

Valorización de hoja de almazara en el contexto de una biorrefinería. Extracción acuosa en autoclave

J. C. López-Linares, M. Moya*, L. Peláez, E. Ruiz, I. Romero, C. Cara y E. Castro

¹Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, Spain

²Centro de Estudios Avanzados en Energía y Medio Ambiente, Universidad de Jaén,
Campus Las Lagunillas, 23071 Jaén, Spain

Valorization of olive mill leaves in a biorefinery context. Aqueous extraction in autoclave

Valorització de fulla d'almàssera en el context d'una biorrefineria. Extracció aquosa en autoclau

RECEIVED: 24 JULY 2018; REVISED: 5 DECEMBER 2018; ACCEPTED: 10 DECEMBER 2018

SUMMARY

Olive leaves that are generated in the cleaning stage of olives performed in olive mills (olive mill leaves), is an abundant lignocellulosic residue with potential for use in biorefinery.

In this work, as a first stage, the extraction of this waste with water in an autoclave has been investigated through experimental design and surface response methodology. Temperature, time and solid loading were used as operating variables (factors), in the range 100-130 °C, 30-90 minutes and 5-15%, respectively. The results showed that temperature and time were factors with positive influence on the responses of dissolved extracts, sugars and phenols, while solid loading had a negative influence. For the antioxidant capacity, all the factors had a negative influence, except for the time that presented a slightly positive influence. The obtained models showed interaction between the factors. The optimization of the models indicated that the most favorable conditions to maximize extracts (35.74%), sugars (16.66%) and phenols (3.99%) were 130 °C, 90 minutes and 5%. In contrast, the highest antioxidant capacity ($IC_{50} = 2.39$ g/L, DPPH = 230.07 mg Trolox/g extract) was obtained at 100 °C.

Keywords: Sugars; biorefinery; antioxidant capacity; design of experiments; extraction; olive leaves.

RESUMEN

La hoja de olivo, de limpieza de la aceituna en almazara (hoja de almazara), es un residuo lignocelulósico abundante con potencial para su uso en biorrefinería.

En este trabajo, como primera etapa, se ha estudiado, mediante diseño experimental y metodología de superficie de respuesta, la extracción de este residuo con agua en autoclave. Empleando como variables de operación (factores) la temperatura, el tiempo y la carga de sólidos, que se modifican en el intervalo 100-130 °C, 30-90 minutos y 5-15%, respectivamente.

Los resultados han demostrado que temperatura y tiempo son factores con influencia positiva sobre las respuestas de extractos disueltos, azúcares y fenoles, mientras la carga de sólidos presenta influencia negativa. Para la capacidad antioxidante todos los factores presentan influencia negativa, excepto el tiempo que es ligeramente positiva. Los modelos también muestran interacción entre los factores. La optimización de los modelos indica que las condiciones más favorables para maximizar extractos (35,74%), azúcares (16,66%) y fenoles (3,99%) son: 130 °C, 90 minutos y 5%. En cambio, la máxima capacidad antioxidante ($IC_{50} = 2,39$ g/L, DPPH = 230,07 mg Trolox/g extracto) se obtiene a 100 °C.

Palabras clave: Azúcares; biorrefinería; capacidad antioxidante; diseño de experimentos; extracción, hoja de olivo.

RESUM

El full d'olivera, de neteja de l'oliva en almàssera (full d'almàssera), és un residu lignocel·lulòsic abundant amb potencial per al seu ús en biorrefineria.

*Corresponding author: mmoya@ujaen.es

En aquest treball, com a primera etapa, s'ha estudiat, mitjançant disseny experimental i metodologia de superfície de resposta, l'extracció d'aquest residu amb aigua en autoclau. Emprant com a variables d'operació (factors) la temperatura, el temps i la càrrega de sòlids, que es modifiquen en l'interval 100-130 °C, 30-90 minuts i 5-15%, respectivament.

Els resultats han demostrat que temperatura i temps són factors amb influència positiva sobre les respostes d'extractes dissolts, sucres i fenols, mentre la càrrega de sòlids presenta influència negativa. Per a la capacitat antioxidant tots els factors presenten influència negativa, excepte el temps que és lleugerament positiva. Els models també mostren interacció entre els factors. L'optimització dels models indica que les condicions més favorables per maximitzar extractes (35,74%), sucres (16,66%) i fenols (3,99%) són: 130 °C, 90 minuts i 5%. En canvi, la màxima capacitat antioxidant ($IC_{50} = 2,39\text{g/L}$, DPPH = 230,07 mg trolox/g extracte) s'obté a 100 °C.

Paraules clau: Sucres; biorefineria; capacitat antioxidant; disseny d'experiments; extracció; fulla d'olivera.

1. INTRODUCCIÓN

Las almazaras son instalaciones donde se extrae el aceite de oliva virgen. Se trata de una de las agroindustrias más importantes de los países mediterráneos, con una abundante concentración en el sur de España. Las aceitunas que llegan a las almazaras vienen acompañadas de hojas de olivo y pequeñas ramitas y deben separarse antes del proceso de extracción del aceite. Actualmente, este residuo agroindustrial no tiene aplicación industrial, solo un uso limitado como alimento para animales o para su esparcimiento en el olivar. Se estima que más de 300.000 toneladas de hoja de almazara son generadas en España anualmente, encontrándose la mayor producción en Andalucía con un 87,8% del total¹.

Las hojas de olivo pertenecen al grupo de biomasa lignocelulósicas, constituidas por una mezcla compleja de celulosa, hemicelulosas y lignina². Además de esos biopolímeros, también presentan una importante cantidad de compuestos no estructurales (extractivos), solubles a temperaturas moderadas y presión atmosférica, entre los cuales han sido identificados compuestos bioactivos de naturaleza fenólica como oleuropeína, ligustrosido, dimetiloleuropeína, oleósido, apigenina, kaempferol, luteolina, ácido cafeico, tirosol o hidroxitirosol, entre otros^{3,4,5}. Las propiedades terapéuticas y medicinales de los extractos de hoja de olivo han sido investigadas desde hace tiempo, como por ejemplo su efecto contra la diabetes y la hipertensión⁶.

La investigación sobre valorización de biomasa lignocelulósica, en el contexto de una biorrefinería, viene siendo objeto de un creciente interés en los últimos años. Las biorrefinerías son instalaciones en las que se pueden obtener energía y productos químicos

a partir de biomasa, y se consideran como potenciales competidoras de las refinerías y plantas químicas a partir de materias primas fósiles⁷. La biomasa derivada de la poda del olivar ha sido objeto de numerosas investigaciones en este sentido⁸, especialmente para la producción de bioetanol a partir de la fermentación de los azúcares estructurales que contiene. En la etapa de pretratamiento de poda de olivo, necesaria para liberar los azúcares estructurales, se produce también la solubilización de compuestos antioxidantes, dependiendo de las condiciones de operación empleadas⁹.

El uso integral de un material lignocelulósico, dentro del concepto de biorrefinería, precisa de la separación de sus diferentes componentes. La aplicación de un proceso previo de extracción resulta de gran interés para extraer eficazmente los compuestos bioactivos presentes en la hoja de olivo¹⁰. En este contexto, han sido usadas diferentes técnicas de extracción con disolventes, tales como percolación, microondas, ultrasonidos y extracción mediante fluido supercrítico¹¹. Frente al empleo de disolventes orgánicos, los procesos hidrotérmicos aparecen como tecnologías prometedoras, desde el punto de vista económico y medioambiental, ya que son capaces de integrar la extracción de los compuestos bioactivos presentes en las hojas, y la hidrólisis de las hemicelulosas, produciendo una fracción líquida compuesta por azúcares fermentables y compuestos de naturaleza fenólica^{12,13}. La aplicación de un proceso previo de extracción acuosa en autoclave se ha demostrado de gran interés en el caso de la biorrefinería de poda del olivar, al aumentar el rendimiento de las etapas posteriores¹⁴ al permitir separar los compuestos fenólicos, con elevada toxicidad sobre los microorganismos, previamente a la etapa de fermentación.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la posibilidad de usar la hoja de almazara para su valorización en el contexto de una biorrefinería. Para ello, se estudia la extracción acuosa en autoclave, glucosa no estructural y azúcares hemicelulósicos, manitol y polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos. Se trata de una etapa de bajo consumo energético y sin empleo de disolventes orgánicos, que puede ser considerada la etapa preliminar del proceso de una biorrefinería a partir de hoja de almazara.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

La biomasa generada por limpieza de la aceituna en almazara está formada por hojas de olivo y pequeñas ramitas delgadas. En adelante se denominará a este residuo hoja de almazara (OL). El lote de OL empleado se recogió de la almazara "S.C.A. Unión Oleícola Cambil" (Jaén, España) en noviembre de 2017, se secó al aire y a temperatura ambiente, se molturó en un molino Retsch (Haan, Alemania) con criba de 1 cm y se almacenó en lugar seco.

2.2. Extracción acuosa en reactor autoclave

Para la extracción en autoclave se ha aplicado un diseño factorial completo 2^3 (2 niveles, 3 factores). Los factores seleccionados son temperatura (en el rango experimental de 100-130°C), tiempo (30-90 min) y carga de sólidos (5-15%, p/v). En la Tabla 1 se muestra el diseño experimental, según el orden aleatorio de ejecución, en factores reales y codificados.

Tabla 1. Diseño experimental para la extracción acuosa en autoclave de hoja de almazara (factores reales y codificados)

Run	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Carga de sólidos p/v (%)
1	100 (-1)	90 (+1)	5 (-1)
2	130 (+1)	90 (+1)	15 (+1)
3	100 (-1)	30 (-1)	5 (-1)
4	130 (+1)	30 (-1)	15 (+1)
5	100 (-1)	30 (-1)	15 (+1)
6	100 (-1)	90 (+1)	15 (+1)
7	130 (+1)	90 (+1)	5 (-1)
8	130 (+1)	30 (-1)	5 (-1)

Los experimentos se realizaron en un reactor autoclave (Raypad, Tarrasa, Spain), empleándose frascos ISO de vidrio de 250 mL de capacidad, con tapón de rosca para cierre hermético, y volumen de trabajo de 100 mL. El tiempo de operación se inició al alcanzarse la temperatura prefijada. Transcurrido el tiempo, los frascos ISO fueron enfriados en un baño de hielo y el contenido filtrado a vacío. Los sólidos retenidos en el filtro se lavaron con agua destilada, se secaron a 105°C y se pesaron. Por diferencia se determina el porcentaje solubilizado. Las fracciones líquidas se analizaron en azúcares, manitol, compuestos inhibidores, polifenoles y capacidad antioxidante. Los resultados experimentales, respuestas, se analizaron mediante metodología de superficie de respuesta según la Ecuación 1, con el software estadístico Design-Expert 8.0.7.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA.

$$y = a_0 + a_1 \cdot A + a_2 \cdot B + a_3 \cdot C + a_{12} \cdot AB + a_{13} \cdot AC + a_{23} \cdot BC \pm SD \quad (1)$$

Donde y es la respuesta, A temperatura, B tiempo y C carga de sólidos, en factores codificados. Respecto de los coeficientes, a_0 es el término independiente o valor de la respuesta en el punto central, a_i los coeficientes de los niveles principales del modelo y a_{ij} los coeficientes de los niveles secundarios (interacción). SD es la desviación estándar del modelo.

2.3. Métodos analíticos

2.3.1. Composición de la materia prima

El contenido en extractos, humedad, cenizas, celulosa, hemicelulosa y lignina de OL fue determinado usando los métodos analíticos del Laboratorio Na-

cional de Energías Renovables de Estados Unidos (National Renewable Energy Laboratory, NREL).

El contenido en grasa se determinó mediante una extracción en Soxhlet con hexano (6 h) de OL previamente extraída en Soxhlet con agua (24 h).

El contenido en almidón total se midió utilizando el método "Total Starch Assay Kit" (Megazyme, Ireland) sobre materia prima previamente extraída en Soxhlet con agua (24 h) y etanol (24 h).

Para la determinación de proteínas se utilizó el contenido en nitrógeno obtenido mediante un analizador elemental modelo Flash EA1112 CHNS-O de Thermo Finnigan, aplicando como factor de conversión 6,25¹⁵.

2.3.2. Caracterización de los extractos disueltos

El contenido en azúcares (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, manosa y fructosa), manitol y compuestos inhibidores (ácido acético, ácido fórmico, furfural e hidroximetilfurfural), de las fracciones líquidas, se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los azúcares se analizaron antes y después de una etapa de posthidrólisis (ácido sulfúrico 4% (p/v) a 120°C durante 30 min) para poder evaluar los que se encuentran en forma oligomérica¹⁶.

Los compuestos fenólicos se determinaron mediante el método de Folin-Cicalteau¹⁷ utilizando ácido gálico. La capacidad antioxidante se midió usando metodología DPPH¹⁸, y se expresó como la concentración requerida para inhibir el 50% de formación de radicales DPPH (IC_{50} , g/L) y como los mg Trolox eq/g extractos.

Todos los análisis mostrados en este trabajo se realizaron por triplicado, con desviaciones estándar relativas inferiores al 5%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Materia prima

La composición de la materia prima (OL), expresada en g/100 g OL, en base seca, \pm desviación estándar, se muestra en la Tabla 2.

Los componentes estructurales principales de OL son celulosa (9,6%), hemicelulosas (9,3%) y lignina (17%). La glucosa es el azúcar principal, mientras que xilosa y arabinosa destacan como azúcares hemicelulósicos, representando el 43% y el 35%, respectivamente. El contenido total de carbohidratos (<20%) es menor que el que se obtiene para la poda de olivar¹⁹, formada por ramas de olivo con madera de hasta 5 cm de diámetro²⁰.

El contenido en extractos es muy elevado (43,7%), comparado con otros materiales lignocelulósicos como paja de colza (13,1%)²¹, tallos de girasol (16%)²² y poda de olivar (26%)¹⁹. El 70% de los extractos son solubles en agua y el resto, en una segunda extracción, en etanol.

Los extractos de OL presentan un contenido en manitol del 3,5% y 7,1% de glucosa (más del 50% en forma oligomérica) (Tabla 2), similar a la determi-

nada en poda de olivo¹⁹. El manitol es un compuesto muy valorado en la industria alimentaria y farmacéutica como excipiente, debido a su alto poder edulcorante y bajo contenido calórico²³.

Tabla 2. Composición de la hoja de almazara (OL)

Composición (% materia seca)	Contenido
Celulosa (como glucosa)	10,6 ± 0,1
Hemicelulosa	9,3 ± 0,8
Xilosa	4,5 ± 0,2
Galactosa	2,1 ± 0,3
Arabinosa	3,6 ± 0,4
Manosa	0,3 ± 0,1
Lignina ácido insoluble	14,6 ± 0,5
Lignina ácido soluble	2,4 ± 0,1
Extractos	43,7 ± 1,7
Glucosa	7,1 ± 0,0
Manitol	3,5 ± 0,0
Cenizas	8,4 ± 0,4
Grupos acetilos	0,8 ± 0,0
Grasa	2,5 ± 0,4
Análisis elemental	
Nitrógeno	1,3 ± 0,0
Carbono	49,6 ± 0,4
Hidrógeno	7,0 ± 0,0
Azufre	0,1 ± 0,0
Almidón	0,5 ± 0,0
Proteína	8,1 ± 0,0

Destaca su alto contenido en proteínas (8,1%) y cenizas (8,4%). Aydinoglu y Sargin¹⁵, con hoja de olivo limpia del árbol, determinaron un contenido en proteínas similar (7,2%), pero un porcentaje en cenizas bastante inferior (2,4%). Para un residuo similar al de este trabajo, Vera y col.²⁴ reportan un contenido en cenizas entre 8 y 10%. Por otra parte, destaca el alto contenido en carbono (49,6%), valor similar al que se obtiene para poda de olivo (45,9%) y orujillo (48,3%)¹.

3.2. Extracción acuosa en autoclave

La extracción de hoja de almazara en autoclave se ha realizado según el diseño experimental mostrado en la Tabla 1. Las respuestas obtenidas para extractos disueltos, azúcares, manitol y compuestos fenólicos (g/100 g mp), IC₅₀ (g/L) y DPPH (mg Trolox eq/g extracto). Los azúcares en forma oligomérica se expresan como el porcentaje de estos que, previo a la posthidrólisis, se encuentran formando oligosacáridos. Todos los resultados de la Tabla 3 se corresponden con la media de tres repeticiones analíticas, con desviaciones relativas inferiores al 5%.

Analizadas las respuestas de la Tabla 3 mediante el software Design Expert, aplicando la Ecuación 1, se han obtenido los modelos que se muestran en la Tabla 4, junto con el coeficiente de determinación (R²) y el coeficiente de variación (CV) o error relativo del modelo.

En los modelos mostrados en la Tabla 4 se han eliminado los términos no significativos y solo se presentan aquellos que predicen resultados experimentales con una precisión superior al 95% (p-valor

Tabla 3. Respuestas obtenidas por extracción en autoclave de la hoja de almazara

Run	Extractos ¹	Glucosa ¹	Az Hem ¹	Oligómeros ²	Manitol ¹	Fenoles ¹	IC ₅₀ ³	DPPH ⁴
1	29,37	6,72	1,76	46,43	3,59	3,85	2,39	231,03
2	30,12	6,62	5,35	46,26	3,47	3,69	3,89	110,82
3	27,57	6,43	1,47	44,41	3,50	3,37	2,65	214,74
4	29,90	6,28	3,65	45,86	3,42	3,48	3,46	139,75
5	24,26	5,91	1,48	42,31	3,43	3,22	2,84	195,89
6	23,92	6,41	1,61	42,96	3,58	3,60	2,75	200,21
7	36,31	7,17	5,59	48,88	3,49	4,01	3,32	147,80
8	31,99	7,00	3,52	47,14	3,52	3,89	3,13	168,68

¹ g/100 g OL; ² %; ³ g/L; ⁴ mg Trolox eq/g extracto

Tabla 4. Modelos obtenidos

Respuestas	Modelos	R ²	C.V.
Extractos	29,18 + 2,90A + 0,75B - 2,13C - 0,78BC ± 0,75	0,985	2,58
Glucosa	6,57 + 0,2A + 0,16B - 0,26C ± 0,11	0,954	1,74
Az. Hem.	3,05 + 1,47A + 0,52B + 0,42AB ± 0,11	0,998	3,61
Oligómeros	45,53 + 1,5A + 0,6B - 1,18C ± 0,57	0,961	1,25
Manitol	3,50 - 0,03A + 0,03B - 0,03C - 0,03AB + 0,02BC ± 0,01	0,991	0,32
Polifenoles	3,64 + 0,13A + 0,15B - 0,14C - 0,07AB ± 0,08	0,967	2,09
IC ₅₀	3,05 + 0,4A + 0,03B + 0,18C + 0,12AB ± 0,11	0,978	3,63
DPPH	176,12 - 34,35A - 3,65B - 14,45C - 8,8AB ± 5,32	0,993	3,02

< 0,05). Es de destacar que todos los modelos son significativos, que no hay falta de ajuste y que los coeficientes de determinación y de variación, de reproducibilidad de los resultados experimentales y de error relativo de los modelos, son próximos a sus óptimos estadísticos.

3.2.1. Rendimiento de extracción y composición en azúcares y otros compuestos

Según el modelo para extractos de la Tabla 4, la temperatura y la carga de sólidos son los factores que más influyen en la cantidad de extractos que retira el agua de la hoja de almazara, algo más la temperatura, positivamente, ya que su coeficiente de nivel principal es superior, en valor absoluto, que la influencia negativa del otro factor. La influencia de la temperatura es positiva ya que, entre los extremos estudiados, incrementa el porcentaje de extractos en los líquidos en 5,80 puntos. En cambio, la carga de sólidos, en el intervalo estudiado, disminuye la respuesta en 4,16 puntos porcentuales. Por otra parte, el tiempo de operación ejerce una muy pequeña influencia positiva, incrementando la respuesta, en el intervalo del factor estudiado, en 1,50%. En el gráfico de Pareto de la Figura 1 se pueden apreciar las influencias relativas de los tres factores y la interacción entre dos de ellos. También, en esta figura se observa la influencia tan poco significativa que sobre la respuesta tienen el resto de términos de la Ecuación 1, todos con p-valor > 0,05, por lo que no se incluyen en el modelo de la Tabla 4.

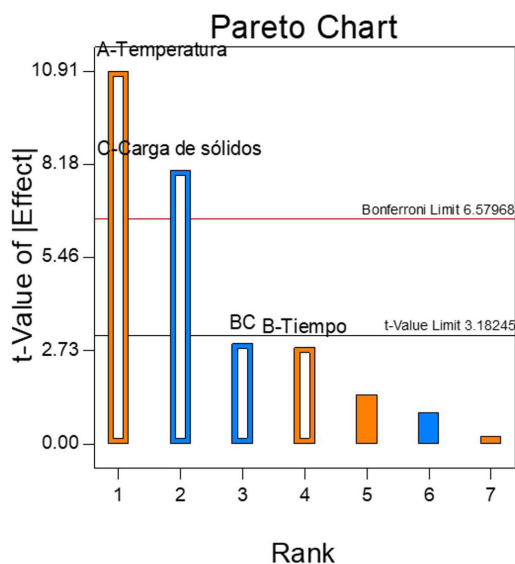


Figura 1. Gráfico de Pareto para el modelo de extractos disueltos

Si se consideran también los niveles secundarios del modelo para extractos de la Tabla 4, se observa que existe una ligera interacción negativa entre los factores tiempo y carga de sólidos, interacción que llega a ser superior a la propia influencia que ejerce el tiempo en su nivel principal, lo que también se puede apreciar en la Figura 1. Esto quiere decir que para el valor más bajo de la carga de sólidos (5% real,

-1 codificado), en el intervalo de variación del tiempo, se puede incrementar el porcentaje de extractos en los líquidos en 3,06% (de 32,68% a 35,74%, para la temperatura de 130 °C). En cambio, debido a esta interacción, cuando la carga de sólidos es del 15% (+1 codificado) el tiempo influye negativamente y disminuye la respuesta en 0,06% (de 29,98 a 29,92%), como se puede observar en la Figura 2 para la temperatura de 130 °C.

Por su parte, como también se puede observar en la Figura 2, el tiempo también modifica la acción de la carga de sólidos sobre la respuesta, aunque dada la diferencia entre coeficientes de nivel principal y secundario la variación es pequeña. Así, cuando B es -1 (real 30 minutos) en el intervalo de variación de la carga de sólidos la respuesta solo disminuye en 2,70% (de 32,68 a 29,98%, a 130 °C); en cambio, para B = +1 (real 90 minutos) la respuesta disminuye, en el intervalo del factor C, en 5,82% (de 35,74 a 29,92%).

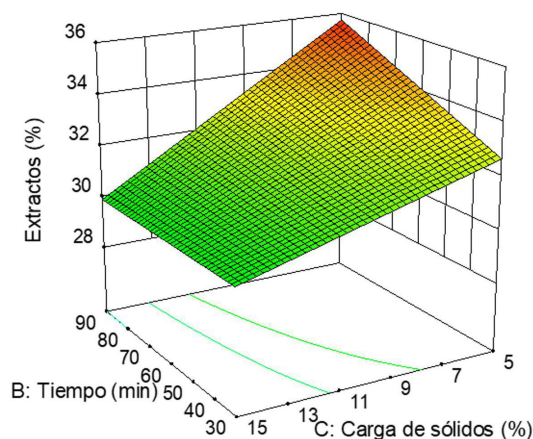


Figura 2. Extractos disueltos para la temperatura de 130 °C

Según los resultados que predice el modelo, indicar que el rango de variación de extractos disueltos por el agua oscila entre 24,12% para temperatura 100 °C, tiempo 90 minutos y carga de sólidos 15% y 35,74% para temperatura 130 °C, tiempo 90 minutos y carga de sólidos 5%. Si consideramos el contenido de extractos en hoja de la Tabla 2 se puede indicar que en esas condiciones de operación el rendimiento máximo de extracción alcanza el 81,73% del total. También indicar que el máximo de extracción en autoclave a 100 °C (29,94%), obtenido con 90 minutos de operación y 5% de carga de sólidos, se corresponde con el 97,94% de los extractos totales obtenidos por extracción de hoja de almazara con agua en soxhlet (30,57%). Lo cual indica que, en estas condiciones de operación, la totalidad de los extractos acuosos se retiran del sólido.

Respecto del contenido en azúcares, en los modelos mostrados en la Tabla 4 se observa que la mayoría de la glucosa se solubiliza por el tratamiento en autoclave, considerando el contenido de glucosa en los extractos de la Tabla 2. Según el modelo de glucosa, los factores ejercen muy baja influencia sobre la solubilización. La temperatura la incrementa hasta un máximo de 0,4% y el tiempo 0,32%, en los intervalos

de estudio; por su parte, incrementar la carga de sólidos disminuye el porcentaje de glucosa solubilizada 0,52%. De forma que el máximo de glucosa solubilizada se obtiene en las condiciones operación de 130 °C, 90 minutos y 5% de carga de sólidos (7,19%, el total de la glucosa en extractos de hoja de almazara) y el mínimo en el extremo opuesto (5,95%). Según el máximo de glucosa disuelta, se puede afirmar que no se produce solubilización de glucosa estructural, la cual queda disponible en el sólido para posteriores etapas del proceso de biorrefinería.

Para el resto de azúcares, estos proceden todos de la fracción hemicelulósica del residuo dado que en los extractos de la materia prima no hay (Tabla 2), por lo que se produce la solubilización parcial de la hemicelulosa. Según el modelo, la carga de sólidos no influye sobre la cantidad de hemicelulosa disuelta y sí de forma importante la temperatura y menos el tiempo, aunque además existe una ligera interacción positiva entre estos factores que hace que la acción positiva de solubilización de un factor se incrementa al incrementarse el otro factor. Así, para el tiempo codificado -1 (30 minutos real) la temperatura incrementa los azúcares disueltos desde 1,48 a 3,59% (2,11%), mientras que si el tiempo se fija en 90 minutos (+1 codificado) los azúcares disueltos pasan de 1,69 a 5,47% (incremento de 3,78%). El máximo de azúcares hemicelulósicos disueltos, 5,47%, representa más del 50% del contenido de estos en la materia prima inicial.

Respecto de los azúcares oligoméricos, con pequeñas variaciones, estos se encuentran en todos los casos alrededor del 45%; estos podrían tener potencial aplicación como prebióticos²⁵. En este modelo, la temperatura y el tiempo de operación incrementan el porcentaje de oligómeros mientras la carga de sólidos la disminuye. Así, el máximo de oligómeros se obtiene en las condiciones de 130 °C, 90 minutos, y carga de sólidos del 5% (el 48,82% de los azúcares disueltos se encuentran en forma oligomérica) y el mínimo en el extremo opuesto (42,24%).

Dado que el máximo de glucosa y de azúcares hemicelulósicos recuperados en los líquidos se obtienen en las mismas condiciones (130 °C, 90 minutos y 5%), podemos afirmar que con estos factores de operación se recuperará el 12,66% del total de la materia prima como azúcares (de los cuales el 48,82% lo serán en forma de oligosacáridos), lo que se corresponde con el 44,89% del total de azúcares en la materia prima (Tabla 2). Romero-García y col.⁵ consiguieron llegar a obtener una recuperación de azúcares del 75% (19,7 g azúcares/100 g biomasa) en la extracción de hoja de olivo, pero en condiciones de operación mucho más severas (explosión por vapor a 180°C y 10 min).

En este trabajo se plantea una estrategia de valorización en etapas. Así, tras la operación en autoclave, a 130 °C, 90 minutos y 5% de carga de sólidos; y por efecto de la disolución parcial del sólido, la hoja extraída queda enriquecida en azúcares estructurales y otros azúcares hemicelulósicos no disueltos (47,90% del total en materia prima), con un enriquecimiento superior al 50% sobre los azúcares presentes en la materia prima (glucosa estructural pasa de 10,6% en

materia prima a 16,5% en hoja extraída), similar a lo que indican Ruiz y col.²⁶. Este sólido podría someterse a otra etapa de pretratamiento que permita la liberación de estos azúcares por hidrólisis enzimática. Así, Ruiz y col.²⁶ extraen la hoja de olivo en condiciones muy similares (130°C, 60 min, 15%) y posteriormente someten el residuo sólido a un tratamiento con organosolvente, con el que solubilizan una fracción importante de lignina con posibilidades de valorización para la obtención de otros productos de alto valor añadido²⁷. En la posterior hidrólisis enzimática del residuo, del organosolvente, Ruiz y col.²⁶ consiguen recuperar el 64,5% de la glucosa estructural.

Respecto del contenido en manitol, el modelo de la Tabla 4 muestra como los factores de operación ejercen una muy pequeña influencia sobre el total que se obtiene en los líquidos. De forma que, puede indicarse que todo el manitol se disuelve en el agua por el tratamiento de la hoja de almazara en autoclave, independientemente de las condiciones de operación.

Respecto del contenido en compuestos inhibidores de la fermentación, este ha resultado ser nulo o despreciable en todos los casos. Lo que facilita la fermentación de los azúcares a etanol¹⁶.

3.2.2. Contenido en fenoles y capacidad antioxidante de los extractos

En la Tabla 4 se muestran los modelos obtenidos para el contenido total de compuestos fenólicos disueltos y la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la hoja de almazara. Como se puede observar, el contenido de compuestos fenólicos oscila alrededor de los 3,64 g GAE/100 g OL, obtenidos para los puntos centrales del diseño, con influencia positiva de la temperatura y el tiempo y negativa para la carga de sólidos, todos con influencias similares en sus niveles principales. Si consideramos el nivel secundario del modelo, este nos muestra una interacción pequeña y negativa entre los factores temperatura y tiempo, de forma que cuando uno de los factores es alto la influencia del otro factor disminuye y si es bajo la influencia del otro se incrementa respecto de su nivel principal. En la Figura 3 se muestra el gráfico de superficie de respuesta para el total de compuestos fenólicos extraídos de la hoja de almazara, para la carga de sólidos de 5%.

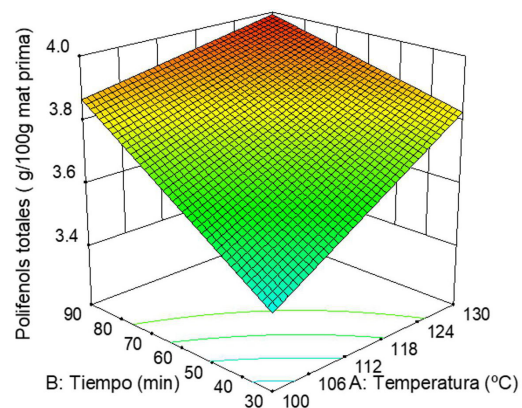


Figura 3. Compuestos fenólicos disueltos para la carga de sólidos de 5%

Los valores extremos de extracción de compuestos fenólicos que predice el modelo de la Tabla 4 oscilan entre los 3,15 g GAE/100 g OL a 100 °C, 30 minutos y carga de sólidos de 15%, como valor mínimo, y los 3,99 g GAE/100 g OL que se obtienen a 130°C, 90 minutos y carga de sólidos 5%, como valor máximo. Comparando este último resultado con el contenido de fenoles en hoja, obtenidos por extracción acuosa en soxhlet (4,40), se puede indicar que por extracción con agua en autoclave, en esas condiciones de operación, se extraen el 90,91% de los fenoles de la hoja, ligeramente superior al máximo que se obtiene a 100 °C de 87,95%. Romero-García y col.⁵ obtuvieron un contenido similar en fenoles totales (4,48 g GAE/100 g OL) en la extracción de hoja de olivo limpia de árbol, utilizando un proceso hidrotérmico más severo (explosión con vapor a 180°C y 8,3 min). Goldsmith y col.²⁸ optimizaron la extracción acuosa de compuestos fenólicos de hojas de olivo (90°C, 70 min) obteniendo 3,24 g GAE/100 g OL, valor inferior al obtenido en el presente trabajo. Guinda y col.²³, usando hoja de olivo de la misma variedad (Picual), consiguió extraer una cantidad de fenoles totales ligeramente superior (5,53 g GAE/100 g OL) en condiciones de trabajo mucho más severas (220°C, 7 min). Apostolakis y col.²⁹ consiguieron también obtener 5,19 g GAE/100 g OL usando una mezcla de agua caliente/glicerol al 9,3% (p/v) a 80°C.

La capacidad antioxidante de los extractos se ha determinado mediante el ensayo de DPPH de dos formas diferentes, por un lado se ha determinado la concentración de extractos que son capaces de inhibir la formación de radicales DPPH en un 50% (IC_{50} , g/L) y por otro la equivalencia en antioxidante Trolox por gramo de extractos disueltos (DPPH). Previo al estudio de los modelos se debe indicar la excelente correlación que existe entre ambas formas de expresar la capacidad antioxidante, con coeficiente de determinación (R^2) de 0,992.

En los modelos de la Tabla 4 se observa claramente que la temperatura es el factor que más influye sobre la respuesta, seguido de la carga de sólidos y, prácticamente, el tiempo no influye. Aunque sí presenta interacción con la temperatura, del mismo signo que los niveles principales de los factores, en cada modelo. Es significativo indicar que los factores presentan influencias contrarias para un modelo y otro, como es lógico ya que la respuesta IC_{50} representa la cantidad mínima de extractos que tiene determinada capacidad antioxidante y la otra respuesta, DPPH, indica la capacidad antioxidante por unidad de extractos disueltos. Por ello IC_{50} debe ser mínimo y DPPH debe ser máximo. En la Figura 4 se muestran las superficies de respuesta de los modelos para IC_{50} y DPPH, prefijado el tiempo en 90 minutos para a) y la carga de sólidos en 5% para b). En la Figura 4a se observa la gran influencia de la temperatura y la menor de la carga de sólidos. Ambas positivas para el valor de la respuesta, pero negativas para la capacidad antioxidante. En la Figura 4b se observa la gran influencia negativa de la temperatura, y la interacción negativa con el tiempo, de forma que este ejerce

influencia positiva a bajas temperaturas y negativa a altas temperaturas.

Según los modelos, el mínimo del primero y el máximo del segundo coinciden en los extremos inferiores de los factores temperatura y carga de sólidos y en el superior de tiempo, por efecto de la interacción con la temperatura, con valores de 2,39 g/L y 230,07 mg Trolox eq/g extracto, respectivamente. Este valor mínimo de IC_{50} es superior al obtenido para extractos acuosos en soxhlet (1,69). El máximo de capacidad antioxidante es superior al obtenido por Rafiee y col.³⁰ de 86,81 μ g/mL de extracto, en la extracción de hoja de olivo con metanol al 80% asistida por microondas.

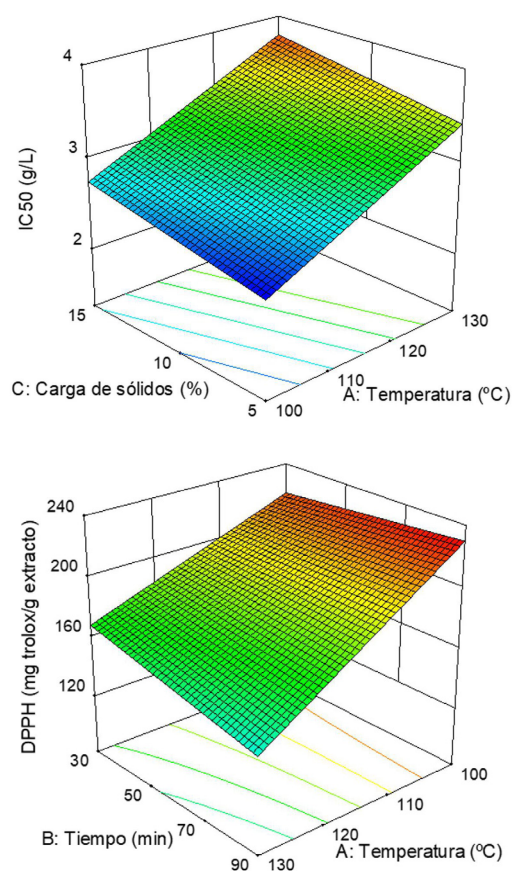


Figura 4. Capacidad antioxidante: a) B: tiempo = 90 min, b) C: Carga de sólidos = 5%

Finalmente, con los extractos disueltos y el DPPH (Tabla 3) se determina la capacidad antioxidante por 100 g de OL (CAmp). Esta nueva respuesta se ajusta, con los factores, al modelo de la Ecuación 2.

$$CAmp = 5065,77 - 495,99A + 3,95B - 801,34C - 221,47AB - 204,93BC \pm 20,90 \quad (2)$$

Ecuación, con $R^2 = 0,999$, que muestra claramente la influencia negativa de los factores temperatura y carga de sólidos y positiva para el tiempo en el intervalo inferior de los otros dos factores, debido a la interacción negativa. El máximo de capacidad antioxidante que se obtiene a 100 °C, 90 min y 5%, con una respuesta de 6793,45 mg Trolox eq/100 g OL.

Con los resultados experimentales de CAmp y los fenoles extraídos (Tabla 3) se determina la capacidad antioxidante por unidad de masa de fenoles (CAf). Ajustada esta nueva respuesta con el software Design Expert se ha obtenido la Ecuación 3.

$$CAf = 1394,52 - 186,82A - 60,62B - 166,65C - 49,81BC \pm 49,96 \quad (3)$$

Ecuación, con $R^2 = 0,987$, que, al igual que la Ecuación 2, muestra la influencia negativa de los factores temperatura y carga de sólidos, y la casi nula del tiempo para el intervalo inferior del factor C, debido a la interacción negativa. Interacción que, en el intervalo superior de B, incrementa la influencia negativa del factor C. Por tanto, el máximo de CAf se corresponde con los intervalos inferiores de los factores (100 °C, 30 min y 5%) con valor de 1758,80 mg Trolox eq/g fenoles. Si el tiempo fuese de 90 minutos la respuesta sería 1737,19, valor que entra dentro del margen de error del modelo por lo que se puede afirmar que en esas condiciones de operación el tiempo no influye sobre esta respuesta.

El hecho de que el proceso de extracción en autoclave sea capaz de extraer de un modo bastante eficiente los compuestos fenólicos y antioxidantes presentes en OL, en comparación con la metodología Soxhlet, resulta de gran interés, dado que la técnica de extracción Soxhlet presenta algunas desventajas, tales como un largo tiempo de extracción, posible degradación de los compuestos que se pretenden extraer debido al sobrecalentamiento local, elección limitada del disolvente, costos de adquisición relativamente altos y falta de versatilidad³.

Por otra parte, cabe mencionar que los compuestos fenólicos pueden resultar inhibidores para los microorganismos³¹. Por lo que, al encontrarse mezclados con los azúcares solubilizados, la estrategia de valorización de OL implicaría realizar una etapa de extracción y purificación de estos fenoles, que a su vez serviría como detoxificación de la disolución de azúcares para su transformación a etanol u otros bioproductos de interés^{32,16}.

3.3. Condiciones óptimas de extracción

Con los modelos de la Tabla 4 se puede optimizar la extracción con agua en autoclave de la hoja de almazara, de forma que permite combinar las respuestas a optimizar, según los objetivos previstos en las etapas posteriores a las que se someterán las aguas de extracción y los sólidos resultantes. Como puede deducirse de los modelos de la Tabla 4, ya comentados anteriormente, mayoritariamente las mejores condiciones de operación se corresponden con la temperatura de 130°C, 90 minutos y carga de sólidos de 5%, condiciones óptimas para extractos, glucosa, azúcares hemicelulósicos y fenoles extraídos. Pero estas condiciones no coinciden con las óptimas si el objetivo es obtener unos extractos con alta capacidad antioxidante. En este caso la temperatura debe ser mínima, manteniendo los otros dos factores. En la Tabla 5 se muestran las respuestas obtenidas, y los

factores reales, para el óptimo de capacidad antioxidante y el óptimo del resto de respuestas.

Tabla 5. Valores óptimos según el criterio elegido

	a	b
Temperatura, °C	100	130
Tiempo, min	90	90
Carga de sólidos, % p/v	5	5
Extractos, g/100 g OL	29,94	35,74
Glucosa, g/100 g OL	6,79	7,19
Az. Hem., g/100 g OL	1,69	5,47
Oligómeros, %	45,81	48,82
Manitol, g/100 g OL	3,59	3,49
Polifenoles, g/100 g OL	3,87	3,99
IC ₅₀ , g/L	2,39	3,42
DPPH, mg Trolox eq/g extracto	230,07	143,76
Camp, mg Trolox eq/100 g OL	6793,45	5358,52
CAf, mg Trolox eq/g fenoles	1737,19	1363,54

a: máximo de capacidad antioxidante

b: máximo de extractos, glucosa, azúcares hemicelulósicos y fenoles

4. CONCLUSIONES

Las hojas de almazara son un residuo lignocelulósico con elevado contenido en extractos. En este trabajo, se ha investigado mediante diseño de experimentos y en autoclave, la extracción acuosa de la hoja de almazara.

De forma general, la temperatura es el factor con mayor influencia en el conjunto de respuestas estudiadas, seguido de la carga de sólidos y del tiempo de operación. Temperatura y tiempo ejercen acción positiva, excepto para la capacidad antioxidante donde la temperatura influye negativamente. La carga de sólidos influye negativamente. El manitol disuelto prácticamente no se ve influenciado por los factores. Según muestran los modelos obtenidos, existe interacción entre algunos factores para algunas respuestas. Así, para extractos disueltos existe una importante interacción negativa entre tiempo y carga de sólidos, de forma que ésta puede invertir la acción del tiempo. Para azúcares hemicelulósicos existe interacción positiva entre tiempo y temperatura. En cambio, para polifenoles la interacción, entre temperatura y tiempo, es pequeña y negativa. Finalmente, la capacidad antioxidante está muy influenciada, negativamente, por la carga de sólidos y por la temperatura, en cambio el tiempo no es significativo excepto, debido a la interacción, en el intervalo superior de los otros factores.

Por optimización de las respuestas, a partir de los modelos, se determina que las mejores condiciones de operación, para maximizar la extracción de azúcares y fenoles son 130 °C, 90 minutos y carga de sólidos de 5%. En cambio, si se desea que la disolución tenga el máximo de capacidad antioxidante se debe disminuir la temperatura a 100 °C (IC₅₀ = 2,39 g/L).

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Ministerio de Economía y Competitividad de España (proyecto referencia ENE2017-85819-C2-1-R, incluyendo fondos FEDER).

6. BIBLIOGRAFIA

1. Manzanares, P.; Ruiz, E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J.; Gallego, F. J.; López-Linares, J. C.; Castro, E. Residual biomass potential in olive tree cultivation and olive oil industry in Spain: valorization proposal in a biorefinery context. *Span. J. Agric. Res.* **2017**, 15(3), 1-12.
2. Garcia-Maraver, A.; Salvachúa, D.; Martínez, M. J.; Diaz, L. F.; Zamorano, M. Analysis of the relation between the cellulose, hemicellulose and lignin content and the thermal behavior of residual biomass from olive trees. *Waste Manage.* **2013**, 33(11), 2245-2249.
3. Rahmanian, N.; Jafari, S. M.; Wani, T. A. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, 42, 150-172.
4. Rodrigues, F.; Pimentel, F. B.; Oliveira, M. P. P. Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, 70, 116-124.
5. Romero-García, J. M.; Lama-Muñoz, A.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Moya, M.; Ruiz, M.; Fernández-Bolaños, J.; Castro, E. Obtaining sugars and natural antioxidants from olive leaves by steam-explosion. *Food Chem.* **2016**, 210, 457-465.
6. Susalit, E.; Agus, N.; Effendi, I.; Tjandrawinata, R. R.; Nofiarny, D.; Perrinjaquet-Mocchetti, T.; Verbruggen, M. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with captopril. *Phytomedicine* **2011**, 18(4), 251-258.
7. Dias, M. O. S.; Junqueira, T. L.; Cavalett, O.; Pavanello, L. G.; Cunha, M. P.; Jesus, C. D. F. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Appl. Energy* **2013**, 109, 72-78.
8. Ruiz, E.; Romero-García, J. M.; Romero, I.; Manzanares, P.; Negro, M. J.; Castro, E. Olive-derived biomass as a source of energy and chemicals. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2017**, 11, 1077-1094.
9. Conde, E.; Cara, C.; Moure, A.; Ruiz, E.; Castro, E.; Domínguez, H. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chem.* **2009**, 114, 806-812.
10. Huang, H. W.; Hsu, C. P.; Yang, B. B.; Wang, C. Y. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, 33, 54-62.
11. Grigonis, D.; Venskutonis, P.; Sivik, B.; Sandahl, M.; Eskilsson, C. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochlœ odorata*). *J. Supercrit. Fluids* **2005**, 33, 223-233.
12. Sousa, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Barros, L.; Bento, A.; Pereira, J. A. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". *LWT-Food Sci. Technol.* **2008**, 41, 739-745.
13. Requejo, A.; Peleteiro, S.; Garrote, G.; Rodríguez, A.; Jiménez, L. Biorefinery of olive pruning using various processes. *Bioresour. Technol.* **2012**, 111, 301-307.
14. Martínez-Patiño, J. C.; Ruiz, E.; Romero, I.; Cara, C.; López-Linares, J. C.; Castro, E. Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* **2017**, 239, 326-335.
15. Aydınoglu, T.; Sargin, S. Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate. **2013**, 36, 215-222.
16. Martínez-Patiño, J. C.; Romero-García, J. M.; Ruiz, E.; Oliva, J. M.; Álvarez, C.; Romero, I.; Negro, M. J.; Castro, E. High solids loading pretreatment of olive tree pruning with dilute phosphoric acid for bioethanol production by *Escherichia coli*. *Energy Fuels* **2015**, 29, 1735-1742.
17. Singleton, V. L.; Rossi, S. A. Colorimetric of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, 16, 144-158.
18. Lama-Muñoz, A.; Romero-García, J. M.; Cara, C.; Moya, M.; Castro, E. Low energy-demanding recovery of antioxidants and sugars from olive stones as preliminary steps in the biorefinery context. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, 60, 30-38.
19. López-Linares, J. C.; Romero, I.; Moya, M.; Cara, C.; Ruiz, E.; Castro, E. Pretreatment of olive tree biomass with FeCl₃ prior enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* **2013**, 128, 180-187.
20. Cara, C.; Ruiz, E.; Oliva, J. M.; Sáez, F.; Castro, E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, 1869-1876.
21. López-Linares, J. C.; Romero, I.; Cara, C.; Ruiz, E.; Castro, E.; Moya, M. Experimental study on ethanol production from hydrothermal pretreated rapeseed straw by simultaneous saccharification and fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2014**, 89, 104-110.
22. Ruiz, E.; Cara, C.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; Castro, E. Evaluation of steam explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, 42(2), 160-166.
23. Guinda, A.; Castellano, J. M.; Santos-Lozano, J. M.; Delgado-Hervás, T.; Gutiérrez-Adán, P.; Rada, M. Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, 64, 431-438.
24. Vera, D.; Jurado, F.; Margaritis, N. K.; Grammelis, P. Experimental and economic study of a gas-

- ification plant fueled with olive industry wastes. *Energy Sustain. Dev.* **2014**, 23, 247–257.
25. Ruiz, E.; Gullón, B.; Moura, P.; Carvalheiro, F.; Eibes, G.; Cara, C.; Castro, E. Bifidobacterial growth stimulation by oligosaccharides generated from olive tree pruning biomass. *Carbohydr. Polym.* **2017**, 169, 149-156.
 26. Ruiz, E.; Romero, I.; López-Linares, J. C.; Mondaray, J.; Díaz-Villanueva, M. J.; Cara, C.; Moya, M.; Castro, E. Olive mill leaves as a raw material in a biorefinery approach. Comparison of sugar recoveries after delignification by alkaline-peroxide and organosolv pretreatment. In *25th European Biomass Conference and Exhibition*, Proceedings of the International Conference, Stockholm, Sweden, June 12-15, **2017**. ISBN 978-88-89407-17-2.
 27. González-García, S.; Gullón, B.; Rivas, S.; Feijoo, G.; Moreira, M. T. Environmental performance of biomass refining into high-added value compounds. *J. Clean Prod.* **2016**, 120, 170-180.
 28. Goldsmith, C. D.; Vuong, Q. V.; Stathopoulos, C. E.; Roach, P. D.; Scarlett, C. J. Optimization of the aqueous extraction of phenolic compounds from olive leaves. *Antioxidants* **2014**, 3(4), 700-712.
 29. Apostolakis, A.; Grigorakis, S.; Makris, D. P. Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (*Olea europaea*) using heated water/glycerol mixtures. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, 128, 89-95.
 30. Rafiee, Z.; Jafari, S. M.; Alami, M.; Khomeiri, M. Antioxidant effect of microwave-assisted extracts of olive leaves on sunflower oil. *J. Agric. Sci. Technol.* **2012**, 14, 1497-1509.
 31. Gullón, B.; Eibes, G.; Moreira, M. T.; Dávila, I.; Labidi, J.; Gullón, P. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from the refining of autohydrolysis liquors of vine shoots. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, 107, 105-113.
 32. López-Linares, J. C.; Romero, I.; Cara, C.; Castro, E.; Mussatto, S. I. Xylitol production by *Debaromyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresour. Technol.* **2018**, 247, 736-743.