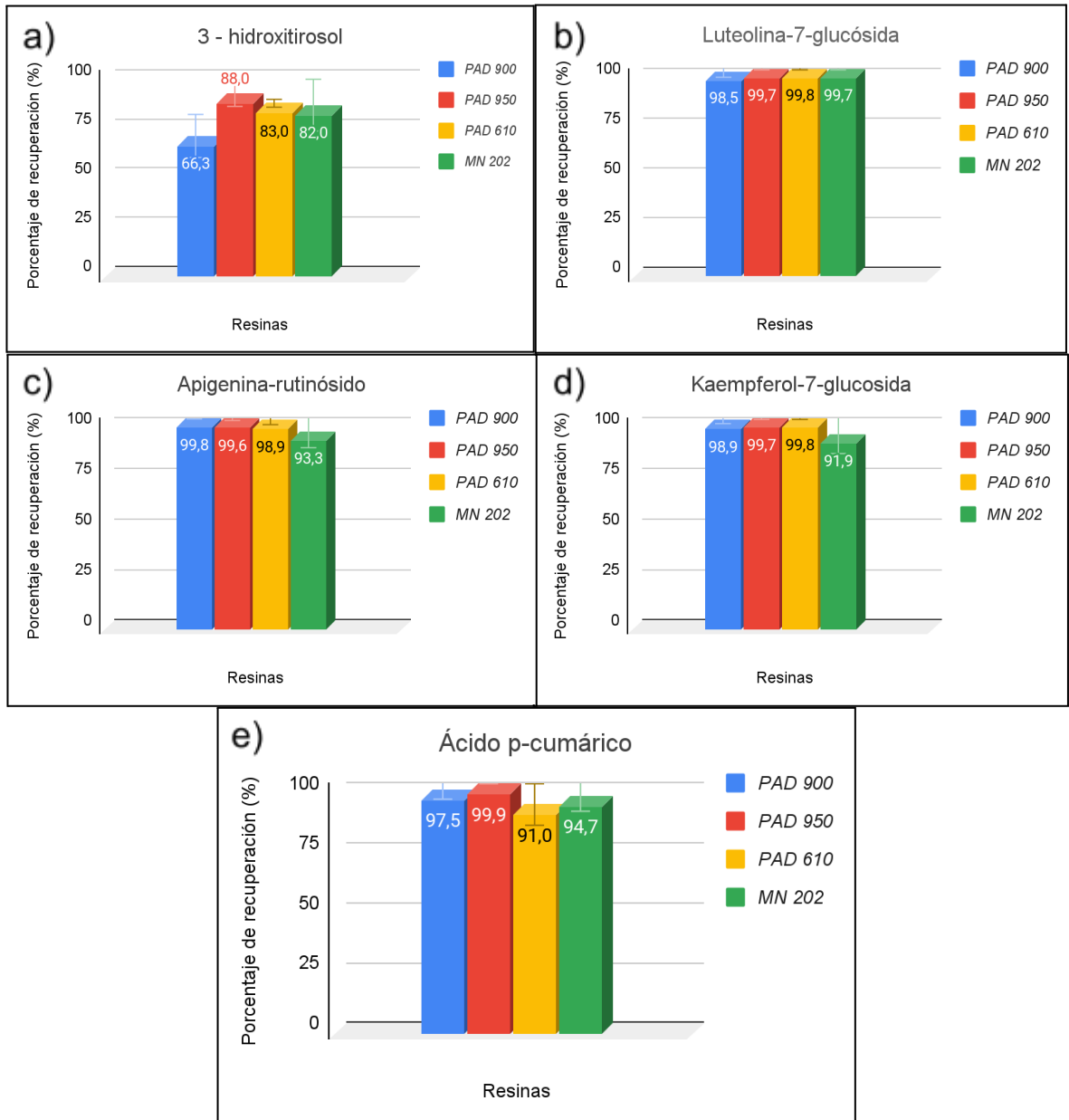


Figura 3.1. Resultados de los porcentajes de recuperación del: a) 3-hidroxitirosol, b) luteolina-7-glucósida, c) apigenina-rutinósido, d) kaempferol-7-glucosida y e) ácido p-cumárico para las resinas PAD 900, PAD 950, PAD 610 y MN-202.

Los resultados obtenidos muestran que las resinas con estructura polimérica de polimetacrilato reticulado con divinilbenceno (PAD 610), polimetacrílico (PAD 950) y polidivinilbenceno (PAD 900) presentan porcentajes de recuperación superiores a lo obtenido con la resina de poliestireno macroporoso reticulado con divinilbenceno (MN-202) en todos los compuestos excepto para el 3-hidroxitirosol.

Para los compuestos de luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido y kaempferol-7-glucosida las resinas del tipo PuroSorb presentan porcentajes de recuperación cercanos al 100%. La capacidad de adsorción promedio de la resina MN-202, calculado con la Ecuación 3.1, para el compuesto de 3-hidroxitirosol es del 0,7 [mg/g] siendo éste un resultado mayor comparado con las resinas PAD 900, PAD 950 y PAD 610 que poseen una capacidad de adsorción promedio de 0,31, 0,28 y 0,48 [mg/g] respectivamente. Esto puede ser atribuido a que este compuesto tiene una mayor afinidad con la resina MN-202 debido a que éste último posee la particularidad de no solo tener una estructura macroporosa sino también de proporcionar una microporosidad debido a que presenta una polimerización clásica de divinilbenceno reticulado (<https://www.purolite.com/product/mn202>) permitiendo así que pequeñas moléculas como el 3-hidroxitirosol puedan ser adsorbidos con facilidad.

A nivel general se observa que tanto las resinas PuroSorb como Macronet presentan porcentajes de adsorción favorables, esto se puede deber a que estas resinas tienen una gran afinidad por las moléculas hidrófobas, como lo son los polifenoles. Para una adsorción máxima de la molécula, la resina debe tener una elevada área superficial con una alta porosidad. El área superficial es inversamente proporcional al diámetro del poro para un volumen de poro dado, esto quiere decir que los poros pequeños son los que contribuyen al área superficial pero el diámetro de los poros debe ser lo suficientemente grande para la adsorción (Purolite 2021). Considerando lo antes mencionado y la Tabla 3.1, se puede observar que las resinas PAD 900, PAD 950 y PAD610 poseen un volumen de poro mayor a MN-202, lo que podría suponer que los resultados en la adsorción son favorables debido a que se tiene un diámetro suficiente para lograr un área superficial mayor, permitiendo que moléculas de gran tamaño penetre en los poros con cierta facilidad.

En otros estudios realizados para la recuperación de compuestos fenólicos de aguas residuales de almazaras se evaluaron la capacidad de adsorción y desorción de las resinas MN 200, MN 202, PAD 900 y PAD 950, dando como resultado que las resinas Macronet presentaron un mayor porcentaje de adsorción mientras que la resina PAD 900 presentó la adsorción más baja de los compuestos fenólicos. En el caso de la desorción, la resina que presenta mejores resultados es la PAD 900. Sin embargo, este estudio no especifica los compuestos fenólicos que se analizaron (Cifuentes, M. 2021).

Tabla 3.1. Características de las resinas PAD900, PAD950, PAD610 y MN-202.

Resina	Tipo de estructura	Área superficial típica (m ² /g)	Volumen típico del poro (ml/g)	Diámetro típico del poro (Å)	Grupo funcional
PAD 900	Polidivinilbenceno	850	1.9	220	No iónico
PAD 950	Polimetacrílico	450	0.6	120	No iónico
PAD 610	Polimetacrílico / divinilbenceno	490	1.2	240	No iónico
MN-202	Poliestireno macroporoso / divinilbenceno	950	0.3	220	Ninguno

3.2.2. Estudios de purificación de extractos de polifenoles con resinas poliméricas de intercambio iónico.

3.2.2.1. Adsorción y desorción

Muchos de los compuestos de polifenoles presentan propiedades ácido-base y las interacciones con las resinas pueden verse afectadas por el pH, en función de la especie que predomina. Debido a que en ésta sección se trabajó con resinas poliméricas de intercambio iónico, A860, A520E y A500p, se realizaron experimentos variando el pH del extracto que fue previamente diluido con agua en 1:1. Se ensayaron entonces, dos condiciones: una sin modificar el pH del extracto (pH = 5,3) y otra a pH básico (pH = 11), con el objetivo de evaluar la interacción de la resina con el extracto diluido a diferentes pHs.

En los resultados obtenidos (Tabla 3.3 y Tabla 3.4) se observa que el porcentaje de recuperación, con el incremento del pH, varía considerablemente de forma desfavorable para las resinas A520E y A500P. En el caso de la resina A860 (Tabla 3.2) presenta un mayor porcentaje de recuperación a un pH igual 11 pero para dos de los compuestos (3-hidroxitirosol y la apigenina-rutinósido) no presentan porcentajes de recuperación. Es acorde esperar que la capacidad de desorción sean desfavorables e incluso críticos ya que no hubo una buena capacidad de absorbancia. Esto último puede verse atribuido a que las resinas tienen estructuras aniónicas fuertemente básicas (<https://www.purolite.com/product/a860>), por lo que no se logra la interacción deseada entre la resina y el extracto. Por ende, un cambio a pH básico en el extracto diluido inicial

no es favorable. Debido a ello, no parece justificado proceder a realizar un cambio de pH con el fin de aumentar el rendimiento en la etapa de adsorción.

Tabla 3.2. Resultados del estudio del efecto de pH en la adsorción de los compuestos de interés utilizando resinas de intercambio iónico A860.

Compuestos	A860			
	pH 5,3		pH 11	
	Porcentaje de recuperación (%)	Desviación estándar	Porcentaje de recuperación (%)	Desviación estándar
3 - hidroxitirosol	0,0	0,0	0,0	0,0
Luteolina-7-glucósida	12,7	14,7	28,3	25,2
Apigenina-rutinósido	0,0	0,0	0,0	0,0
kaempferol-7-glucosida	22,5	28,5	70,6	23,7
Ácido p-cumárico	0,0	0,0	38,5	38,1

Tabla 3.3. Resultados del estudio del efecto de pH en la adsorción de los compuestos de interés utilizando resinas intercambio iónico A520E

Compuestos	A520E			
	pH 5,3		pH 11	
	Porcentaje de recuperación (%)	Desviación estándar	Porcentaje de recuperación (%)	Desviación estándar
3 - hidroxitirosol	65,8	26,5	29,4	8,7
Luteolina-7-glucósida	26,6	6,2	24,5	10,6
Apigenina-rutinósido	47,6	23,3	38,7	8,5
kaempferol-7-glucosida	64,0	64,0	36,7	5,5
Ácido p-cumárico	41,3	26,9	39,4	11,0

Tabla 3.4. Resultados del estudio del efecto de pH en la adsorción de los compuestos de interés utilizando resinas de intercambio iónico A520P

Compuestos	A500P			
	pH 5,3		pH 11	
	Porcentaje de recuperación (%)	Desviación estándar	Porcentaje de recuperación (%)	Desviación estándar
3 - hidroxitirosol	52,1	17,4	32,3	8,8
Luteolina-7-glucósida	23,0	3,8	25,8	1,4
Apigenina-rutinósido	45,7	22,5	31,2	4,9
kaempferol-7-glucósida	44,4	8,8	31,8	5,3
Ácido p-cumárico	56,1	15,9	23,2	2,7

3.2.3. Comparación entre las resinas poliméricas no funcionalizadas y de intercambio iónico

Para finalizar esta sección, es pertinente considerar tanto los resultados utilizando resinas poliméricas de intercambio iónico como los resultados correspondientes a los adsorbentes no funcionalizados para poder seleccionar la resina que ofrece un mejor rendimiento tanto en su adsorción como en su desorción. En función a esto se puede observar que para los adsorbentes no funcionalizados se obtuvo un mejor porcentaje de recuperación comparado con las resinas de intercambio iónico. Estudios previos demostraron también que, para los adsorbentes no funcionalizados, como PAD610 y MN202, presentan una mejor capacidad de adsorción de compuestos de polifenoles que una resina de intercambio iónico como Aurix 100 (Tabla R., N. 2020). Es por esta razón que se enfocaron los esfuerzos en la optimización de las resinas poliméricas no funcionalizadas.

En el caso de la línea PuroSorb se observa que presentan resultados muy similares, es por esto que, a modo de poder lograr una mejor comparación entre resinas, se seleccionaron dos resinas con estructuras diferentes y que a su vez presenten buenos resultados tanto en su etapa adsorción como de desorción. Tomando en cuenta que PAD 900 es una de las resinas recomendadas para la extracción de polifenoles, así como también la MN202 (Purolite 2023), que ambos poseen estructuras diferentes: polímero

polidivinilbenceno y poliestireno macroporoso reticulado con divinilbenceno respectivamente y que estudios previos mencionados anteriormente mostraron buen desempeño con estas resinas, se hizo conveniente seleccionar ambas resinas para la realización de los estudios de adsorción y desorción y la optimización en su etapa de desorción.

3.3. Estudios de purificación de polifenoles con resinas seleccionadas

3.3.1. Cinética de adsorción

Para esta parte del estudio se seleccionaron las resinas PAD900 y MN-202. En este caso, se analizaron diferentes muestras obtenidas en diferentes tiempos experimentales. Una vez realizada la integración de las áreas, se calcularon los porcentajes de adsorción a partir de la Ecuación 3.4 donde C_p es la concentración de los compuestos de interés en el extracto antes de haber sido equilibrado con la resina, es decir, la concentración de control, y C_r es la concentración después haber sido tratado con la resina a un determinado tiempo. En este caso, C_r corresponde la concentración obtenida a un tiempo de estabilización igual a 60 minutos.

$$\text{Porcentaje de retención (\%)} = \frac{(C_p - C_r)}{C_p} \cdot 100\% \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Se obtuvieron los resultados de la Figura 3.2 y 3.3, correspondiente a la cinética de la adsorción de la resina PAD 900 y MN-202 respectivamente.

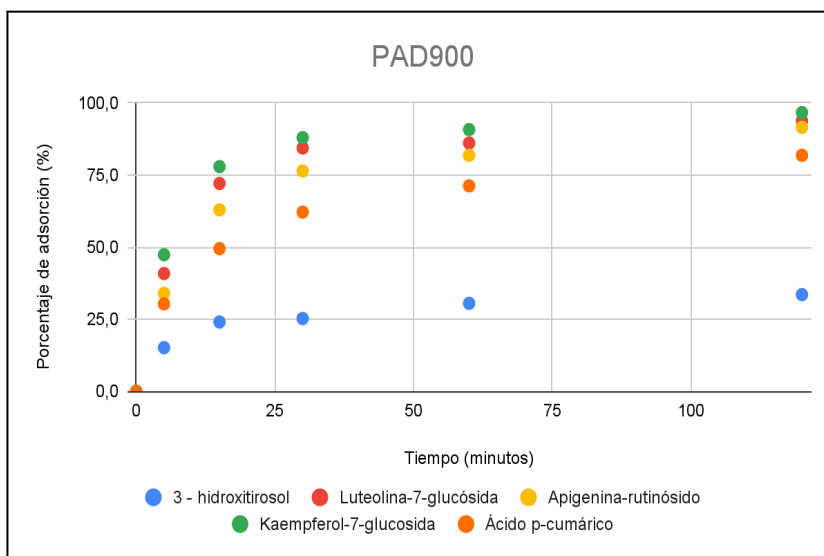


Figura 3.2. Cinética de la adsorción de los compuestos 3-hidroxitirosol, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico, utilizando la resina PAD 900.

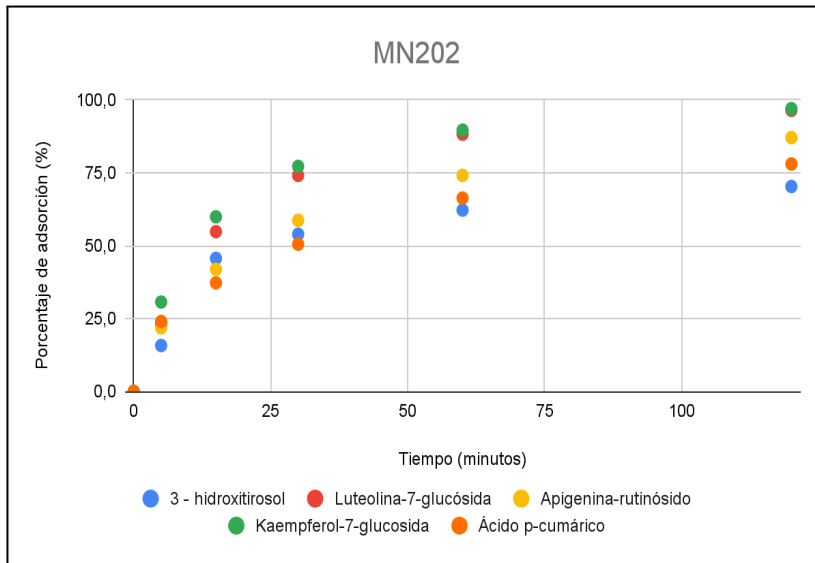


Figura 3.3. Cinética de la adsorción de los compuestos 3-hidroxitiroso, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico, utilizando la resina MN-202.

Para esta parte del estudio de la cinética de adsorción con la resina PAD 900 y MN-202, se extrajeron las muestras de cada uno de los Falcons en el que estaba contenida la carga de resina/extracto, en un intervalo de tiempo de 5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min, luego se filtró y posteriormente se analizó en HPLC-UV. Tanto en la Figura 3.2 como en la Figura 3.3 se observa que el porcentaje de adsorción aumenta a medida que aumenta el tiempo. Para ambas resinas, el tiempo de estabilización en promedio se presentó pasado los 60 minutos, lo que permite decir que, a partir de la hora de interacción entre resina y extracto de olivo, la solución llega al equilibrio con la resina, por lo que en términos de aprovechamiento de recursos es conveniente. Así mismo, se observa con mayor claridad como el porcentaje de adsorción del polifenol 3-hidroxitiroso fue menos eficiente para la resina PAD 900, siendo este no mayor al 40% (Figura 3.2). Finalmente, se presentaron los mejores resultados de rendimiento de adsorción para los compuestos de luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida en ambas resinas.

3.3.2. Optimización de desorción según el contenido de etanol

En esta sección se realizaron una serie de experimentos de elución con la resina PAD900 y MN-202 evaluando distintos porcentajes de pureza para el eluyente. Estos porcentajes fueron 20%, 50%, 80%, 90% y 100% de etanol. Para esto se utilizó la carga de la fase experimental anterior (adsorción), realizado a los 60 minutos, se realizaron la integración de datos experimentales generados por el HPLC-UV y se calcularon los porcentajes de desorción de acuerdo con la Ecuación 3.5, donde C_e es la concentración de la solución después de haberse estabilizado con la resina en la etapa de retención a un

tiempo de equilibrio (60 minutos) y C_d es la concentración correspondiente a la recuperación de los compuestos de polifenoles en etapa de desorción.

$$\text{Porcentaje de desorción (\%)} = \frac{C_d}{(C_d - C_e)} \cdot 100\%, \text{ siendo } C_e = C_{60} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 3.4.

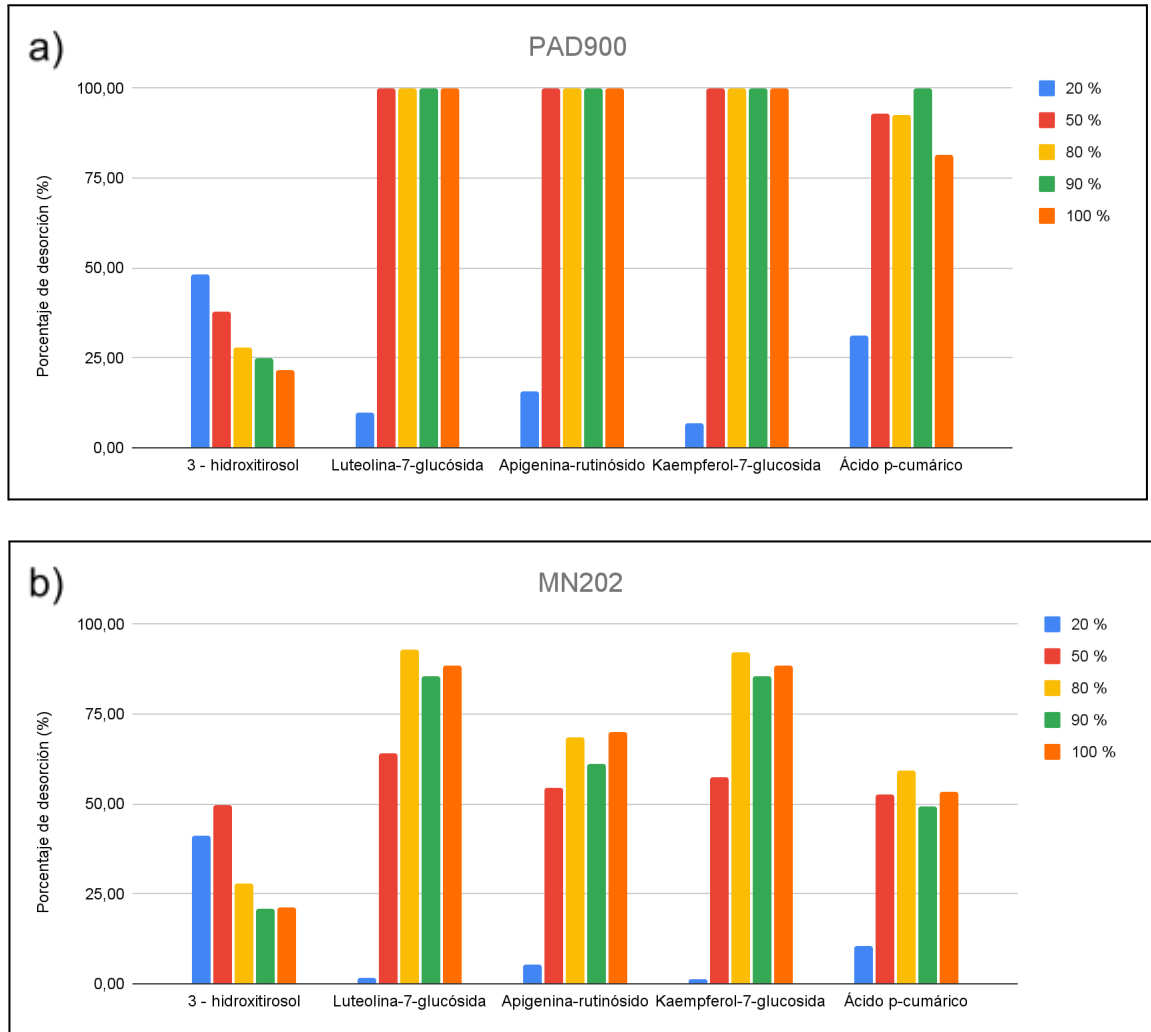


Figura 3.4. Efecto del porcentaje de etanol en la desorción de los compuestos de 3-hidroxitiroso, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico, con la resina a) PAD 900 y b) MN-202.

En líneas generales para ambas resinas se puede observar que el porcentaje de desorción aumenta a medida que aumenta el porcentaje de etanol de la solución eluyente. Sin embargo, se destaca que para la resina MN-202 se tiene un menor porcentaje de desorción al utilizar etanol 100% como eluyente (Figura 3.4b), lo mismo sucede para la

resina PAD 900 pero con una diferencia menor (Figura 3.4a). Este mismo comportamiento se presentó en estudios como el de la recuperación de compuestos fenólicos de aguas residuales de almazaras, que indicaba que con un 50% de etanol:agua se obtenía un mayor porcentaje de desorción (Cifuentes, M. 2021). Así mismo sucedió con el estudio de la elución a un 80% etanol:agua y 100% etanol, en donde se obtuvo mayores porcentajes de desorción para todos los compuestos estudiados a un 80% etanol (Tabla R., N. 2020). Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este proyecto y en estudios previos, se selecciona 80% de etanol como eluyente para realizar el estudio de la cinética de desorción, debido a que se puede obtener un favorable rendimiento en la recuperación.

3.3.3. Cinética de desorción

Antes de realizar el estudio de la cinética de elución, se realizó la carga de la etapa de retención para las dos resinas seleccionadas, PAD 900 y MN 202. La Figura 3.5 muestra el cronograma obtenido por HPLC-UV para el extracto antes de la adsorción, la muestra inicial o de control. La Figura 3.6 y Figura 3.7 muestran los cromatogramas correspondientes a la resina MN-202 y PAD 900 respectivamente, después de la adsorción.

Se puede obtener un panorama bastante completo de la capacidad de adsorción favorables que ambas resinas tienen, debido a que se puede observar una disminución de la señal comparado con el cromatograma correspondiente a la muestra control (Figura 3.5). Por lo tanto, se puede decir que a simple vista estas resinas proporcionan porcentajes de adsorción elevados con el extracto de hojas de oliva. También es posible observar como la resina PAD 900 presenta una considerable disminución de la señal (Figura 3.7) comparado con la resina MN-202 (Figura 3.6), lo que indica que la resina PAD 900 adsorbió mejor que la resina MN-202.

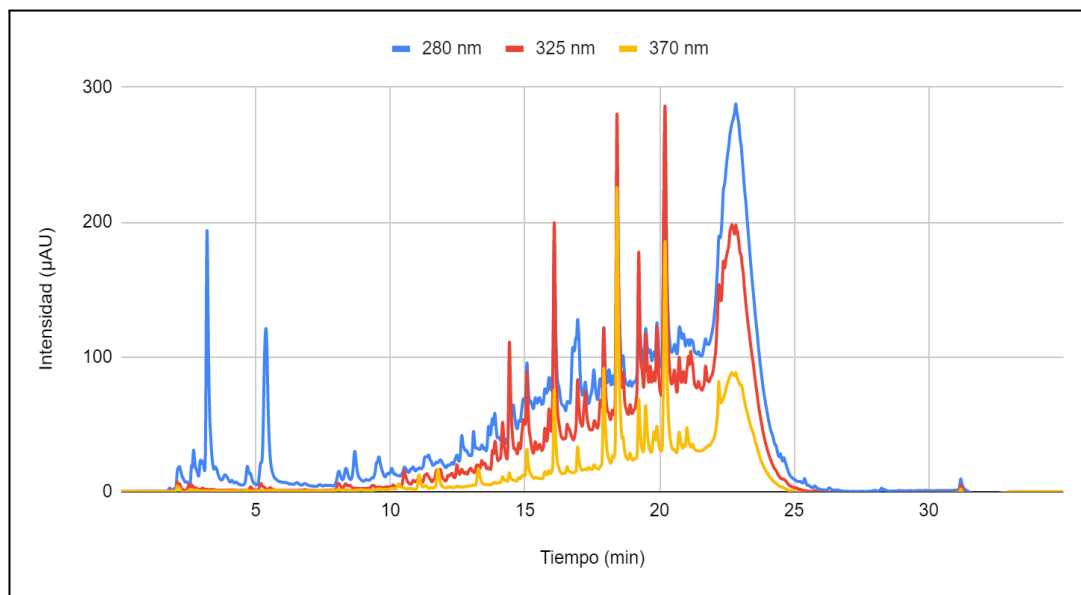


Figura 3.5. Cromatograma a 280 nm, 325 nm y 370 nm, respectivamente, del extracto inicial.

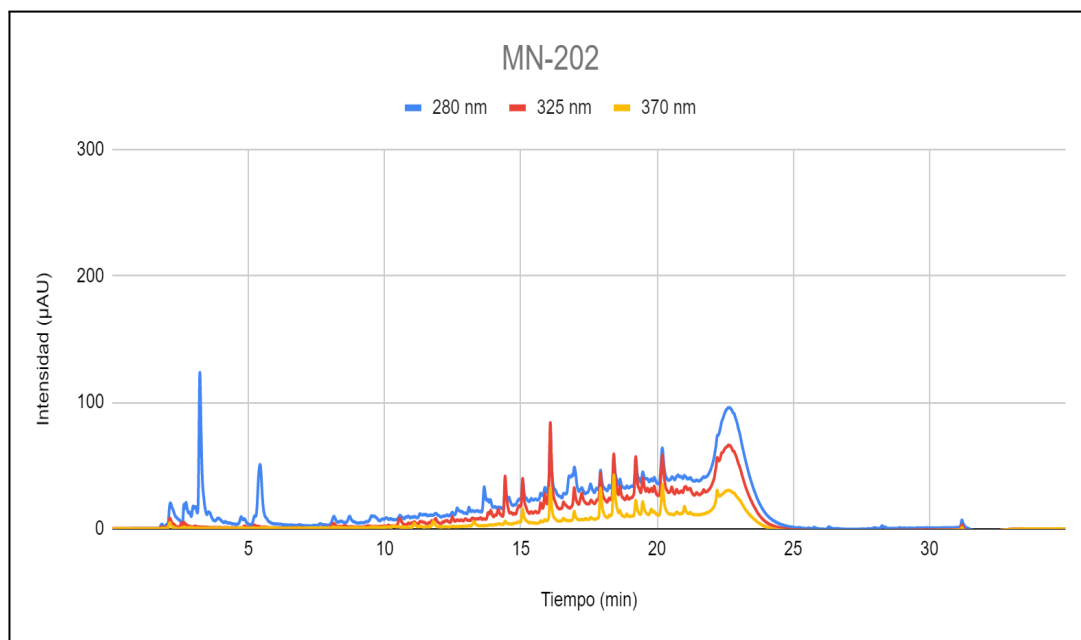


Figura 3.6. Cromatograma a 280 nm, 325 nm y 370 nm, respectivamente, de la solución equilibrada con la resina MN-202 a los 60 minutos.

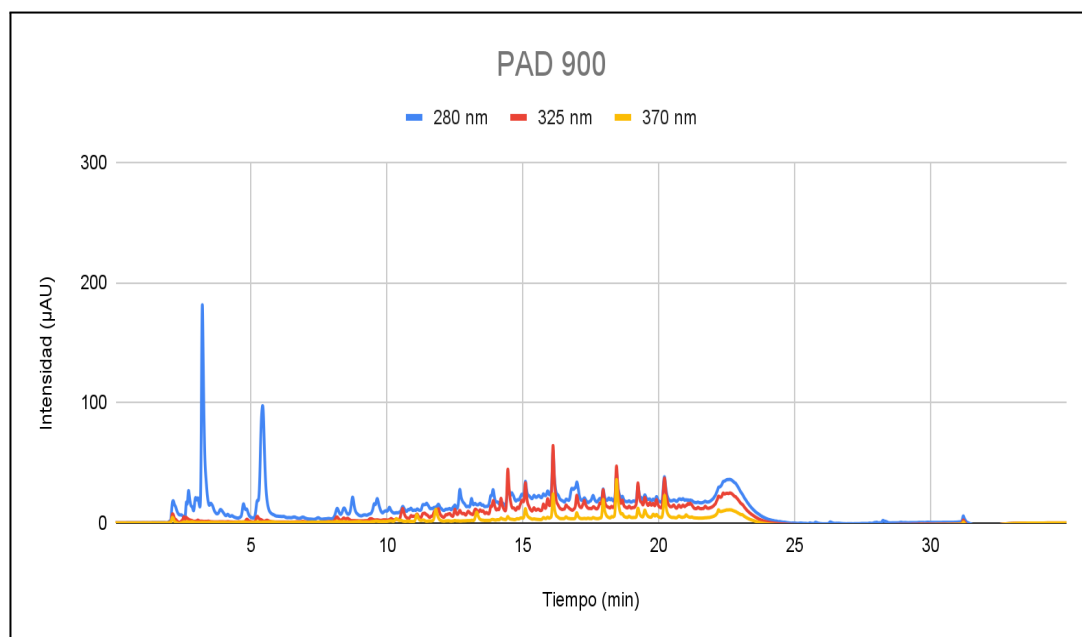


Figura 3.7 Cromatograma a 280 nm, 325 nm y 370 nm, respectivamente, de la solución equilibrada con la resina PAD 900 a los 60 minutos.

Finalmente, se realizó el estudio de la cinética de la elución para ambas resinas. Para esto se realizaron una serie de experimentos con la resina MN-202 y PAD900 con el solvente de la elución, etanol:agua 80%, en un tiempo de 5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 minutos. Estos datos se analizaron mediante el HPLC-UV y se realizaron los cálculos del porcentaje de desorción para cada uno de los compuestos de interés, a partir de la Ecuación 3.5. En las Figuras 3.8 y 3.9 se presentan las cinéticas de desorción utilizando como eluyente etanol al 80% para PAD 900 y MN- 202 respectivamente. En ambas resinas se observan que se logró estabilizar la curva de la cinética pasados los primeros 30 minutos. Además, se observa que la desorción de los polifenoles para la resina PAD 900 fue menos eficiente para el 3-hidroxitirosol y el ácido p-cumárico, si se comparan dichos compuestos con el resto estudiado (Figura 3.8). Pero al ser comparado entre resinas, se puede observar que para PAD 900 se tuvo un porcentaje de desorción superior al 70% en cuatro de los cinco compuestos de interés, mientras que para MN-202 solo tres de los cinco compuestos de polifenoles seleccionados alcanzaron una desorción mayor al 70% y que la curva de la cinética muestra un proceso de desorción menos rápido.

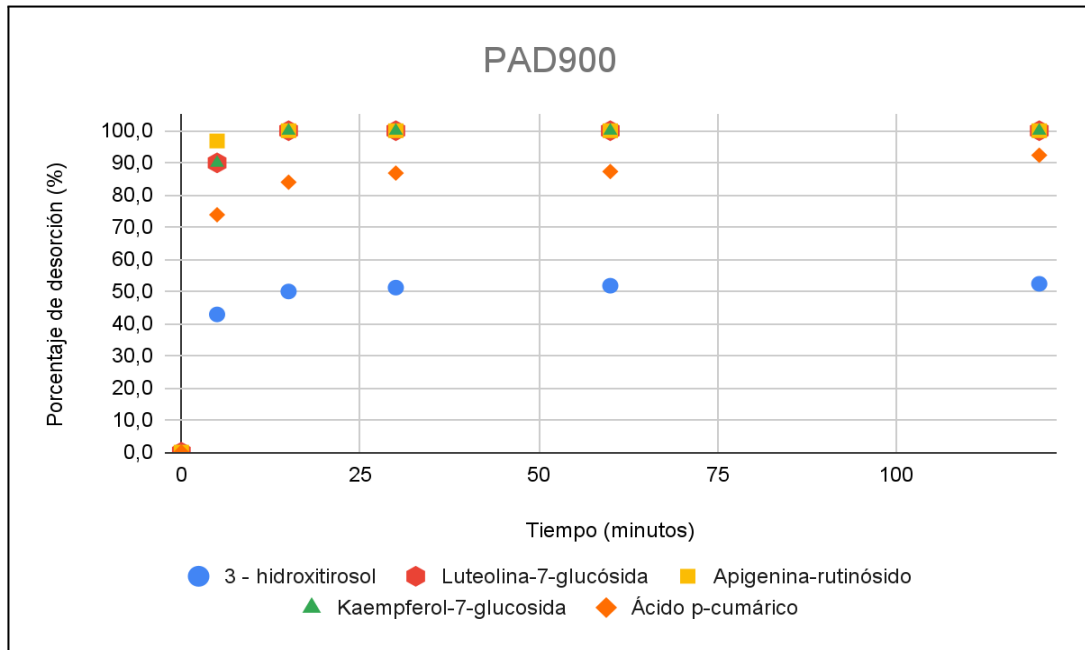


Figura 3.8. Cinética de la desorción de los compuestos 3-hidroxitirosol, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico, utilizando la resina PAD 900.

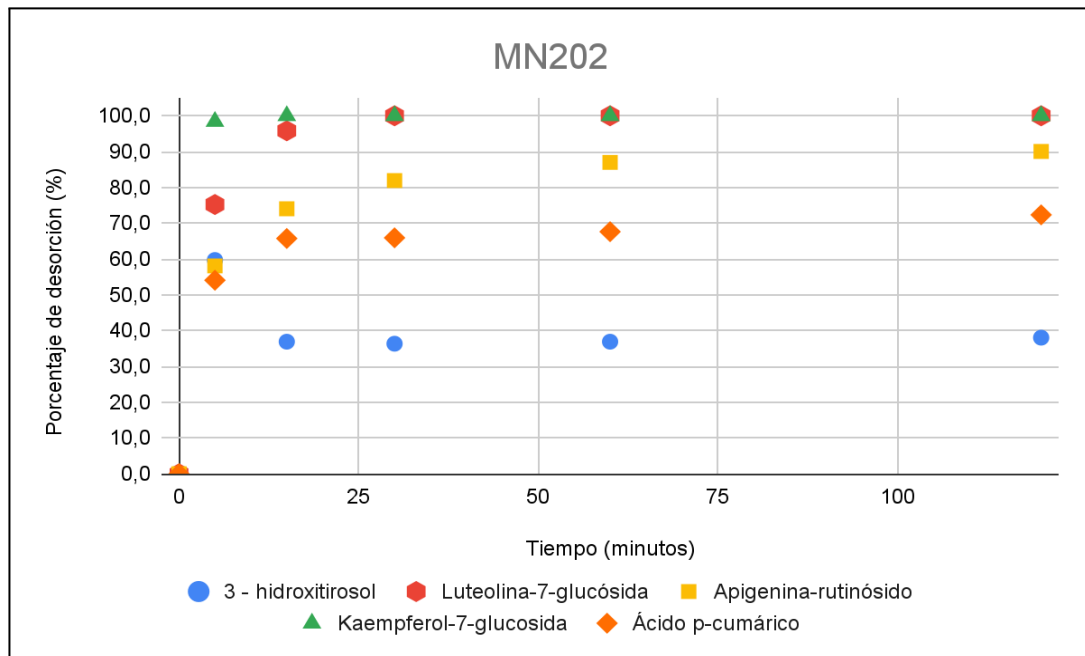


Figura 3.9. Cinética de la desorción de los compuestos 3-hidroxitirosol, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico, utilizando la resina MN-202.

4. ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL

Aunque el aceite de oliva per sé es un alimento con propiedades saludables para la población y su producción puede comprender la base económica para algunas regiones de España, es importante resaltar que, como toda industria agroalimentaria, este produce una serie de residuos que debe ser tratado para evitar un impacto negativo no solo a nivel global sino también empezando por las mismas localidades que trabajan su cultivo.

Para el sector olivero supone un problema no solo económico sino también ambiental desde varios puntos de vista puesto que los residuos obtenidos pueden ser tanto por la obtención del aceite de oliva como por la propia actividad agraria, es decir el propio cultivo de olivo. Esto implica la generación de efluentes y materiales orgánicos, como restos de poda, orujos y hojas de olivo, teniendo éste último un potencial enorme para ser reutilizado, debido a sus beneficios para la salud del hombre por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y neuroprotectoras (Quiñones, M. 2011), motivado a su alta concentración de polifenoles. El aprovechamiento de estos residuos puede llegar a reducir emisiones de gases de efecto invernadero, evitar la deposición de los residuos en vertederos y a su vez puede llegar a aportar y facilitar, como materia prima, a diversos sectores de la industria como la farmacéutica, la nutrición animal, de alimentación humana y nutracéutico, entre otros, siendo así una ventaja ambiental doble. Es por ello que se requiere una gestión eficaz, a través de la demostración técnica y económica de un proceso que sea sostenible para la recuperación y revalorización de compuestos de polifenoles, garantizando eficiencia en el sector, sostenibilidad ambiental y mejoramiento en la cadena de valor.

La idea de desarrollar proyectos como éste es poder generar respuestas factibles sobre el tratamiento de estos subproductos de forma viable y económica, es por esto que se hace indispensable comenzar a nivel de laboratorio y evaluar cómo estos estudios impactan en el ambiente, para luego ser llevado a escala industrial que permita el reaprovechamiento de los residuos. Para lograr el objetivo de potenciar el aprovechamiento de estos residuos para la obtención de productos bio-activos, se hizo necesario empezar por la caracterización y conocimiento de físico químico del subproducto, que en este caso son las hojas de olivos, para luego optimizar las metodologías de extracción, separación y purificación de los compuestos bio-activos presentes en esta matriz, es por ello que se inició a pequeña escala de laboratorio para lograr la máxima eficiencia, ahora, ¿Cómo estos procesos a nivel de laboratorio afectan al medio ambiente.

Evaluable cada una de las fases del proyecto asociado al trabajo experimental en el laboratorio, se observa que se han generado residuos sólidos como lo son los tubos de Falcon, puntas de pipetas de diferentes tamaños, jeringas, agujas hipodérmicas, filtros de disco, viales de laboratorio, los cuales se han depositado en contenedores de sólidos absorbentes contaminantes. Así mismo los extractos diluidos con agua utilizada de los experimentos se lanzan al fregadero debido a que estos no contienen toxicidad. Por tanto, podemos afirmar que la metodología de gestión de los residuos generados en este estudio se ha reducido al mínimo, no suponiendo una etapa cuyo impacto ambiental sea muy elevado.

Ahora, si tomamos en cuenta los resultados del proyecto, el mismo busca generar aportes a la valorización de los residuos a través de procesos con aplicaciones concretas a las hojas de olivo como compuestos bio-activos, más allá de ser utilizados como otros residuos, para producir energía, compostaje, entre otros. Considerando que dichas pruebas experimentales son a nivel de laboratorio y que los resultados de dichas pruebas son importante para el avance de la tecnología sostenible para la recuperación y valorización de polifenoles de los residuos de la industria de la aceituna, se puede decir que existe una compensación de los residuos generados en esta fase del proyecto, debido a que tiene el fin de mejorar la eficiencia en el uso de los recursos basándose en la idea de la economía circular. En este caso se hace necesario resaltar que es inevitable que, en cada etapa de la producción de un producto, se generen residuos y que la solución aportada con este proyecto es solo una de las líneas circulares de muchas líneas circulares en esta gran economía circular, desencadenadas a partir de la idea inicial para la creación de un producto (Ver Figura 4.1) y que busca dentro de lo posible reducir la presión sobre el medio ambiente.

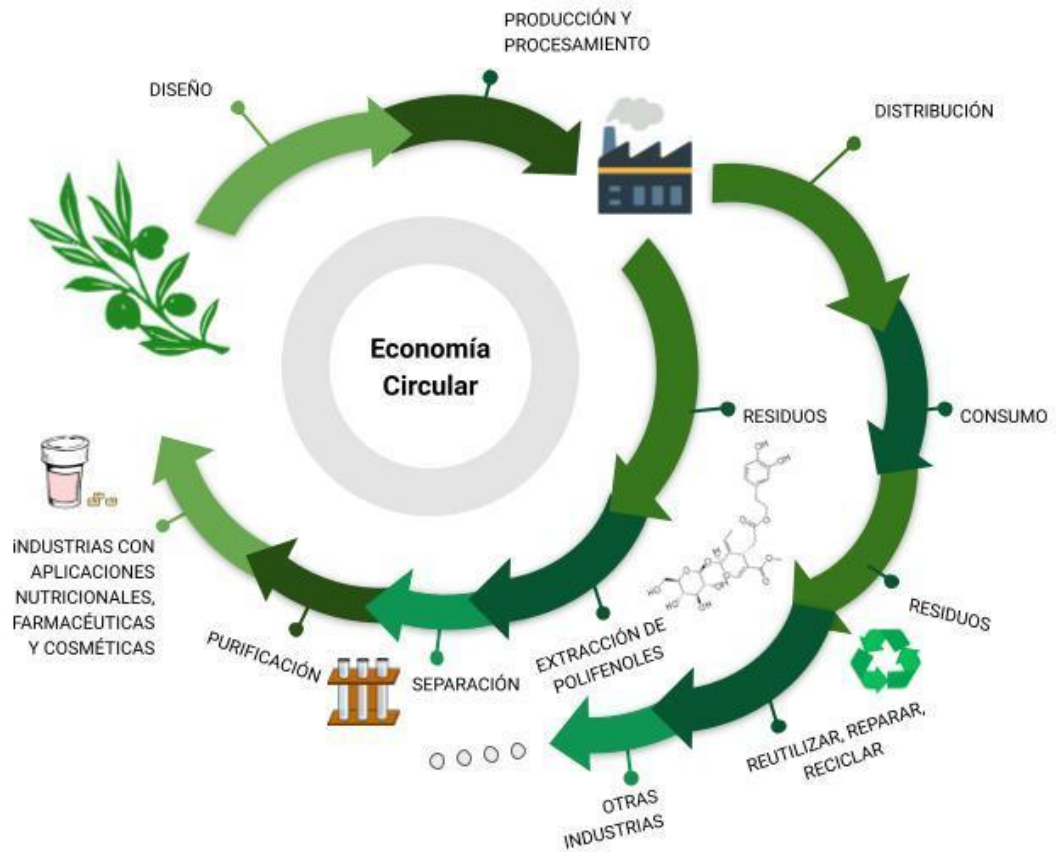


Figura 4.1. Representación de la aplicación del proyecto como una de las vertientes dentro del marco de la economía circular.

5. ANÁLISIS ECONÓMICO

Teniendo en cuenta la novedad de la aplicación de solventes eutécticos profundos, se debe considerar que este proyecto supone una primera prueba de concepto, y que todavía no se dispone de la suficiente información para realizar una propuesta del potencial escalado industrial del proceso. En consecuencia, poder realizar un análisis tecno-económico de la aplicación de estos y de la recuperación de polifenoles mediante adsorbentes estaba fuera del alcance del trabajo. Por ende, el análisis tecno-económico se ha centrado en la ejecución de este estudio.

Se presenta un análisis económico del proyecto, el cual incluye los costos variables y los costos fijos. En el caso de los costos variables se consideran los costos de producción que comprenden los costos del material y de los reactivos utilizados en el proyecto (Tabla 5.1). (Lab Equipment and Lab Supplies, Fisher Scientific, s.f).

Tabla 5.1. Costos variables del proyecto.

COSTOS VARIABLES			
COSTOS DE PRODUCCIÓN			
Costo del Material			
Material	Unidades	Precio (€)	Costo total (€)
Tubos Falcon 10 ml	400	0,39	156,67
Tubos Falcon 50 ml	150	0,45	66,98
Puntas de pipeta 10 ml	400	0,38	151,60
Puntas de pipeta 1 ml	200	0,11	22,40
Vaso de precipitados 50 ml	4	14,80	59,20
Vaso de precipitados 1000 ml	1	105,00	105,00
Matraz aforado 500 ml	1	67,65	67,65
Viales cromatográficos	500	0,28	138,00
Espátula	2	18,70	37,40
Frasco de reactivo de vidrio de 1L	2	25,54	51,08
Filtros de disco de 0,45 µm	300	1,33	397,50
Jeringas	300	0,13	38,85
Imanes de laboratorio	18	0,19	3,43
Agujas esterilizadas	300	0,22	67,05
Total de costo de materiales			1362,81
Costos de reactivos			
Reactivos	Cantidad (L)	Precio (€/L)	Costo total (€)
Etanol	0,20	27,80	5,56
Ácido Clorhídrico	0,04	23,56	23,56
Acetonitrilo	5,00	89,40	447,00
Cloruro de colina	0,22	104,00	23,09
Glicerol	0,71	39,36	27,75
Dimetilsulfóxido	0,01	1400,00	14,00
Ácido fórmico	7,50	36,48	273,60
Resina PAD 900	0,50	4,00	2,00
Resina PAD 950	0,50	4,00	2,00
Resina PAD 610	0,50	4,00	2,00
Resina MN-202	0,50	4,00	2,00

Evaluación de resinas poliméricas para la recuperación de polifenoles procedentes de hojas de olivos

Resina A860	0,50	3,00	1,50
Resina A520E	0,50	3,00	1,50
Resina A500p	0,50	3,00	1,50
Total de costo de reactivos			827,06
TOTAL COSTOS VARIABLES			2189,87

Para los costos fijos se consideran los costos operativos y administrativos (Tabla 5.2). Los costos operativos comprenden el costo de los equipos del laboratorio, el costo de los servicios de internet y el costo energético. El costo de los equipos se calcula en función del costo inicial de los equipos, la vida útil y el tiempo estimado de uso (Lab Equipment and Lab Supplies, Fisher Scientific, s.f.). Para el costo energético del proyecto se toma en cuenta los costos eléctricos del HPLC-UV y la centrifugadora en función al precio de la luz (Tarifasgsluz 2023), el resto de los equipos no se considera su consumo eléctrico debido a su bajo costo. En cuanto al costo del personal se toma en cuenta los salarios correspondientes a un técnico de laboratorio, estudiante de doctorado, profesor y un director (Talent.com, s. f.).

Tabla 5.2. Costos fijos del proyecto

COSTOS FIJOS				
COSTOS OPERATIVOS				
Costo de los equipos de laboratorio				
Equipo	Costo inicial (€)	Vida útil (año)	Tiempo de uso (año)	Costo total (€)
Balanza analítica	1171,75	10	0,11	12,89
Centrifugadora	5238	10	0,11	57,62
Agitador rotatorio	260	10	0,11	2,86
Agitador calefactor	506	10	0,11	5,57
HPLC-UV	49600	10	0,11	545,60
pH-metro	992,99	8	0,11	13,65
Ordenador	1239,18	10	0,11	13,63
Agua Milli-Q	775	10	0,11	8,53
Total del costo de los equipos de laboratorio				660,34

Costo de internet				
Concepto		Velocidad	Precio (€/mes)	Costo total (€)
Servicio		1 GB	87	1044
Costo energético				
Equipo	Consumo eléctrico (kW)	Horas de trabajo (h)	Precio (€/kWh)	Costo (€)
HPLC-UV	0,09	200,00	0,16	2,79
Centrifugadora	0,02	2,00	0,16	0,01
Total del costo energético				2,79
COSTOS ADMINISTRATIVOS				
Costos del personal				
Concepto		Tiempo de trabajo (h)	Sueldo (€/h)	Costo total (€)
Recurso bibliográficos		150	11,28	1692
Formación		80	12,65	1012
Experimentación en el laboratorio		280	11,28	3158,4
Tratamiento de los resultados		90	11,28	1015,2
Redacción de memoria		120	11,28	1353,6
Dirección del proyecto		80	19,28	1542,4
Total del costo del personal				9773,6
TOTAL COSTOS FIJOS				11480,74

En la Tabla 5.3 se muestra el costo total del proyecto obtenido a partir del total de los costos variables y los costos fijos.

Tabla 5.3. Costos totales del proyecto

Costos variables	2189,87
Costos fijos	11480,74
Costo total del proyecto	13670,60

Finalmente, comparando el costo total de este proyecto con uno de los proyectos realizados anteriormente en la Universitat Politècnica de Catalunya en el que se usaba la tecnología de membranas para la recuperación de polifenoles se obtuvo que se requería 14 mil euros para la realización del proyecto (Mestre, P. 2020), teniendo éste un costo superior al costo total del presente proyecto. Es importante resaltar que actualmente el presupuesto

del Ministerio de Ciencia e innovación crece por tercer consecutivo hasta los casi 4.000 millones de euros, confirmando la apuesta del Gobierno de España por la ciencia e innovación debido a que estos recursos estarán destinados a las mejoras de las condiciones del personal de investigación del sistema público y a la apuesta por nuevos y ambiciosos proyectos (Ministerio de Ciencia e Innovación, 2023). Así mismo, según el listado de proyectos de la memoria anual 2021 de CETAQUA Barcelona, se tiene que en el área de Sostenibilidad ambiental, económica y social contaba, para la fecha, con un presupuesto total de aproximadamente 10.5 millones de euros. De acuerdo con esto, el presente proyecto representaría el 0,1% de dicho presupuesto, por lo que es posible llegar a pensar en la probabilidad de un financiamiento para llevar a cabo este proyecto.

CONCLUSIONES

En una primera fase, los adsorbentes no funcionalizados (PAD 900, PAD 950, PAD 610 y MN-202) presentaron mejores porcentajes de recuperación de los compuestos de polifenoles de interés (3-hidroxitirosol, luteolina-7-glucósida, apigenina-rutinósido, kaempferol-7-glucosida y ácido p-cumárico) que las resinas de intercambio iónico (A860, A520e, A500p).

Para las resinas de intercambio iónico, se observó que el cambio del pH del extracto diluido de las hojas de olivo no generaron rendimientos favorables en la capacidad de adsorción y por ende en la capacidad de desorción.

La resina de polidivinilbenceno (PAD 900) y la resina de poliestireno macroporoso reticulado con divinilbenceno (MN-202) demostraron, mediante los estudios realizados en batch, un porcentaje de recuperación mayor al 90% en cuatro de los cinco compuestos de polifenoles de interés del extracto de hojas de olivo, siendo estas las resinas seleccionadas.

La adsorción del 3-hidroxitirosol fue menos eficiente para la resina PAD 900, mientras que para la resina MN-202 presentó un porcentaje de adsorción mayor, siendo éste superior al 60%

Las mezclas agua-etanol fueron adecuadas para la desorción de los compuestos de polifenoles y se evidenció el favorecimiento de la elución a medida que se aumenta el porcentaje de etanol, siendo 80% el porcentaje de etanol suficiente para lograr porcentajes de desorción superiores al 80% en al menos cuatro de los cinco compuestos de interés.

El estudio de la cinética de adsorción de las resinas seleccionadas demostró que el equilibrio de interacción entre la resina y el volumen de extracto se alcanzó a los 60 minutos para ambas resinas, siendo éste el tiempo utilizado para la carga realizada para la optimización de la desorción según el porcentaje de etanol. El análisis de los perfiles cinéticos, indica que para las dos resinas evaluadas, se puede alcanzar rendimientos de extracción mayores del 80% del valor de equilibrio, en tiempos menores a 20 min. Ello supone que las aplicaciones de este tipo de resinas en procesos de operación en continuo sean muy factibles.

Finalmente, para el estudio de la cinética de desorción en las resinas seleccionadas, se obtuvo que la resina PAD 900 tuvo un porcentaje de desorción superior al 70% en cuatro de los cinco compuestos de interés, mientras que para MN-202 solo tres de los cinco compuestos de interés alcanzaron una desorción mayor al 70%. Si bien son resultados prometedores, el etanol es un elemento clave para conseguir mejores resultados en la recuperación de los polifenoles y por ende debe ser estudiado con mayor profundidad.

REFERENCIAS

- Barranco Navero, D., Castañeda, C., Cimato, A., Fiorino, P., Navas Trujillo, I., Romero, L. R., Serafini, F., Touzani, A. (2000). *World Catalogue of Olive Varieties*. International Olive Oil Council.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A. & Del Rio, J.A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68, 457-462.
- Cáceres García, À. (2021). *Caracterización y purificación de polifenoles recuperados a partir de residuos de la producción de zumos de naranja*. Universidad de Barcelona.
- Cetaqua Barcelona (2021). Memoria anual 2021, Research Collaboration and Thinking Forward. <https://www.cetaqua.com>
- Cifuentes-Cabezas, M., Mendoza-Roca, J. A., Vincent-Vela, M. C., Álvarez-Blanco, S., (2021). *Resinas para la recuperación de compuestos fenólicos de agua residuales de almazaras*.
- Clodoveo, Maria Lisa, Pasquale Crupi, Alessandro Annunziato, y Filomena Corbo. 2021. «*Innovative Extraction Technologies for Development of Functional Ingredients Based on Polyphenols from Olive Leaves*». *Foods* 11 (1): 103. <https://doi.org/10.3390/foods11010103>.
- Dini, Irene, and Grumetto, Lucia. 2022. "Recent Advances in Natural Polyphenol Research" *Molecules* 27, no. 24: 8777. <https://doi.org/10.3390/molecules27248777>
- Ekins, P., Domenech, T., Drummond, P., Bleischwitz, R., Hughes, N. and Lotti, L. (2019), "The Circular Economy: What, Why, How and Where", Background paper for an OECD/EC Workshop on 5 July 2019 within the workshop series "Managing environmental and energy transitions for regions and cities", Paris.
- Fisher Scientific. «Lab Equipment and Lab Supplies». s. f. <https://www.fishersci.es/>
- García Molano, J. F. (2012) La biodiversidad del olivo (*Olea europea* L.) en Colombia: Estudio molecular, morfológico y fenológico del germoplasma local. Universidad Degli Studi di Parma

- Mallamaci, R., Budriesi, R., Clodoveo, M. L., Biotti, G., Micucci, M., Ragusa, A., Curci, F., Muraglia, M., Corbo, F., & Franchini, C. (2021). Olive Tree in Circular Economy as a Source of Secondary Metabolites Active for Human and Animal Health Beyond Oxidative Stress and Inflammation. *Molecules*, 26(4), 1072. <https://doi.org/10.3390/molecules26041072>.
- Geissdoerfer, Martin, Paulo Savaget, Nancy M.P. Bocken, y Erik Jan Hultink. 2017. «The Circular Economy – A new sustainability paradigm?» *Journal of Cleaner Production* 143 (febrero): 757-68. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.048>.
- Kapellakis, Iosif Emmanouil, Konstantinos P. Tsagarakis, and John C. Crowther. “Olive Oil History, Production and by-Product Management.” *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 7, no. 1 (April 17, 2007): 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9120-9>.
- Li, Chen, Yuanyuan Zheng, Xiaofei Wang, Shilan Feng, and Duolong Di. “Simultaneous Separation and Purification of Flavonoids and Oleuropein from *Olea Europaea* L. (Olive) Leaves Using Macroporous Resin.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, no. 15 (July 11, 2011): 2826–34. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4528>.
- Mestre Tosas, P. (2020). *Recuperación de polifenoles procedentes de residuos agroalimentarios mediante la aplicación de tecnologías de membranas*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Octubre 2020). Informe del Desperdicio Alimentario en la Industria y la distribución en España, 4.
- Ministerio de Ciencia e Innovación (Octubre 2022). Informe del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia, 5.
- Park, Jong Jin, y Won Young Lee. 2020. «Adsorption and desorption characteristics of a phenolic compound from *Ecklonia cava* on macroporous resin». *Food Chemistry* 338 (febrero): 128150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128150>.
- Purolite: an Ecolab Company. (2021) *Polymeric adsorbent Resins for Industrial Applications*.
- Purolite: an Ecolab Company. (2023) *Catálogo de productos*.

- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A.. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89. Recuperado en 13 de enero de 2023, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009&lng=es&tlng=es.
- Romani, A.; Pinelli, P.; Ieri, F.; Bernini, R. (2016) Sustainability, innovation, and green chemistry in the production and valorization of phenolic extracts from *Olea europaea* L. *Sustainability* **2016**, 8, 1002.
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., & Durand, E. (2017). Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3591–3601. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054>
- Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
- Souilem, Safa, Ines Fki, Isao Kobayashi, Nauman Khalid, Marcos A. Neves, Hiroko Isoda, Sami Sayadi, y Mitsutoshi Nakajima. 2016. «Emerging Technologies for Recovery of Value-Added Components from Olive Leaves and Their Applications in Food/Feed Industries». *Food and Bioprocess Technology* 10 (2): 229-48. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1834-7>.
- Swami Handa Sukhdev, Singh Khanuja Suman Preet, Longo Gennaro and Rakesh Dev Dutt. “Extraction Technologies for Medicinal and Aromatics Plants” (2018) Trieste. Centro Internacional para la Ciencia y la Alta Tecnología.
- Tabla R., N. (2020). *Assessment of polymeric resins for the recovery of polyphenols. Avaluació de resines polimèriques per a la recuperació de polifenols*. Universitat de Barcelona.
- Talent.com. s. f. «Búsqueda de empleo en Talent.com» <https://es.talent.com/>.
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A. & Segura-Carretero, A., Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination,

biotic and abiotic influence, and health benefits, *Food Research International* (2015), doi: 10.1016/j.foodres.2015.09.011

Tapia-Quirós, Paulina, Maria Fernanda Montenegro-Landívar, Monica Reig, Xanel Vecino, Teresa Alvarino, José Luis Cortina, Javier Saurina, and Merce Granados. “Olive Mill and Winery Wastes as Viable Sources of Bioactive Compounds: A Study on Polyphenols Recovery.” *Antioxidants* 9, no. 11 (November 1, 2020): 1074. <https://doi.org/10.3390/antiox9111074>.

Tarifasgasluz. 2023. «Precio y horario diario del kWh de luz en el mercado regulado». tarifasgasluz.com. 19 de enero de 2023. <https://tarifasgasluz.com/comparador/precio-kwh>.

Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>

Zhang, Qing-Wen, Li-Gen Lin, and Wen-Cai Ye. “Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review.” *Chinese Medicine* 13, no. 1 (April 17, 2018). <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>