



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y NUCLEAR  
MÁSTER UNIVERSITARIO EN SEGURIDAD INDUSTRIAL Y MEDIO  
AMBIENTE

**Extracción de compuestos fenólicos mediante el uso de  
disolventes orgánicos a partir del subproducto obtenido en  
la elaboración de aceite de oliva virgen (alperujo)**

TRABAJO FIN DE MASTER

Sergio Andrés Arenas Nemogá

Curso: 2018/2019

Dirigido por:

Dra. Silvia Álvarez Blanco

Dra. María Cinta Vincent Vela

Dr. Carlos Carbonell Alcaina



## AGRADECIMIENTOS

Existe una frase de Bruny Apud que me motiva a alcanzar mis metas, “*Alimenta tus sueños, proponte objetivos y metas. Trabaja y conquístalas*” y a partir de ese momento donde conquistó una meta, realizó un feedback observando los sacrificios y todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron a cumplir ese logro. Por ello me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que me han colaborado a hacer esto posible:

En primer lugar, quiero agradecer a Díos por brindarme una familia tan especial y cariñosa, a mis padres y hermano que me apoyaron en la aventura de tomar nuevos rumbos para mi crecimiento personal y profesional, los cuales son parte de mi eje central que me motivan a proponerme y forjarme nuevas metas, sin ellos no sería la persona que soy hoy. Gracias por el amor recibido, confiar y creer en mí.

Agradezco a la Universitat Politècnica de València por abrirme las puertas y brindarme el conocimiento científico que contribuyo a mi crecimiento profesional, a los docentes que día a día se desempeñaron en transmitirme de la mejor manera sus conocimientos.

Agradezco especialmente a mis tutores; Las profesoras Silvia Álvarez y María Cinta Vincent y al investigador Carlos Carbonell, por brindarme la oportunidad de trabajar en un proyecto de interés y nuevo para mí. Gracias por tenerme paciencia, guiarme y acompañarme en el desarrollo de la tesis.

A Eva Ferrer y José Luis Soler por su inmensa colaboración y ayuda en el desarrollo de la parte experimental de este trabajo. Quiero agradecer especialmente a Magdalena Cifuentes por brindarme amistad y colaboración a lo largo del desarrollo del trabajo final de master.

Quiero agradecer a mi grupo de master por su compañerismo, multiculturalidad y amistad que nos llevaron a compartir grandes experiencias en Valencia. Quiero agradecer especialmente a Liseth Vique, por brindarme todo su apoyo, su experiencia y sus conocimientos que me motivaron a crecer personalmente y profesionalmente.

Y finalmente quiero agradecer a Lizeth Rodríguez por ser mi compañera de esta aventura quien me motivo a tomar esta iniciativa y acompañó durante el desarrollo de la misma. Gracias por tu apoyo y brindarme esa amistad tan especial.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE.....	2
RESUMEN.....	5
1. JUSTIFICACIÓN.....	9
2. INTERÉS Y OBJETIVO DEL TRABAJO.....	12
3. INTRODUCCIÓN .....	13
3.1. Olivicultura .....	13
3.2. Procesos de elaboración de aceite de oliva virgen.....	14
3.3. Subproductos de la elaboración del aceite de oliva virgen .....	17
3.3.1. Alpechín .....	17
3.3.2. Alperujo.....	18
3.4. Compuestos fenólicos.....	22
3.5. Sistemas de extracción.....	26
3.5.1. Técnicas de extracción convencional .....	26
3.5.2. Técnicas de extracción modernas .....	28
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	30
4.1. Características del alpeorujo (alimento) .....	30
4.2. Equipos y montaje experimental.....	31
4.2.1. Extracción solido-liquido .....	31
4.2.2. Centrifugación de la muestra.....	32
4.3. Procedimientos analíticos .....	32
4.3.1. pH y Conductividad eléctrica (C.E.) .....	32
4.3.2. Determinación de humedad .....	34

4.3.3.	Determinación de turbidez.....	35
4.3.4.	Determinación de la demanda química de oxígeno disuelta (DQO) soluble. ....	36
4.3.5.	Determinación de color .....	38
4.3.6.	Determinación de compuestos fenólicos .....	39
4.3.7.	Determinación de azúcares por el método de Antrona.....	43
4.4.	Metodología experimental .....	45
4.4.1.	Proceso propuesto .....	45
4.4.2.	Preparación de muestras analíticas .....	48
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
5.1.	Caracterización del alperujo .....	49
5.2.	Efecto del tipo de disolvente en la extracción a 20°C .....	50
5.2.1.	Determinación de pH .....	50
5.2.2.	Determinación de conductividad eléctrica .....	52
5.2.3.	Determinación de color .....	53
5.2.4.	Determinación de DQO.....	55
5.2.5.	Determinación de azúcares.....	56
5.2.6.	Influencia del disolvente en la extracción de compuestos fenólicos (CF) .....	57
5.3.	Efecto de la temperatura en la extracción con etanol .....	60
5.3.1.	Determinación de pH .....	60
5.3.2.	Determinación de conductividad eléctrica .....	62
5.3.3.	Determinación de color .....	63
5.3.4.	Determinación de azúcares.....	64
5.3.5.	Influencia de la temperatura en la extracción de compuestos fenólicos. ....	66
5.4.	Selección de extracción y condiciones de operación.....	68
6.	CONCLUSIONES .....	69

7. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS .....	71
8. BIBLIOGRAFÍA.....	72
9. ANEXOS.....	77
ANEXO A. Efecto del tipo de disolvente en la extracción a 20°C .....	77
ANEXO B. Efecto de la temperatura en la extracción con etanol.....	79

## RESUMEN

En la producción de aceite de oliva virgen mediante el proceso de centrifugación de dos fases, se obtiene un desecho semisólido llamado “alperujo”, el cual está constituido por piel, pulpa y hueso con un alto contenido de humedad. El alperujo se puede secar y usar para obtener energía a través de combustión o para obtener fertilizantes a través del compostaje. Sin embargo, debido a su alto contenido de materia orgánica, salinidad y compuestos fenólicos puede ser perjudicial para el medio ambiente.

Por otro parte, se ha demostrado que los compuestos fenólicos presentes en el alperujo tienen excelentes propiedades antioxidantes, antiaterogénicas y antiinflamatorias, con alto valor agregado y un gran interés para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Cassano, Conidi, & Drioli, E, 2011). En la producción de aceite de oliva a partir de aceitunas, aproximadamente el 1-2% de los compuestos fenólicos están presentes en el aceite de oliva virgen, mientras que el resto de estos compuestos (98-99%) terminan en el alperujo (Rubio, Fernández, García, Lama, & Rodríguez, 2017).

Por lo anterior descrito, este trabajo fin de master tiene como objetivo la extracción de compuestos fenólicos presentes en el alperujo utilizando diferentes disolventes (agua y etanol) para recuperar estos compuestos de alto valor agregado y, al mismo tiempo, reducir el impacto ambiental del alperujo.

La capacidad del agua y el etanol para extraer los compuestos fenólicos se evaluó con una muestra de alperujo de una empresa productora de aceite de oliva de la Comunidad Valenciana, España. Ambos disolventes fueron seleccionados ya que son biocompatibles y cumplen con las regulaciones REACH. La relación de disolvente y masa del alperujo seco también se varió (4:1, 6:1, 8:1, 10:1). Los ensayos se realizaron en un tanque con agitación (400rpm) y temperatura constante (20°C, 30°C y 40°C). Se tomaron varias muestras a intervalos de tiempo de 5, 15, 30, 60 y 120 minutos para cuantificar posteriormente la concentración de compuestos fenólicos (CF) por el método Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresaron en miliequivalentes de tirosol (TY) por gramo de alperujo seco.

A partir de los resultados obtenidos, se observó en primera instancia que al emplear agua como disolvente se obtienen rendimientos considerablemente bajos al compararlos con los

obtenidos con el etanol a una temperatura de 20°C, lo cual se debe a la afinidad de los compuestos fenólicos con sustancias menos polares que el agua, como es el caso del etanol, lo que aumenta la solubilidad y extracción de estos.

Los resultados de los ensayos variando la temperatura de extracción de los compuestos fenólicos a 20°C, 30°C y 40°C, demostraron que el aumento de la temperatura facilita la extracción con etanol, obteniéndose mayores rendimientos. Por otra parte, en la experimentación se observó que la relación masa de alperujo/disolvente tiene influencia en la extracción de compuestos fenólicos, ya que se determinaron mayores rendimientos de extracción con aquellas relaciones que involucran apenas un volumen de disolvente necesario para cubrir el material de extracción (4:1 y 6:1), a pesar de los resultados obtenidos por otros autores (Soto & Rosales, 2016). Y finalmente se observó, en la mayoría de los casos, que el incremento del tiempo de contacto alperujo-disolvente facilita la extracción.

El rendimiento mayor de extracción durante la experimentación se obtuvo empleando como disolvente etanol a una temperatura del sistema de 40°C, tiempo de extracción 120 minutos y relación disolvente/masa seca 6:1, con una extracción de 22 meqTY/g alperujo seco.

## ABSTRACT

In the production of virgin olive oil by the two phases centrifugation process, a semi solid waste called “alperujo” is obtained. It can be dried and used to obtain energy through combustion or used to obtain fertilizers through composting. However, due to its high content in organic matter, salinity and phenolic compounds, it can be harmful for the environment. On the other hand, it has been demonstrated that the phenolic compounds present in alperujo have outstanding antioxidant, antiatherogenic and anti-inflammatory properties with high added value and great interest for the food, pharmaceutical and cosmetic industries. In the production of olive oil from the olives, approximately only 1-2% of the phenolic compounds are present in the virgin olive oil, while the rest of these compounds (98-99%) end in the “alperujo”.

Therefore, the aim of this master final project is the extraction of the phenolic compounds present in the “alperujo” using different solvents (water and ethanol) in order to recover these high added value compounds and, at the same time, reduce the environmental impact of the alperujo.

The capacity of water and ethanol to extract the phenolic compounds was evaluated using as feed an “alperujo” sample from an olive oil production company of Valencia Community, Spain. Both solvents were selected as they are biocompatible and fulfil the REACH regulations. The mass ratio of the solvent to dry alperujo was varied as well (4:1, 6:1, 8:1 and 10:1). The tests were performed in a tank with constant agitation and temperature, 400 rpm and 20, 30 and 40° C, respectively. Several samples were taken at time intervals of 5, 15, 30, 60 and 120 min to subsequently quantify the concentration of phenolic compounds (CF) by the Folin-Ciocalteu method. The results were expressed in tyrosol (TY) miliequivalents per gram of dry alperujo.

From the results obtained, it was observed in the first instance that when water was used as a solvent, considerably low yields were obtained when compared with those obtained with ethanol at a temperature of 20 ° C. This may be due to affinity the phenolic compounds with substances less polar than water, as it is the case of ethanol, which increases the solubility and extraction of these compounds.

The tests performed at different temperatures (20 ° C, 30 ° C and 40 ° C), showed that the increase in this parameter facilitated the extraction of phenolic compounds with ethanol, obtaining higher yields. On the other hand, it was observed that the mass of alperujo/solvent ratio had an influence on the extraction of phenolic compounds, since higher extraction yields were obtained with those ratios that involved only a volume of solvent necessary to cover the extraction material (4:1 and 6:1), in contrast to the results obtained by other authors (Soto & Rosales, 2016). Finally, it was observed in most of the cases that the increase in the time of contact “alperujo”-solvent facilitated the extraction.

The highest extraction yield during the experimentation was obtained using ethanol as solvent at a system temperature of 40 °C, an extraction time of 120 minutes and a solvent/dry mass ratio of 6:1, with an extraction of 22 meqTY / g dry “alperujo”.

## 1. JUSTIFICACIÓN

Con el transcurso del tiempo el consumo de productos alimentarios, tecnológicos y de hogar, entre otros, ha incrementado sustancialmente, generando de esta manera un crecimiento acelerado de las industrias que a su vez ha llevado al agotamiento de los recursos naturales (agua, suelo, plantas, etc.); y en consecuencia se ha producido un gran aumento en la concentración de contaminantes que terminan en el agua, suelo y/o aire. Debido a la escasez de agua dulce que se presenta día a día y a la disminución de suelos aptos para la agricultura, ha surgido la necesidad de reducir la emisión y vertido de contaminantes para lograr la recuperación y utilización de aguas superficiales, acuíferos, y suelos; y de esta manera generar una economía circular.

Con el fin de minimizar los residuos generados y las exigencias de la actualidad a contribuir a la mejora del medio ambiente, las empresas han buscado nuevas alternativas que permitan realizar un manejo integral de los residuos para ser reincorporados en el ciclo productivo en el mejor de los casos u obtener un nuevo producto a partir de este que represente un beneficio económico para la empresa, como es el caso de la industria de extracción de aceite de oliva.

Las empresas de extracción de aceite desde la década de los 90 reformaron la tecnología de extracción de tres fases por extracción continua mediante centrifugas horizontales de dos fases con el fin de minimizar los problemas ambientales por vertidos de alpechines a ríos, contaminación de suelos, aguas superficiales, etc. Sin embargo, los sistemas de dos fases dieron lugar a la generación de un nuevo subproducto sólido con mayor humedad que el orujo obtenido en el proceso de tres fases, denominado alperujo. Debido a la gran cantidad de este subproducto que se genera y a su alta fitotóxicidad por el elevado contenido de materia orgánica, salinidad y compuestos fenólicos, surgieron vías de utilización y aprovechamiento del alperujo con el fin reducir la generación de residuos y, además, obtener un beneficio económico por parte del sector.

Actualmente, la mayor parte del alperujo generado en las distintas compañías productoras de aceite de oliva, especialmente en la región de Andalucía, España, ha sido empleado en la alimentación animal, en la incorporación directa al suelo, el compostaje y la producción de

bioenergía. Entre las industrias que aprovechan este residuo, 20 plantas eléctricas emplean el alperujo como biomasa, representando el 19.3% del consumo de energía primaria procedente de fuentes renovables en Andalucía y el 3.2% del consumo total de la región (AGAPA, 2015). Por otra parte, 24 plantas realizan el compostaje de este subproducto, el cual ha sido de gran ayuda en los suelos agrícolas que presentan escasez de contenido de materia orgánica y en los suelos que han sufrido erosión por el mal manejo de los cultivos, debido a los nutrientes minerales y a la materia orgánica que contiene el alperujo.

A partir de diferentes estudios se ha demostrado que el alperujo posee un elevado contenido de compuestos fenólicos, por lo que su recuperación tiene un importante valor añadido (Giralda, 2017). Los compuestos fenólicos (CF) presentes en el alperujo especialmente el tirosol y el hidrotirosol tienen excelentes propiedades antioxidantes, antiaterogénicas y antiinflamatorias, con alto valor agregado y un gran interés para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Cassano, Conidi, & Drioli, E, 2011).

Sin embargo, los CF presentes en alperujo son los responsables de aportar fitotoxicidad a aguas y suelos durante su descarga. Se consideran sustancias fitotóxicas todas aquellas sustancias que tienen un efecto tóxico y dañino que influye sobre el desarrollo y crecimiento de las plantas. Por ende, el efecto contaminante y las propiedades beneficiosas de los compuestos fenólicos despiertan el interés por la recuperación y la comercialización de estos.

Actualmente, la utilización del alperujo se ha consolidado en el sector energético, ya que por el momento no han surgido investigaciones con éxito en la recuperación de componentes bioactivos a partir de los subproductos de la producción de aceite de oliva, por lo que este trabajo representa una interesante alternativa.

Una posible solución para la extracción y recuperación de los compuestos fenólicos del alperujo es la implementación de la extracción sólido-líquido con el fin de solubilizar los compuestos de interés en el disolvente y posteriormente implementar la tecnología de membranas para recuperar el disolvente y obtener los polifenoles con la pureza necesaria para lograr su comercialización.

En este presente Trabajo Final de Master se estudia la capacidad del agua y el etanol como disolventes para extraer los compuestos fenólicos de una muestra de alperujo

proveniente de una empresa productora de aceite de oliva de la Comunidad Valenciana, España. Para ello se realizaron diversos ensayos modificando los parámetros de tiempo, relación masa de alperujo/disolvente y temperatura de extracción.

## 2. INTERÉS Y OBJETIVO DEL TRABAJO

Con el transcurso del tiempo las exigencias del mercado han ido incrementando haciendo que día tras día se consuman alimentos más saludables por parte de las personas. El aceite de oliva virgen es uno de los productos que más acogida ha tenido durante los últimos tiempos debido a su alto contenido de compuestos polifenólicos, los cuales poseen propiedades antioxidantes, antiaterogénicas y antiinflamatorias con un alto valor agregado en la industria farmacéutica de nutrición y cosmética. Países como Italia, España, Grecia y Turquía, siendo los mayores productores del mundo, emplean aproximadamente 11 millones de toneladas de aceitunas al año para producir 1,7 millones de toneladas de aceite de oliva, los 9,3 millones de toneladas restantes corresponden a los subproductos que se generan durante el proceso, como “alpechín”, “orujo” y/o “alperujo”. Estos subproductos eran considerados como residuos hace algunos años, sin embargo, debido a diversos estudios de investigación realizados, se ha demostrado que, dado su alto contenido en materia orgánica (lípidos, proteínas, carbohidratos, polifenoles) y sales inorgánicas, entre otros compuestos, que pueden tener gran interés para el sector industrial.

De acuerdo a lo anterior mencionado, el objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Máster es aprovechar el alperujo proveniente del proceso de obtención de aceite de oliva virgen para, mediante la extracción sólido-líquido, recuperar los compuestos fenólicos presentes en este para que puedan ser utilizados con fines industriales.

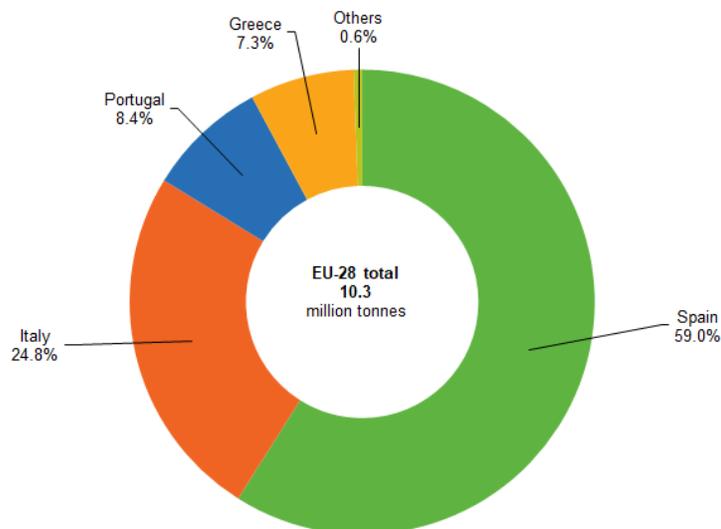
El objetivo general del trabajo final de master estará relacionado con los siguientes objetivos específicos:

- I. Caracterizar el alperujo proveniente del proceso de obtención de aceite de oliva virgen
- II. Estudiar el efecto de la temperatura, tipo de disolvente a emplear, tiempo de operación y relación alperujo-disolvente en la extracción de compuestos fenólicos y azúcares del alperujo.
- III. Analizar el comportamiento de los parámetros de pH, conductividad eléctrica y color del extracto obtenido en las diversas condiciones de operación.
- IV. Seleccionar la relación alperujo-disolvente, temperatura y tiempo de operación más adecuados para obtener la mayor extracción de compuestos fenólicos del alperujo.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Olivicultura

El olivo fue una de las primeras plantas leñosas cultivadas por la civilización mediterránea hace seis mil años aproximadamente desde la actual fecha, originario de la región sirio-iraní, difundiéndose a hacia el occidente (Iñiguez, et al, 1999). En la actualidad, la producción de aceite de oliva se centra los países mediterráneos, siendo los mayores productores España, Italia, Portugal y Grecia empleando para la fabricación de aceite de oliva cada uno de estos países un 59%, 24.8%, 8.4% y 7.3% del total de aceituna producido en la Unión Europea, respectivamente (ver figura 1). En el año 2017 se produjeron 10.3 millones de toneladas de aceitunas aproximadamente, de las cuales se genera 1,7 millones de aceite de oliva (Cassano, et al, 2011).



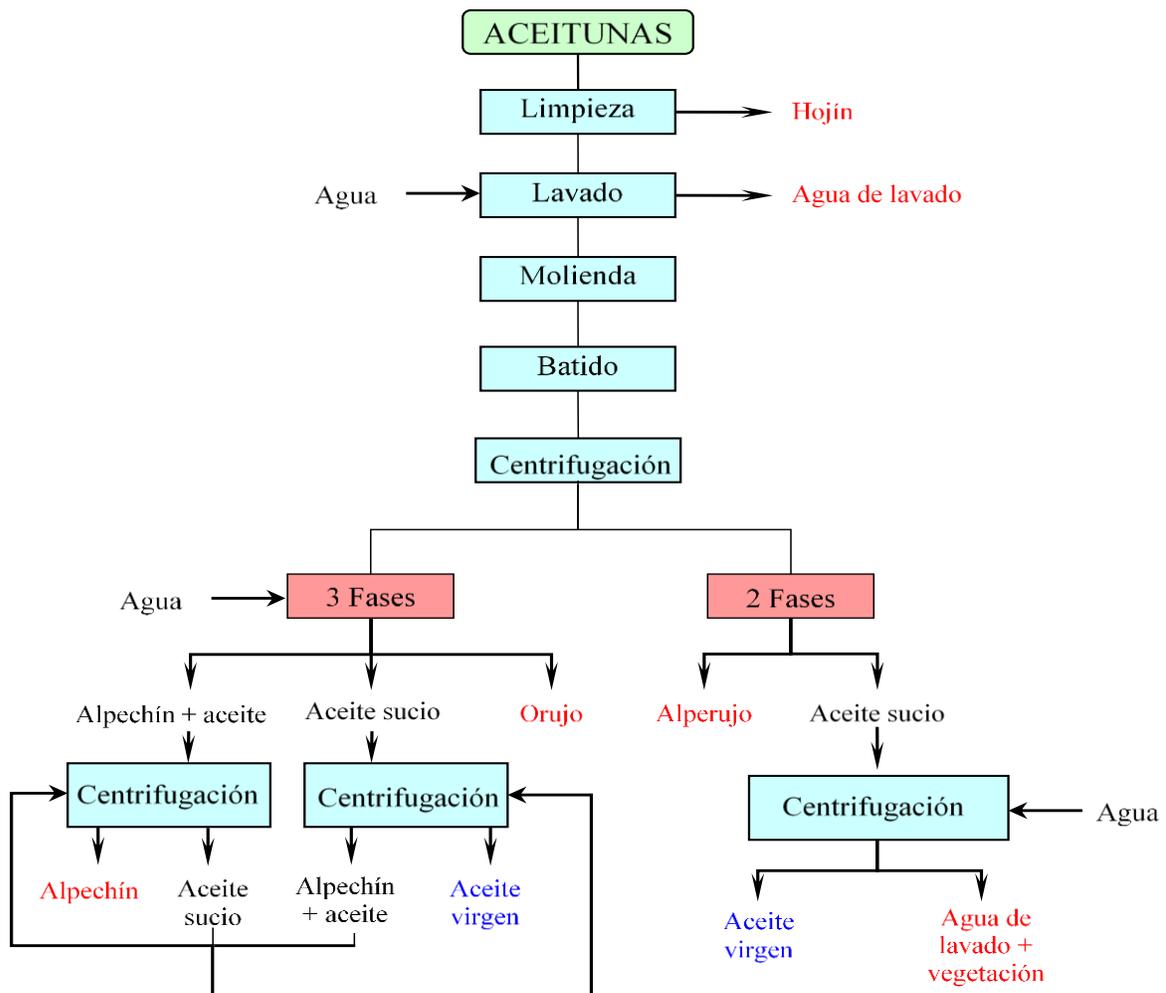
**Figura 1.** Producción de olivas para la elaboración de aceite de oliva, año 2017. Fuente. (EUROTAST, 2017)

España es el mayor productor de aceite de oliva de la Comunidad Europea, con una producción para el año 2017/2018 de 1.26 millones de toneladas de aceite de oliva, de acuerdo a la base de datos del Consejo Oleico Internacional (COI), las cuales se producen en las 13 comunidades autónomas, pero principalmente en la región de Andalucía, con una participación del 77% de todo el país (COI, 2012).

El aceite de oliva en la actualidad es parte fundamental de la dieta mediterránea debido a sus grandes beneficios para la salud humana. Entre los múltiples beneficios destaca la mejora de la salud cardiovascular y las funciones cognitivas, gracias a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados, vitaminas, antioxidantes, compuestos polifenólicos y fibra que contribuyen al buen funcionamiento del organismo (Román, et al, 2005).

### **3.2. Procesos de elaboración de aceite de oliva virgen**

El proceso de elaboración de aceite de oliva virgen, empieza con la recolección, recepción y almacenamiento de la aceituna, donde se evalúan los parámetros de calidad y selección del fruto para obtener los mayores rendimientos. Las aceitunas pasan luego por un sistema de limpieza por vibración o ventilación y una máquina despalilladora, con el fin de retirar del proceso las impurezas menos pesadas, como tallos y hojas, y posteriormente por una máquina lavadora que permite retirar barro y piedras y otros sólidos más pesados que la aceituna. Una vez limpio, el fruto se almacena en tolvas previamente a la molturación. Dicho almacenamiento no debe superar las veinticuatro horas para evitar alteraciones en la aceituna. Luego de esto se procede a la molienda de las aceitunas que tiene como objetivo la rotura de las células que contienen el aceite, generándose paralelamente una fase oleosa continua (pasta o batido) que facilita la separación del aceite en las siguientes fases del proceso. Las características y cantidad de residuos generados dependerán del sistema de extracción empleado, existiendo dos métodos: centrifugación de dos y tres fases (ver figura 2. Sistema de extracción de aceite de oliva) (Aranda, 2006) (Gòmez, 2007).



**Figura 2.** Extracción de aceite de oliva mediante los sistemas de extracción continua de tres y dos fases (Gòmez, 2007).

La tecnología para la extracción de aceite de oliva ha progresado desde los años sesenta, cuando se empezaron a remplazar los sistemas de prensado clásicos de presión por sistemas de centrifugación de tres fases (trifásico). En este sistema ingresa la pasta de la aceituna junto con agua a un decantador centrifugo horizontal donde se obtienen tres fases por diferencia de densidad: fase oleosa (aceite), fase acuosa (alpechín) y fase solida (orujo, compuesta de hueso, pulpa y piel de la aceituna). Sin embargo, durante la producción del aceite se genera gran cantidad de alpechín (1 a 1,2 L por kg de aceituna) con un alto poder contaminante y se requiere un alto consumo de agua (0.7 a 0.8 L por kg de aceituna), por lo cual a partir de los

años noventa se introdujo el sistema de extracción de aceite de oliva mediante centrifugas de dos fases, que permitió la reducción de los residuos hasta en un 75% en comparación con el sistema de centrifugación trifásico. El sistema de dos fases no emplea agua del exterior para llevar a cabo la centrifugación de la pasta, por lo que se genera mucha menos cantidad de alpechín (ver tabla 1). Por otra parte, este sistema requiere de una segunda centrifuga y no de dos centrifugas como es el caso el sistema de tres fases para llevar a cabo la purificación del aceite, permitiendo obtener una reducción considerable del consumo de energía y menor inversión en los equipos (ver figura 2).

**Tabla 1.** Composición de los efluentes de los sistemas continuos de dos y tres fases de extracción de aceite de oliva.

	ALPECHÍN DE 2 FASES	ALPECHÍN DE 3 FASES
<b>Producción (kg. por 100 kg. de aceituna)</b>	25	120
<b>Humedad (%)</b>	99	90
<b>Grasa (%)</b>	0,04	0,45
<b>Azúcares reductores (%)</b>	-	2,80
<b>Polifenoles (ppm)</b>	2.500	10.000
<b>DQO* (ppm)</b>	10.000	80.000

*Fuente:* (Hermoso, González, et al,1998)

En el sistema de dos fases se obtiene un aceite de oliva con mayor calidad, puesto que el contenido de fenoles en el aceite aumenta con respecto al de tres fases. No obstante, se genera un subproducto denominado alperujo con alto contenido de humedad (67%), ya que se obtienen conjuntamente en la centrifugación la materia seca y el alpechín. Por ende, su disposición final requiere de grandes centros de almacenamiento y tratamientos adecuados para minimizar sus efectos contaminantes al medio ambiente (Aranda, 2006).

A pesar de la gran cantidad de alperujo que se genera en la producción de aceite de oliva en España, el sistema de extracción por centrifugación en dos fases es el método más empleado en las almazaras a nivel global, por las ventajas explicadas anteriormente. De acuerdo a la base de datos de la agencia de la información y control alimentarios (AICA) de España, las 72 empresas registradas en la base de datos durante la campaña 2018/2019

emplean el sistema de dos fases obteniéndose una producción de alperujo de 5.940.750,39 ton/año (AICA, 2019).

### **3.3. Subproductos de la elaboración del aceite de oliva virgen**

Como se había mencionado en el ítem 4.1., la producción de aceite, dependiendo del sistema de extracción de centrifuga a emplear, genera diversos subproductos como son el alpechín y el orujo o alperujo, los cuales se describen a continuación.

#### **3.3.1. Alpechín**

El Alpechín es el residuo líquido acuoso que se produce en el sistema de extracción de tres fases, el cual está conformado por agua de vegetación del fruto y la añadida en el proceso, así como por restos de pulpa y aceite. La composición química del alpechín es muy variable dependiendo de: la variedad de olivo, el tipo de suelo, el sistema de cultivo, grado de madurez y tiempo de almacenamiento del fruto y sistema de extracción, siendo el contenido promedio entre 83- 94% de agua, 4-16% de materia orgánica y 0,4 - 2,5 de sales minerales (Cabrera, 2006).

La materia orgánica del alpechín está constituida por grasas, azúcares, ácidos orgánicos, sustancias nitrogenadas, mucílagos, pectinas, polialcoholes, tianos y polifenoles. En el caso de los polifenoles, se han registrado más de 50 compuestos que confieren al alpechín el efecto bactericida, el efecto fitotóxico y el color (Cabrera, 2006).

El alpechín posee un alto poder contaminante debido a su carga orgánica elevada y al alto contenido de sales disueltas (Conductividad eléctrica: 8-22 dS m<sup>-1</sup>), superando los límites permitidos por la ley de aguas para vertidos a ríos, lagos, terrenos, balsas, entre otros.

En España debido, a la elevada generación de alpechín durante el proceso de obtención de aceite de oliva en regiones como Andalucía y a la problemática medioambiental presentada, desde el año 1983 se prohibió el vertido de alpechín a los cauces públicos y se reglamentó la eliminación del efluente por medio de balsas de evaporación o por tratamientos en plantas de depuración. Sin embargo, estas técnicas tienen el problema de la generación masiva de fangos

o lodos de alpechín que deben ser nuevamente tratados por medio de compostaje u otras técnicas (López, 2000).

En la actualidad se han realizado estudios de nuevas técnicas para el tratamiento del alpechín, como técnicas de oxidación avanzada (fotocatálisis, ozonización, radiación con UV, Fenton, oxidación electroquímica u oxidación con aire húmedo) con el fin de mineralizar los componentes tóxicos del alpechín, empleándose como pre-fase de los tratamientos biológicos aerobios y anaerobios (Aranda, 2006).

### **3.3.2. Alperujo**

En este apartado se describen las características principales del alperujo, su problemática, y sus usos.

#### **3.3.2.1. Características y composición**

El alperujo es una combinación de residuos líquidos y sólidos obtenidos durante el proceso de almazara para la producción de aceite de oliva. Está constituido por piel, pulpa y hueso con un alto contenido de humedad. Dependiendo de las variables climatológicas, el tipo de suelo, la variedad del olivo y grado de maduración del fruto sus propiedades químicas pueden variar, teniendo un pH aproximado de 5.4, una alta humedad (55-70%) que disminuye drásticamente después del secado y extractado del aceite que aún puede contener el orujo con disolventes (mayoritariamente hexano) a un porcentaje de humedad de 8% (Trainalba SL & Fundación Cartif, 2008). El alperujo posee un elevado contenido en materia orgánica, por lo que es considerado como abono de plantas.

En comparación al alpechín este compuesto es rico en hierro, zinc y cobre. Además, posee gran contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa, siendo susceptible al compostaje (ver tabla 2). El contenido en nutrientes es mayor en los alperujos secos, lo cual se asocia con la concentración que se produce de estos al secarse.

**Tabla 2.** Características químicas de los alperujos

		<b>ALPERUJOS HÚMEDOS</b>	<b>ALPERUJOS SECOS (sin extraer)</b>	<b>ALPERUJOS SECOS (extraídos)</b>
<b>Humedad(%)</b>	<b>Media</b>	65,3	14,9	11,3
	<b>ES</b>	0,89	3,39	1,96
<b>pH(%)</b>	<b>Media</b>	5,62	6,06	5,88
	<b>ES</b>	0,1	0,1	0,04
<b>CE (mS cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Media</b>	6,16	8,72	10,5
	<b>ES</b>	0,35	0,76	0,4
<b>COT (%)</b>	<b>Media</b>	50,9	50,1	50,4
	<b>ES</b>	1,36	1,48	1,2
<b>N-Kjeldahl(%)</b>	<b>Media</b>	0,9	0,95	1,02
	<b>ES</b>	0,05	0,11	0,1
<b>C/N</b>	<b>Media</b>	58	56	52
	<b>ES</b>			
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (%)</b>	<b>Media</b>	0,34	0,33	0,41
	<b>ES</b>	0,02	0,04	0,04
<b>K<sub>2</sub>O (%)</b>	<b>Media</b>	1,94	2,37	2,93
	<b>ES</b>	0,13	0,19	0,18
<b>Na (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Media</b>	720	630	640
	<b>ES</b>	50	30	60
<b>Ca (%)</b>	<b>Media</b>	1,6	2,43	1,91
	<b>ES</b>	0,41	0,61	0,17
<b>Mg (%)</b>	<b>Media</b>	0,38	0,45	0,34
	<b>ES</b>	0,07	0,2	0,09

**COT:** Carbón orgánico total; **CE:** Conductividad eléctrica; **ES:** Error estándar.

Fuente: (Romero, 2001)

El alperujo es un material orgánico con una composición del 85-90% de materia orgánica. La grasa que contiene es mayor en alperujos no extractados que en el alperujo seco y extractado; los carbohidratos hidrosolubles que contiene son principalmente el manitol seguido de la fructosa y sacarosa, que constituyen una buena fuente como sustrato de microorganismos (ver tabla 3) (Aranda, 2006).

En cuanto a las sustancias húmicas, los contenidos de extracto húmico total (EHT) y ácido húmico (AH) son superiores para el caso de los alperujo sin extraer (tanto húmedos como secos).

**Tabla 3.** Caracterización de la materia orgánica de los alperujo

		<b>ALPERUJOS HÚMEDOS</b>	<b>ALPERUJOS SECOS (sin extraer)</b>	<b>ALPERUJO SECOS (extraídos)</b>
<b>MO (%)</b>	<b>Media</b>	88,6	87,2	87,7
	<b>ES</b>	2,37	2,57	1,96
<b>Lignina (%)</b>	<b>Media</b>	37,8	35,4	35,1
	<b>ES</b>	0,71	2,03	0,76
<b>Grasas (%)</b>	<b>Media</b>	2,94	5,57	0,91
	<b>ES</b>	0,43	0,86	0,16
<b>CHS (%)</b>	<b>Media</b>	93,7	47,8	56,1
	<b>ES</b>	10,8	4,18	5,08
<b>EHT (%)</b>	<b>Media</b>	15,2	14,4	12,7
	<b>ES</b>	1,24	-	-
<b>AH (%)</b>	<b>Media</b>	3,91	5,07	2,2
	<b>ES</b>	0,05	-	-

**MO**, Materia orgánica; **CHS**, carbono hidrosoluble; **EHT**, extracto húmico total; **AH**, ácido húmico, **ES**, error estándar. Fuente: (Romero, 2001).

Debido al gran contenido de materia orgánica y a su difícil manejo, su vertido incontrolado puede provocar problemas de coloración de las aguas, formación de películas que impidan el paso de los rayos de sol, deterioro del suelo y formación de olores desagradables.

Por lo anteriormente mencionado, se han realizado investigaciones para el aprovechamiento del alperujo y para, a su vez, reducir su impacto medioambiental, como es el caso del empleo del residuo en combustibles y su uso agrícola.

### **3.3.3.2. Aplicaciones**

#### **- Aprovechamiento del alperujo en la formulación de combustibles**

De acuerdo a la tabla 3, el contenido de materia orgánica que contiene el alperujo es elevada, haciendo de este un atractivo en la utilización como combustible, desprendiendo gran cantidad de energía además de dióxido de carbono y agua, permitiendo de esta manera obtener un servicio a un buen precio (Aranda, 2006).

Actualmente, el alperujo se almacena en balsas para su evaporación con el fin de reducir el contenido de humedad y así aumentar el rendimiento de la combustión y a su vez reducir los

gastos de transporte. Cabe resaltar que con el transcurso del tiempo más plantas de cogeneración de energía eléctrica han optado por emplear el alperujo como materia de trabajo, ya que, además de desprender y generar gran cantidad de energía, se disminuye la emisión y vertido de este contaminante, pudiendo proporcionar una rentabilidad económica mayor (Romero, 2001).

### **-Uso agrícola del alperujo**

El suelo, desde principios de la historia, se ha utilizado para uso agrícola, sin embargo, la utilización es cada vez más intensiva, lo cual, al igual que el uso excesivo de fertilizantes químicos, de prácticas inadecuadas de cultivo y de maquinaria pesada, ha dado lugar a la disminución de materia orgánica en el suelo (Izquierdo, 2008).

La materia orgánica y el humus contribuyen al almacenamiento de nutrientes, mejoran la estructura, ayudan a prevenir la erosión y mejoran la capacidad de retención de nutrientes en los suelos. La mayor parte de la materia orgánica en suelo se debe a la vegetación, abonos orgánicos, textura y laboreo (Izquierdo, 2008). Tradicionalmente se aplicaba materia orgánica mediante la utilización de los residuos de las cosechas, los cuales se enterraban en el suelo, pero la incineración y los vertederos rompieron esta práctica y, por otra parte, la utilización de turba y estiércol como fuente de materia orgánica disminuyó debido al incremento de los costos.

Debido a lo anterior mencionado, se han buscado nuevas alternativas que permitan aumentar el contenido de materia orgánica del suelo a un bajo coste, como es el caso del alperujo.

El alperujo, debido al alto contenido de materia orgánica y a los nutrientes que posee, es un interesante fertilizante de suelos, sin embargo, es aconsejable hacer una estabilización de este por medio de compostaje, para eliminar los compuestos polifenólicos y así evitar los efectos negativos en el suelo como la disminución de oxígeno en el ámbito radicular.

## - **Utilización del alperujo en la alimentación caprina**

El alperujo actualmente se utiliza en la formulación de piensos para animales, ya que a pesar de poder variar su composición química dependiendo del tipo de variedad de aceituna, condiciones climáticas, localidad de producción, entre otros factores, contiene un componente rico en nitrógeno (70,6%) asociado al componente lignocelulósico (FDA). El alperujo es un producto fibroso, ya que el contenido de pared celular es de 62,4% y el contenido lignocelulósico de 32,8%. Por otra parte, el alperujo contiene cierta cantidad de aceite con gran cantidad de ácidos grasos insaturados ricos en ácido oleico, palmitoleico, linoleico y linoleico, los cuales son absorbidos por los animales bovinos provocando el incremento de ácidos poliinsaturados en la carne y la leche, los cuales contribuyen a la disminución del colesterol LDL (malo). Las grasas poliinsaturadas, además, incluyen ácidos grasos omega-3 y omega-6, que ayudan en el crecimiento de las células y el funcionamiento del cerebro de los animales (Meneses & Cerda, 2016).

Debido a lo anterior mencionado, el alperujo puede ser una buena alternativa de alimentación complementaria o suplementaria para aquellos ganaderos con sistemas productivos extensivos que cuentan con terrenos que presentan escasez de forraje natural producto de las bajas precipitaciones, la alta variación de precipitaciones u otros factores externos (Meneses & Cerda, 2016).

### **3. 4. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son una clase principal de metabolitos secundarios de las plantas caracterizados por la presencia de uno (ácidos fenólicos) o varios (polifenoles) anillos aromáticos. Estos compuestos se encuentran combinados con mono y polisacáridos unidos a uno o varios anillos fenólicos, es decir, que contienen el grupo hidroxilo (-OH) unido a un ciclo de seis carbonos.

Los polifenoles se encuentran en las plantas como mecanismo antioxidante, permitiendo reducir la oxidación de lípidos en los tejidos y los animales durante su ingesta contribuyendo a la reducción de enfermedades, el retraso del envejecimiento, la reducción del riesgo del estrés

oxidativo y a la disminución de la inflamación relacionada con enfermedades crónicas (Huang, Ho, & Lee, 1992).

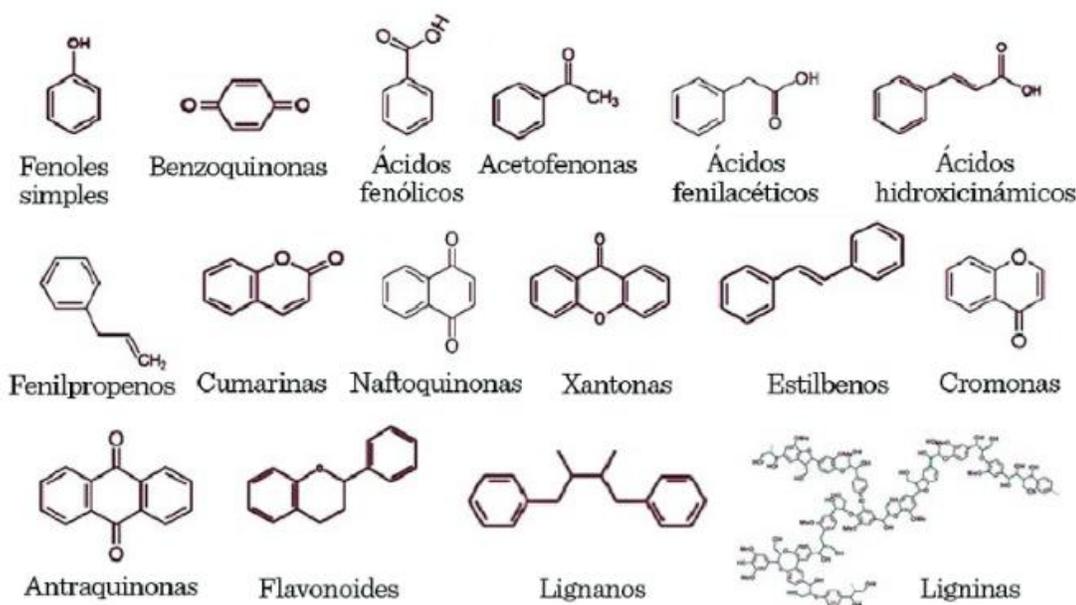
Los fenoles se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal, siendo los alimentos más ricos en dichos compuestos la cebolla, manzana, semillas de las uvas, el cacao, la oliva, las frutas rojas (arándanos, cerezas, granadas) y bebidas como el vino tinto y el té verde (ver tabla 4) (Creus, 2004).

**Tabla 4.** Propiedades organolépticas atribuidas a los compuestos fenólicos

<b>Color</b>
Como las antocianinas, responsables de los tonos rojos, azules y violáceos de muchas frutas, hortalizas y derivados: fresas, ciruelas, uvas, berenjena, col lombarda, rábano, vino tinto, etc.
<b>Sabor amargo</b>
Como las flavanonas de los cítricos (naringina del pomelo, neoherperidina de la naranja) o la oleuropeína en las aceitunas
<b>Astringencia</b>
Como las proantocianidinas (taninos condensados) y los taninos hidrolizables, por ejemplo, en el vino
<b>Aroma</b>
Fenoles simples como el eugenol en los plátanos

*Fuente:* (Creus, 2004)

Los compuestos fenólicos pueden clasificarse de muchas maneras de acuerdo a su diversidad estructural. Los principales grupos polifenólicos son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides, como se observa en la figura 3 (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).

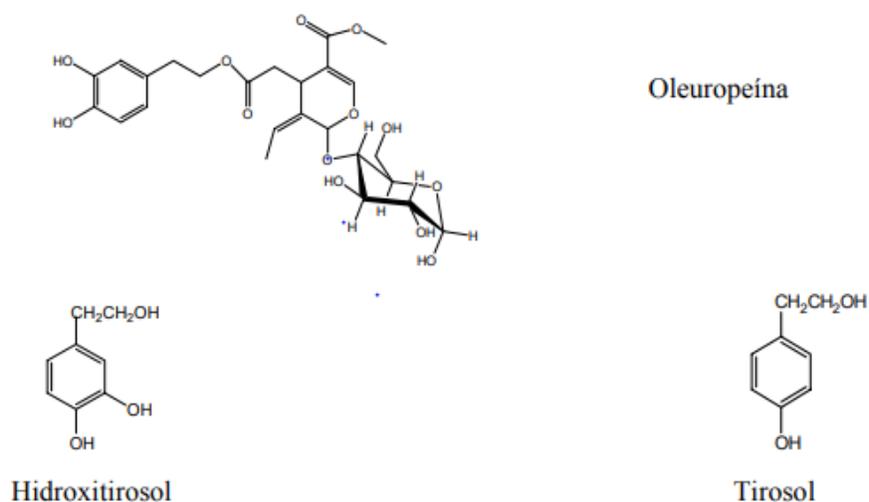


**Figura 3.** Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles.

Fuente: (Lizárraga, Hernadéz, & González, 2018)

La composición fenólica de las aceitunas varía en función de su variedad, estado de madurez y condiciones climáticas en las que se ha desarrollado cada cosecha (Romero, 2001). En la aceituna se presenta gran cantidad de compuestos fenólicos tipo secoiridoide, como la oleuropeína (formada por la unión del ácido elenólico, el hidroxitirosol y una molécula de glucosa), verbascósido y ligustrósido, grupos de compuestos fenólicos derivados del ácido cinnámico (ácido ferúlico, cafeico y p-cumárico) y del ácido benzoico (ácidos 3,4-dihidroxifenilacetico y 4-hidroxibenzoico) y otra serie de fenoles como los flavonoides presentes en una concentración relativamente alta, fenilalcoholes (tirosoles, hidroxitirosoles) y pigmentos antocianos (cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido), responsables de la coloración violácea de las aceitunas maduras (Ryan, D, et al, 2002).

La oleuropeína es el compuesto que se encuentra en mayor proporción en las aceitunas, el cual, junto a otros compuestos fenólicos, se hidroliza durante el proceso de fermentación, obteniéndose como productos el tirosol y el hidroxitirosol.



**Figura 4.** Estructura de los principales polifenoles presentes en la aceituna.  
Fuente: (Carbonell, 2017)

Estos compuestos tienen múltiples efectos biológicos por su poder antioxidante ayudando a la prevención del cáncer, trastornos dérmicos y enfermedades cardiovasculares durante la ingesta del fruto o del aceite de oliva (ver tabla 5) (Angerosa et al, 2000; Cifuentes, 2017).

**Tabla 5.** Efectos beneficiosos atribuidos a los compuestos fenólicos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares

- **Disminución de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)**
- **Disminución del proceso inflamatorio en la placa de aterosclerosis**
- **Inhibición de la agregación plaquetaria**
- **Estimulación de la síntesis de óxido nítrico**
- **Estabilización de las fibras de colágeno de la pared arterial**
- **Inhibición del daño oxidativo del ADN**
- **Activación de las enzimas de detoxificación de carcinógenos**

Fuente: (Creus, 2004)

Por tanto, el alperujo como subproducto puede usarse como fuente principal de compuestos fenólicos de alto interés para la industria alimentaria y farmacéutica, y a su vez se resolvería la problemática ambiental debido a su fitotóxicidad al disminuirse la presencia de biofenoles en el alperujo, permitiendo que el residuo resultante de la extracción se pueda emplear como fertilizante de suelos. (Aranda, 2006).

### **3.5. Sistemas de extracción**

En el presente apartado se hará una revisión de las técnicas que se utilizan en la actualidad para la extracción de compuestos fenólicos.

#### **3.5.1. Técnicas de extracción convencional**

Las técnicas de extracción convencional para compuestos fenólicos se basan en el poder de extracción de diferentes disolventes junto con calentamiento y/o mezcla de diversos disolventes. Las técnicas habituales son la extracción sólido-líquido discontinua, extracción Soxhlet (sólido-líquido continua), la hidrodestilación y la maceración.

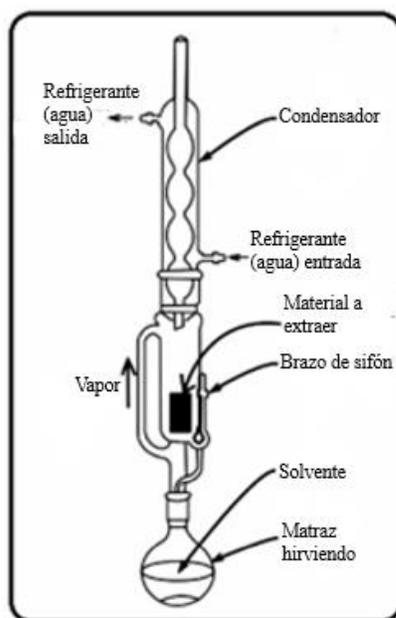
##### **- Extracción sólido-líquido**

Esta técnica se basa en la separación de compuestos de un sólido aprovechando diferencias de solubilidad de los mismos en un determinado disolvente, es decir, uno o varios de los compuestos de interés son solubles en el disolvente orgánico y pueden ser extraídos del sólido y posteriormente separados. Para realizar esta técnica generalmente se añade el disolvente a la mezcla sólida contenida en un recipiente, en frío o caliente, se agita o tritura y se separa por filtración la disolución que contiene el producto extraído y la fracción insoluble que contiene las impurezas. Posteriormente se separa el disolvente del compuesto de interés para obtener una mayor pureza y de esta manera recuperar el disolvente para futuras extracciones (Shahid, Yusuf, & Mohammad, 2016).

## - Extracción de Soxhlet

La técnica de extracción de Soxhlet fue propuesta por el químico agrícola alemán, Franz Ritter en el año 1879 para extraer grasa de la leche. Sin embargo, hoy en día ha sido ampliamente utilizada para extraer valiosos compuestos bioactivos de diversas fuentes naturales. En esta técnica se coloca una pequeña cantidad de muestra seca en el portamuestras del “Soxhlet”, mientras que el matraz donde se encuentra el disolvente se calienta para extraer los compuestos de interés. Los vapores del disolvente ascienden por la columna y se condensan en el refrigerante cayendo gota a gota sobre el cartucho hasta llenarse y alcanzar un nivel de desbordamiento que posteriormente es aspirado por el sifón y descargado nuevamente en el matraz de destilación. Esta disolución lleva los compuestos extraídos en el disolvente. Esta operación se repite hasta que se completa la extracción (ver figura 5) (Shahid, Yusuf, & Mohammad, 2016).

La técnica de Soxhlet es una metodología simple que puede tener mejores rendimientos de extracción en comparación a otras técnicas; sin embargo, tiene algunas desventajas como el tiempo prolongado para la extracción y el desperdicio de grandes cantidades de disolvente que es difícil de eliminar y puede causar problemas ambientales adicionales.



**Figura 5.** Modelo sistemático de extracción de Soxhlet

Fuente: (Shahid, Yusuf et al, 2016)

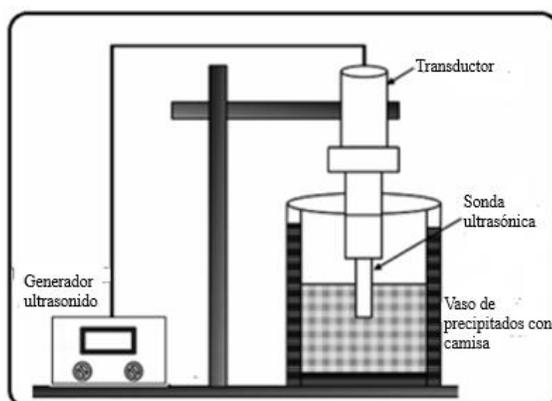
### 3.5.2. Técnicas de extracción modernas

Las limitaciones de las técnicas de extracción convencionales, como el tiempo de extracción, el requerimiento de disolvente costoso y de alta pureza, la baja selectividad de extracción, la dificultad de eliminación del disolvente y la descomposición térmica de compuestos termolábiles, condujeron al desarrollo de técnicas como la extracción asistida de ultrasonido (UAE), extracción asistida de microondas (MAE), extracción asistida de ultrasonidos-microondas (UMAE), la extracción con fluidos supercríticos(SFE), entre otras. A continuación, se detallan algunas de estas técnicas.

#### - Extracción asistida de ultrasonido (UAE):

La extracción asistida por ultrasonido (UAE) es una de las técnicas para la extracción de compuestos fenólicos a partir de plantas. Las ondas generadas son de alta frecuencia por encima de la capacidad auditiva humana ( $>20\text{kHz}$ ), que pueden pasar a través de medios sólidos, líquidos y gaseosos. Estas ondas forman cavitación en el medio líquido (disolvente), permitiendo la penetración de este a través del compuesto (en este caso el alperujo) aumentando la solubilización de los compuestos de interés (polifenoles) y finalmente su extracción con un mayor rendimiento (ver figura 6).

De acuerdo a estudios realizados por Ma, Y, et al se logró extraer un contenido total de compuestos fenólicos (TPC) del orujo de manzana con agua un 30% más alto que el obtenido por extracción convencional (Ma, Q., Liu, & Ye, 2009).

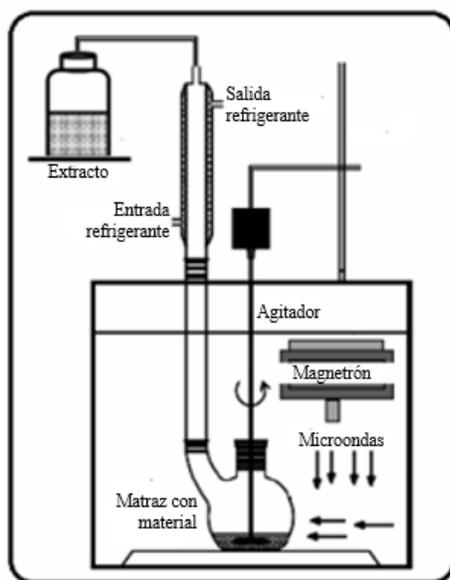


**Figura 6.** Modelo esquemático de extracción asistida por ultrasonido

Fuente: (Shahid, Yusuf et al, 2016)

### - **Extracción asistida por microondas (MAE)**

Las ondas de microondas son una forma no ionizante de energía electromagnética con frecuencias que van desde los 300MHz a 300GHz. La energía transmitida por las ondas penetra en la materia e interactúa con las moléculas polares de los disolventes para generar calor, actuando en la extracción de los compuestos de interés. Esta técnica permite extraer los compuestos fenólicos a velocidades de calentamiento rápidas, tiempos cortos de extracción y reducción del uso de disolventes orgánicos (Rubio J. , 2012).

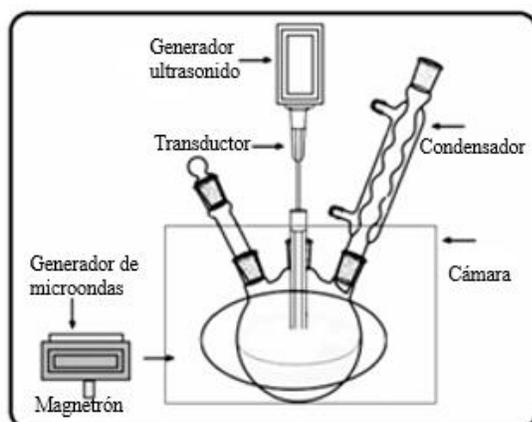


*Figura 7.* Modelo esquemático de extracción asistida por microondas

Fuente: (Shahid, Yusuf, et al, 2016)

### - **Extracción asistida Ultrasonidos- Microondas (UMAE)**

Esta técnica se basa en el acoplamiento de las dos técnicas de radiación descritas previamente permitiendo acelerar significativamente el proceso de extracción de compuestos bioactivos, y a su vez reducir el consumo de disolventes con mayores rendimientos de extracción que la extracción convencional, MAE y UAE. El esquema del sistema se presenta en la figura 8.



**Figura 8.** Modelo esquemático de la extracción asistida de ultrasonido-microondas

Fuente: (Shahid, Yusuf, & Mohammad, 2016)

## 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.1. Características del alperujo (alimento)

El alperujo utilizado procede como subproducto del proceso de extracción de aceite de oliva utilizando el sistema de dos fases y fue suministrado por una industria de producción de aceite de oliva virgen ubicada en la comunidad Valenciana. El alperujo, caracterizado principalmente por ser una mezcla compleja formada por piel, pulpa y huesos con un alto grado de humedad (69%) y con una coloración amarillo-marrón (ver figura 9), se almacena en un refrigerador a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su caracterización.



**Figura 9.** Muestra de alperujo procedente del proceso de obtención de aceite de oliva virgen

## 4.2. Equipos y montaje experimental

El desarrollo experimental se realizó en el laboratorio de medio ambiente perteneciente al departamento de Ingeniería Química y Nuclear de la Universitat Politècnica de València (España).

### 4.2.1. Extracción sólido-líquido

El objetivo del proceso de extracción sólido-líquido es retirar uno o varios compuestos de interés contenidos en un sólido inerte mediante el contacto con un disolvente que permita extraerlos, como se mencionó en el apartado 3.5. La unidad empleada para la extracción se muestra en la figura 10.



**Figura 10.** Sistema desarrollado para la extracción sólido-líquido

La unidad para la extracción sólido-líquido consta de un recipiente donde se introduce el alperujo y el disolvente, junto con una varilla de agitación y una sonda que permite medir la temperatura en el interior de este. A parte, se encuentra un equipo de baño termostático digital de circulación refrigerado que permite, junto con la bomba centrífuga, recircular agua por la carcasa del recipiente de extracción para mantener en este una temperatura estable.

#### 4.2.2. Centrifugación de la muestra

La centrifugación es un método de sedimentación acelerada mediante el cual se pueden separar sólidos de un líquido de diferente densidad por medio de la fuerza centrífuga. En esta etapa de proceso se busca separar los restos de alperujo de la mezcla líquida de disolvente y compuestos orgánicos con ayuda de una centrifuga rotatoria. Se utilizó la centrífuga con referencia Megafure 16R de la marca Thermo Scientific (ver figura 11).



*Figura 11.* Centrifuga empleada en la experimentación

#### 4.3. Procedimientos analíticos

En este apartado se detallan las metodologías establecidas para determinar los parámetros físico-químicos de la muestra original y de los extractos de alperujo.

##### 4.3.1. pH y Conductividad eléctrica (C.E.)

El parámetro del pH es de gran relevancia en la caracterización de las muestras, ya que a partir de este se brinda la estabilización de las estructuras de los compuestos de interés. A partir del pH se puede conocer el estado de degradación de la muestra de alperujo, siendo el valor promedio de este 5.

Por otra parte, el parámetro de conductividad eléctrica permite establecer indirectamente el contenido de iones en disolución ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , entre otros) que pueda

tener la muestra de estudio, reflejada en la capacidad de conducir corriente eléctrica, siendo mayor la conductividad cuando el contenido de sales se presenta en mayor proporción.

Para la medición del pH y C.E. se emplearon los equipos pH GLP 21+ y EC GLP 31+, de la marca CRISON, cuyas especificaciones se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Especificaciones pH-metro y conductímetro empleados en la experimentación

EQUIPO	ESCALAS	ERROR DE MEDIDA ( $\pm$ DIGITO)	REPRODUCIBILIDAD ( $\pm$ DIGITO)
<b>PH-METRO GLP21+</b>	-2-16 unidades pH	$\leq 0.0005$	$\pm 0.001$
<b>EC-METRO GLP31+</b>	$0.01 \mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$ - $1000 \text{ms} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\leq 0.5\%$	$\pm 0.1\%$

Los equipos empleados para la medición del pH y la conductividad eléctrica de las muestras de extracto de alperujo se presentan en la figura 12.



**Figura 12.** Equipos de medición. Izquierda pH-METRO CRISON GLP 21+. Derecha EC-METRO CRISON GLP31+1

Para la correcta medición de las muestras de estudio, se realiza previamente una calibración de los equipos con estándares comerciales. El pH-metro con disoluciones tampón comerciales de pH 4,00; 7,00 y 9,00, y el conductímetro con disoluciones tampón comerciales de  $1413 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $12,88 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  y  $111,8 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Posterior a la calibración de los equipos, se agitan las muestras de estudio en vaso de precipitados y se realiza la medición introduciendo la sonda en el vaso hasta que cubra completamente el electrodo. Se espera hasta que la lectura se estabilice y se anota la medida correspondiente de pH o C.E. Cabe resaltar que se debe limpiar la sonda con agua osmotizada entre cada lectura.

#### **4.3.2. Determinación de humedad**

En la determinación de humedad de la muestra de alperujo, se utilizó el método de cuantificación de humedad mediante secado por estufa de acuerdo a la norma española UNE-103-300-93.

En el ensayo de humedad se pesaron seis gramos (6g) de la muestra original de alperujo en un recipiente de vidrio de reloj previamente pesado en una balanza de precisión Kern PKP (Kern, Alemania). Posteriormente se introduce el recipiente junto con la muestra húmeda en la estufa a una temperatura de  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 18 horas. Inmediatamente, después de sacar la muestra de la estufa, se introduce en un desecador hasta que se enfríe para pesarla en la balanza y anotar su valor. Cabe resaltar que el tiempo de secado puede aumentar o disminuir dependiendo del tamaño de muestra. Por tanto, se debe secar hasta obtener una masa constante.

El contenido de agua en la muestra se calcula por diferencia de peso y se expresa en % de humedad ( $\text{g H}_2\text{O}/100\text{g muestra}$ ), a partir de la siguiente ecuación.

$$\% \text{Humedad} = \frac{M_{mh} - M_{ms}}{M_{mh} - M_{mr}} \quad \text{Ec. 1}$$

Dónde:

$M_{mh}$  = Masa muestra húmeda

$M_{mr}$  = Masa recipiente

$M_{ms}$  = Masa muestra seca

### 4.3.3. Determinación de turbidez

La turbidez es una medida del grado de transparencia de un líquido, debido a la presencia de partículas en suspensión. Cuantos más sólidos en suspensión haya en el líquido, más sucio parecerá estar y más alto será el parámetro de turbidez. A partir de este parámetro se puede determinar la calidad de un líquido como es el caso del agua.

La medición de este parámetro se llevó a cabo empleando el turbidímetro de la casa comercial DINKO modelo D-112, con lámpara de tungsteno y espectro ajustado a un rango de longitud de onda entre 400-600nm (ver figura 13).

Para la determinación del parámetro de turbidez de las muestras en estudio, en primera instancia se calibró el equipo con patrones primarios de turbidez conocida de 5,40 y 400 NTU, luego se hicieron enjuagues con agua y dos purgas del vial a emplear con la muestra a medir y posteriormente se procedió a la medición de la muestra, asegurándose que esta se encuentre homogenizada. La medida de la turbidez se obtiene directamente de la escala de medida del equipo y se expresa en NTU (Nephelometric Turbidity Units).



*Figura 13.* Equipo de medición turbidez DINKO D-112

#### **4.3.4. Determinación de la demanda química de oxígeno disuelta (DQO) soluble.**

Este método se basa en la oxidación de la materia orgánica por la reacción oxido-reducción con dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) en exceso en un medio ácido suministrado por el ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y un catalizador como el sulfato de plata ( $Ag_2SO_4$ ) durante un periodo al menos de dos horas. Como resultado, se oxida la materia orgánica y el dicromato que no se consume durante la reacción es valorado por titulación o colorimetría (Ramírez & García, 2008). Conocer la concentración de DQO del alperujo es de real importancia para la reducción o eliminación adecuada de la materia orgánica de este y de esta manera prevenir la biodegradación de las muestras y a su vez reducir la alta toxicidad que puede generar al verterse en cuerpos de agua.

El análisis de la DQO se realizó empleando kits comerciales COD de la marca Merk, mediante las recomendaciones suministradas por el fabricante, por lo que el volumen podía variar dependiendo del rango del kit a utilizar. En este caso se usaron kits con rango de 500-10000 mg DQO·L<sup>-1</sup>. Por consiguiente, solo se necesitaba 1mL para llevar a cabo la prueba (ver figura 14).

Primero se diluye el extracto de alperujo obtenido de acuerdo al apartado 4.4.2 en relación 1:4 con agua, debido al alto contenido de materia orgánica que tiene la muestra. Posteriormente se agita la muestra hasta que se encuentre homogenizada; luego se agrega el volumen necesario sobre el kit (previamente homogenizado), se cierra y se agita durante unos minutos; luego se lleva al termorreactor durante 2 horas a 148°C. Transcurrido el tiempo se retiran las muestras del equipo y se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos; luego se procede a agitar las muestras y se dejan por 30 minutos más antes de realizar las correspondientes lecturas en el fotómetro multiparamétrico modelo Spectroquant nova 30 de la casa comercial Merck (Ver figura 15).



*Figura 14.* Kit spectroquant DQO rango de medición 500-10000 mg DQO·L<sup>-1</sup>



*Figura 15.* Spectroquant NOVA 30 - Merck

#### 4.3.5. Determinación de color

El color es de gran relevancia en la determinación de presencia de materia orgánica en los extractos obtenidos.

Para la determinación del color, se realizó una dilución 1:40 del extracto de alperujo con agua, ya que la muestra era fuertemente coloreada y de acuerdo a la norma UNE-EN ISO 7887:2011 (Calidad del agua. Examen y determinación del color), las muestras pueden diluirse con agua ópticamente pura las veces necesarias antes de su examen o determinación hasta que la intensidad se encuentre dentro del rango de calibrado. Posteriormente se tomó 1,5 mL de este en una celda de poliestireno óptico (PS) con un paso de luz de 10mm para posteriormente realizar las medidas respectivas de absorbancia a las longitudes de onda ( $\lambda$ ) de 436 nm, 525 nm y 620 nm en el espectrofotómetro UV-VIS DR 6000 de la marca HACH LANGE (ver figura 16) de acuerdo al método de color real usando como referencia la norma UNE-EN ISO 7887: 2012 método B (Martínez & Osorio, 2018).



**Figura 16.** Espectrofotómetro UV-Vis DR600 (HACH LANGE)

A partir de la absorbancia obtenida a las tres longitudes de onda establecidas se determina el parámetro de color ponderado con la siguiente ecuación:

$$Color = \frac{(A_{436\lambda})^2 + (A_{525\lambda})^2 + (A_{620\lambda})^2}{A_{436\lambda} + A_{525\lambda} + A_{620\lambda}}$$

*Ec. 2*

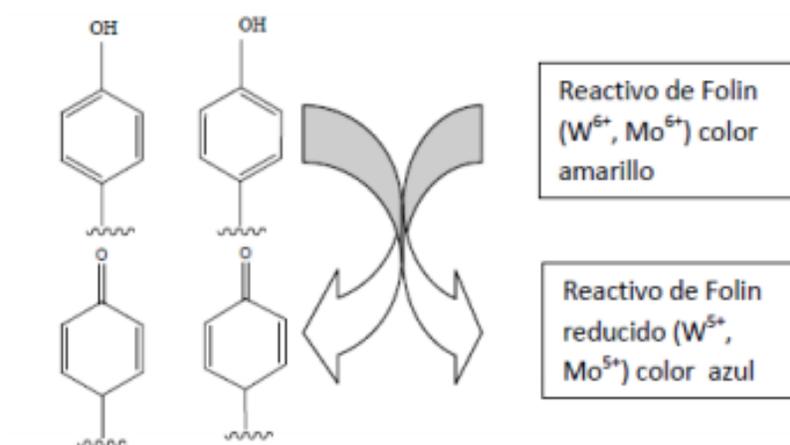
**Fuente:** (Nat, 2004)

Donde  $A_{436\lambda}$  es la absorbancia a 436 nm,  $A_{525\lambda}$  es la absorbancia a 525nm y  $A_{620\lambda}$  es la absorbancia a 620nm.

#### 4.3.6. Determinación de compuestos fenólicos

La determinación de la concentración de compuestos fenólicos es de gran importancia en el desarrollo del trabajo, ya que a partir de esta se puede estudiar el rendimiento de extracción por parte del disolvente del compuesto de interés (fenoles).

Para la cuantificación de polifenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu. Esta técnica se basa en la reducción en medio alcalino de la mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico de color amarillo que componen el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) con los compuestos fenólicos presentes en la muestra, existiendo una transferencia de electrones para formar un complejo de color azul intenso de óxidos de wolframio y molibdeno (ver figura 17) que permiten ser detectables en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-VIS) a una longitud de onda entre los 620 y 765 nm, siendo la longitud de onda de máxima absorción de 765 nm (Singleton & Rossi, 1965).

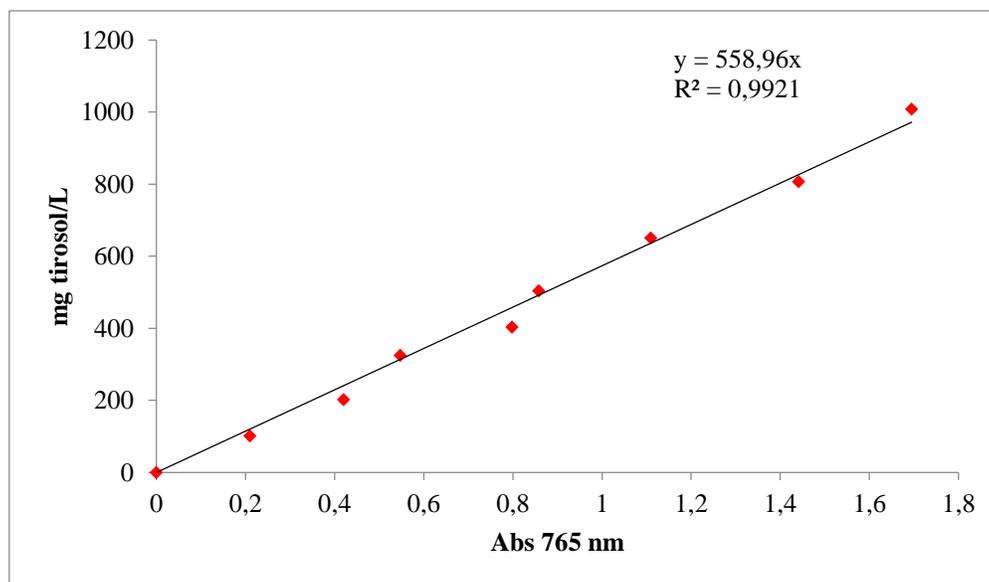


**Figura 17.** Mecanismo de reacción del reactivo de Folin Ciocalteu. Obtenida de: (García., et al, 2008)

En la determinación de compuestos fenólicos se empleó el siguiente procedimiento: en un vaso de precipitados se diluye en proporción 1:8 el extracto en agua y se toma de la dilución 0,2 mL de muestra en un vial de vidrio de 10mL y se añade 6,8 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo de Folin- Ciocalteu, asegurándose de preparar entre cada lectura un blanco con agua destilada.

Posteriormente, la muestra se lleva a agitación por ultrasonido durante tres minutos con una frecuencia de 250 mHz, y luego se añade 1 mL de carbonato de calcio al 20% (p/p) para finalmente dejar en reposo durante una hora en un sitio oscuro. Transcurrido el tiempo de reacción y estabilización del color se realiza la medición de absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS DR 6000- Hach Lange (ver figura 18) de la muestra en estudio a una longitud de onda de 765 nm.

A partir de la lectura de absorbancia de la muestra se determina la concentración de compuestos fenólicos, por medio de una curva de calibrado previamente construida con patrones de tirosol establecidos en un rango de 0 a 1200 mgL<sup>-1</sup> que relacionan la absorbancia con la concentración (ver figura 18).



**Figura 18.** Recta de calibrado para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos en las muestras. Obtenida a 765nm en el espectrofotómetro DR600-Hach Lange

La recta de calibrado que relaciona la concentración de tirosol de los estándares establecidos y la absorbancia se presenta a concentración

$$[C.F.](\text{mg. L}^{-1} \text{ Tyrosol eq}) = 573.56 \cdot Abs \quad \text{Ec 3}$$

Los resultados de las concentraciones de las muestras se expresan en miligramos de tirosol equivalente por litro (mg. L<sup>-1</sup> tirosol eq.). Cabe resaltar que las muestras que registren un valor de concentración mayor al establecido en la curva de calibrado (1200 mg. L<sup>-1</sup> Tirosol eq.) deben diluirse las veces que sea necesario para que se encuentren en el intervalo de concentración que se ha empelado para construir la recta de calibrado.

El contenido de polifenoles totales extraídos se expresa como miligramos (mg) de tirosol equivalente por gramo (g) de alperujo seco.

Para el cálculo del rendimiento de compuestos fenólicos (mg tirosol eq/g alperujo), se determina en primera instancia la cantidad de compuestos fenólicos (C.F.) en la fase acuosa de la muestra original empleando la siguiente ecuación.

$$C.F.M.O = \frac{m_{alperujo} \cdot \% Humedad}{\rho_{H_2O}} \cdot [C.F.]_{OR} \quad \text{Ec 4}$$

Dónde:

$C.F.M.O$  : Masa de compuestos fenólicos en el alperujo original (mg Tirosol eq)

$m_{alperujo}$  : Masa de alperujo (g Alperujo)

$\% Humedad$  : Humedad presente en el alperujo

$\rho_{H_2O}$  : Densidad del agua a la temperatura de extracción (g/L)

$[C.F.]_{OR}$  : Concentración de C.F. en la muestra original (mg. L<sup>-1</sup> tirosol eq)

Posteriormente se calcula el contenido de compuestos fenólicos en el extracto obtenido a un tiempo de extracción, relación alperujo-disolvente y temperatura determinada, utilizando la siguiente ecuación.

$$C.F.Ex = \left( V_{disolvente} + \frac{m_{alperujo} \cdot \% Humedad}{\rho_{H_2O}} \right) \cdot [C.F.]_{EX} \quad \text{Ec 5}$$

Dónde:

$C.F._{EX}$  : Cantidad de compuestos fenólicos en el extracto (mg tirosol eq)

$m_{alperujo}$  : Masa de alperujo (g Alperujo)

% *Humedad* : Humedad presente en el alperujo

$\rho_{H_2O}$  : Densidad del agua a la temperatura de extracción (g/L)

$V_{disolvente}$  : Volumen de disolvente empleando (L)

$[C.F.]_{EX}$  : Concentración de C.F. en el extracto (mg. L<sup>-1</sup> Tirosol eq)

Luego se determina la diferencia entre la cantidad de compuestos fenólicos extraídos con respecto a los que contenía la fase acuosa de la muestra original y finalmente se determina el rendimiento de extracción obtenido (ver ecuaciones 7 y 8).

$$\Delta C.F. = C.F._{EX} - C.F._{OR} \quad \text{Ec 6}$$

$$R \text{ extracción} = \frac{\Delta C.F.}{m_{alperujo} \cdot (1 - \%Humedad)} \quad \text{Ec 7}$$

Dónde:

$R \text{ extracción}$  : Rendimiento de extracción (mg tirosol eq/ g alperujo seco)

$\Delta C.F.$  : Diferencia de C.F. entre el extracto y la muestra original (mg tirosol eq)

% *Humedad* : Humedad presente en el alperujo

$m_{alperujo}$  : Masa de alperujo (g Alperujo)

#### 4.3.7. Determinación de azúcares por el método de Antrona

El contenido de azúcares solubles totales en los extractos de alperujo se determinó de acuerdo al método de Antrona planteado por Whitman, et al (1971), que se basa en la cuantificación de azúcares (hexosas, aldopentosas y ácidos heuxerínicos que se encuentran libres o formando un polisacárido). Este método se basa en la deshidratación e hidrolización de los azúcares en medio ácido caliente que reaccionan con Antrona para formar un derivado del furano de color verde azulado con un máximo de absorción a una longitud de onda de 625nm (Aranda, 2006).

El ensayo se realizó en tubos de cristal con tapa roscada añadiendo 1 mL de la muestra en estudio y 2 mL de reactivo de Antrona por las paredes del tubo cuidadosamente. A continuación, se cerraron y agitaron durante 15 segundos en un vortex, se colocaron en un baño de agua a 100°C y posteriormente se enfriaron en un recipiente con hielo durante 5 minutos. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia por triplicado a 625nm, considerando el blanco del reactivo en el espectrofotómetro UV-VIS DR 6000- Hach Lange.

La determinación de la concentración de azúcares solubles totales se evaluó mediante la curva de calibrado previamente construida con concentraciones de glucosa de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 mg·L<sup>-1</sup>, los cuales siguieron el mismo tratamiento al de las muestras, de lo cual se obtuvo la siguiente ecuación al relacionar la absorbancia con la concentración.

$$[\text{Azúcares}](\text{mg D-glucosa} \cdot \text{L}^{-1}) = 0.1123 + 74.043 \cdot \text{Abs} \quad \text{Ec 8}$$

Cabe resaltar que las muestras que registren un valor de concentración mayor al establecido en la curva de calibrado (200 mg·L<sup>-1</sup> D-glucosa) deben diluirse las veces que sea necesario para que la concentración se encuentre dentro del intervalo considerado para construir la recta.

El contenido de azúcares se expresa como miligramos (mg) de azúcares por gramo (g) de alperujo seco.

Para el cálculo del rendimiento de azúcares extraídos en mg azúcar/g alperujo, se determina en primera instancia la cantidad de azúcares en la fase acuosa de la muestra original empleando la siguiente ecuación:

$$Azúcares_{M.O} = \frac{m_{alperujo} \cdot \% Humedad}{\rho_{H_2O}} \cdot [Azúcares]_{OR} \quad Ec 9$$

Dónde:

$Azúcares_{M.O}$  : Masa de azúcar en el alperujo original (mg D-glucosa)

$m_{alperujo}$  : Masa de alperujo (g alperujo)

$\% Humedad$  : Humedad presente en el alperujo

$\rho_{H_2O}$  : Densidad del agua a la temperatura de extracción (g/L)

$[Azúcares]_{OR}$  : Concentración de azúcares en la muestra original (mg. L<sup>-1</sup> D-glucosa)

Posteriormente se calcula el contenido de azúcares en el extracto obtenido a un tiempo de extracción, relación alperujo-disolvente y temperatura determinado, utilizando la siguiente ecuación.

$$Azúcares_{EX} = \left( V_{disolvente} + \frac{m_{alperujo} \cdot \% Humedad}{\rho_{H_2O}} \right) \cdot [Azúcares]_{EX} \quad Ec 10$$

Dónde:

$Azúcares_{EX}$  : Masa de azúcar en el extracto (mg D-glucosa)

$m_{alperujo}$  : Masa de alperujo (g alperujo)

$\% Humedad$  : Humedad presente en el alperujo

$\rho_{H_2O}$  : Densidad del agua a la temperatura de extracción (g/L)

$V_{disolvente}$  : Volumen del disolvente empleando (L)

$[Azúcares]_{EX}$  : Concentración de azúcares en el extracto (mg. L<sup>-1</sup> D-glucosa)

Luego se determina la diferencia entre la cantidad de azúcar extraído con respecto a la que contenía la fase acuosa de la muestra original y finalmente se determina el rendimiento de extracción obtenido (ver ecuaciones 12 y 13).

$$\Delta \text{Azúcares} = \text{Azúcares}_{EX} - \text{Azúcares}_{OR} \quad \text{Ec 11}$$

$$R \text{ extracción} = \frac{\Delta \text{Azúcares}}{m_{\text{alperujo}} \cdot (1 - \% \text{Humedad})} \quad \text{Ec 12}$$

Dónde:

*R extracción* : Rendimiento de extracción (mg D- glucosa / g alperujo seco)

$\Delta \text{Azúcares}$  : Diferencia de azúcares entre el extracto y la muestra original (mg D- glucosa)

*% Humedad* : Humedad presente en el alperujo

$m_{\text{alperujo}}$  : Masa de alperujo empleada para la relación (g Alperujo)

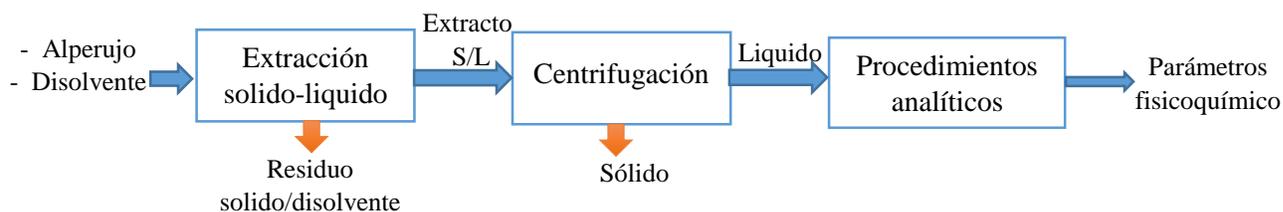
#### 4.4. Metodología experimental

El desarrollo experimental comprende las etapas de extracción, centrifugación y preparación de las muestras de alperujo para la posterior caracterización físico-química de las mismas.

##### 4.4.1. Proceso propuesto

Para la extracción de los compuestos fenólicos se realizó una revisión bibliográfica para determinar el proceso de extracción física y el disolvente adecuado para realizar el desarrollo del proyecto, empleándose una extracción solido-líquido (S/L) que se basa en la separación de uno o varios constituyentes solubles contenidos en un sólido inerte mediante el uso de un disolvente a fin con el analito a separar.

Posterior a la extracción S/L de los compuestos fenólicos se realiza una centrifugación de las muestras recolectadas para obtener dos fases: sólido y líquido, y de esta manera realizar los análisis físico-químicos respectivos al extracto (ver figura 19).



**Figura 19.** Diagrama del proceso propuesto

#### 4.4.1.1. Extracción solido-liquido

La extracción de los compuestos fenólicos derivados del alperujo se llevó a cabo bajo diferentes condiciones en un sistema con agitación constante, modificando los siguientes parámetros: temperatura (20°C, 30°C y 40°C), disolvente (agua y etanol) y tiempo de extracción (5, 15, 30, 60 y 120) min, empleando diferentes relaciones de alperujo seco y disolvente (1:4, 1:6, 1:8 y 1:10). La cantidad de muestra y el volumen de disolvente a utilizar se detallan en la tabla 7.

**Tabla 7.** Relación cantidad de muestra y volumen de disolvente a emplear para el desarrollo de extracción

<i>Muestra(g)</i> <i>(Disolvente(ml))</i>	<i>Relación</i>			
	<i>1:4</i>	<i>1:6</i>	<i>1:8</i>	<i>1:10</i>
Alperujo (Agua)	2026,32g (473,31mL)	1350,97g (1149,62mL)	1013,3g (1488,56mL)	810,37g (1689,62mL)
Alperujo (Etanol)	2026,04g (600mL)	1350,62g (1456,75mL)	873,94g (1626,05mL)	549,08g (1450,93mL)

La muestra de alperujo se pesó de acuerdo a la tabla 7, en un recipiente de plástico con una capacidad de 3L con ayuda de una balanza de precisión KERN PKP (Kern, Alemania). Posteriormente el envase con la muestra se colocó en un baño termostático para alcanzar la temperatura de realización del ensayo. Luego de alcanzar la temperatura deseada, el recipiente se introdujo en el sistema de extracción desarrollado junto con la varilla de agitación y una

sonda de temperatura conectada al controlador del baño termostático digital de circulación refrigerado, como se observa en la figura 10.

Una vez fijada la relación de ensayo y estabilizada la temperatura de experimentación se pone en marcha el sistema, añadiendo el disolvente extractor, asegurándose una agitación constante de 400 rpm para obtener una mezcla homogénea entre la muestra y el disolvente. Posterior a la adición del agua o etanol, considerando este como tiempo cero, se procede a tomar 80 mL de mezcla en dos tubos cónicos para centrifuga Falcón con capacidad de 50 mL, a los 5, 15, 30, 60 y 120 minutos de extracción, para su posterior centrifugación.

Cabe resaltar, que el baño termostático digital de circulación refrigerado y la bomba centrifuga auxiliares empleadas en el sistema permiten controlar y mantener uniforme la temperatura del baño de agua, respectivamente.

#### **4.4.1.2. Centrifugación de la muestra**

En primera instancia se pesó muestra del extracto en tubos falcón de 50 mL en igual cantidad de masa con el fin de no generar descompensación y daños en el momento de realizar la centrifugación en la máquina. Posteriormente, se colocaron los tubos Falcón con las muestras en los receptáculos del rotor de la centrifuga, se cerró el compartimiento del mismo y se puso en marcha el equipo con las siguientes especificaciones:

- Velocidad de centrifugación: 10000 rpm
- Tiempo de centrifugación: 10 minutos
- Temperatura de centrifugación: 25°C

Finalmente, después de terminado el tiempo de centrifugación, se retiraron las muestras del equipo y se separaron las dos fases obteniéndose un extracto con partículas y sólidos en suspensión y, por otra parte, una fase solida de alperujo rico en disolvente (ver figura 20).



*Figura 20.* Extractos antes y después de la centrifugación

#### **4.4.2. Preparación de muestras analíticas**

En la preparación de las muestras se emplearon filtros de jeringa de ésteres mixtos de celulosa (MCE), con un poro de  $0,45\ \mu\text{m}$  y un diámetro de  $0,25\ \text{mm}$ , que permitieron filtrar los extractos obtenidos de la centrifugación con ayuda de una jeringa de  $10\ \text{mL}$  y de esta manera eliminar cualquier partícula de tamaño superior a los  $0,45\ \mu\text{m}$  que pueda interferir en los análisis a realizar.

Cabe resaltar que se filtró la muestra requerida para cada análisis y la muestra sobrante se marcó debidamente en los tubos falcón y se congeló para conservarla y emplearla para posibles repeticiones o futuras investigaciones.

Los parámetros medidos a las muestras de extractos obtenidos fueron pH, conductividad eléctrica (C.E.), color, azúcares totales y compuestos fenólicos del alperujo mediante el método de Folin-Ciocalteu con un número de repeticiones realizadas para cada muestra por cada parámetro igual a 3.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Caracterización del alperujo

La caracterización del alperujo utilizado en los ensayos de extracción de compuestos fenólicos se presenta en la tabla 8.

**Tabla 8.** Caracterización del alperujo utilizado en los ensayos de extracción de compuestos fenólicos

<i>Parámetro</i>	<i>Valor promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>
pH	5,08	0,04
C.E (mS·cm <sup>-1</sup> )	15,50	0,23
Color	12,41	1,69
Turbidez (NTU)	32,97	0,64
Humedad (%)	69,0	0,1
Azúcares (mg D-Glucosa·L <sup>-1</sup> )	4396,67	48,79
DQO (mg O <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup> )	64008,33	2750,03
Compuestos fenólicos (mg·L <sup>-1</sup> tirosol eq)	4313,68	399,26

\*Todos los parámetros fueron medidos por triplicado.

A partir de la tabla 8 se observan las características físico-químicas del alperujo obtenido en la industria de aceite de oliva ubicada en la Comunidad Valenciana que ha suministrado la materia prima para este trabajo. Destaca una elevada DQO, humedad, C.E. y cantidad de compuestos fenólicos. Además, se puede observar un carácter ligeramente ácido de la muestra, debido a las propiedades del fruto y la presencia de ácido láctico formado durante la fermentación de las aceitunas.

El alto porcentaje de humedad se adjudica al agua añadida en el lavado de los frutos que se incorpora en el alperujo en el momento de la centrifugación por dos fases, así como también se debe al agua de vegetación de la propia aceituna.

La conductividad eléctrica del alperujo, en torno  $15.55 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ , se debe prácticamente a la presencia de iones de  $\text{Na}^{2+}$  mayoritariamente, seguido de iones de calcio, fósforo, potasio y magnesio, los cuales proceden de la propia aceituna. Por otra parte, la alta DQO observada, se debe al alto contenido de materia orgánica que tiene este compuesto (88,6% de los sólidos totales, de los cuales el 50% son ligninas y el 2.5% grasas, como se describe en el apartado 3.3.2). Además, el alperujo contiene toda la carga orgánica del alpechín que se generaba en el sistema de tres fases, en cuya composición destacan los polifenoles.

Los compuestos polifenólicos determinados por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), descrito en el apartado 4.3, se estiman en concentración de  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de tirosol eq. Diversos autores han señalado al tirosol e hidrotirosol como compuestos fenólicos principales del alperujo, con propiedades farmacológicas y con actividad elevada antioxidante. Por otra parte, algunos compuestos fenólicos como la oleuropeína y el ácido elenólico se hidrolizan durante el proceso de maduración de la aceituna dando lugar al tirosol o hidrotirosol, ya que son moléculas más estables, mientras que otros se degradan, por lo que es concerniente afirmar que tanto el tirosol como el hidrotirosol son los compuestos fenólicos mayoritarios en la muestra.

## **5.2. Efecto del tipo de disolvente en la extracción a 20°C**

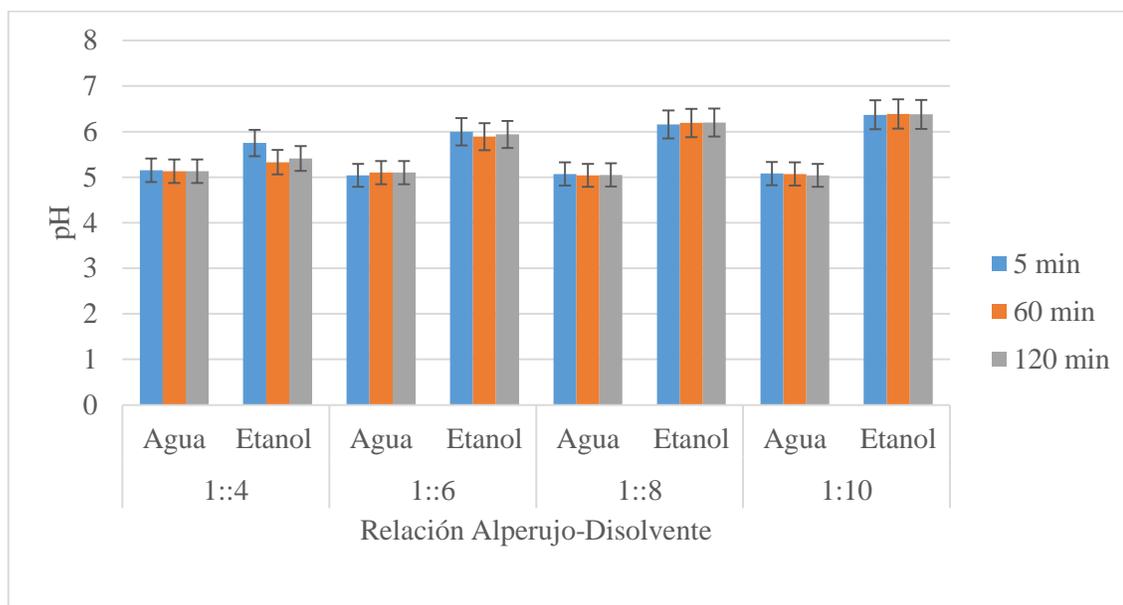
En este apartado se presentan los resultados obtenidos de la variación del pH, conductividad eléctrica (C.E.), factor de color y el rendimiento de extracción de azúcares y compuestos polifenólicos del alperujo a una temperatura de  $20^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$  al modificar el disolvente extractor. Los disolventes de extracción empleados durante los ensayos fueron agua y etanol al 96%.

### **5.2.1. Determinación de pH**

En la figura 21, se observa el comportamiento del parámetro de pH de los diversos extractos obtenidos de la extracción sólido-líquido en los ensayos realizados a los diferentes

tiempos de contacto de extracción (5 min, 60 min, 120 min), diferentes relaciones de masa alperujo y disolvente a emplear (1:4, 1:6, 1:8, 1:10) y a una temperatura constante de 20°C.

Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo A



**Figura 21.** Variación del pH del extracto obtenido con diferentes disolventes y relaciones alperujo-disolvente a una temperatura de 20°C

A partir de la figura 21 se observa que el parámetro de pH del extracto a lo largo de los ensayos realizados empleando como disolvente extractor agua en diferentes proporciones masa alperujo-disolvente a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y para diferentes tiempos de contacto, presentó una variación mínima de un ensayo a otro, con un valor de pH promedio de 5.10. Por otra parte, los ensayos realizados con etanol al 96% a  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en las diferentes proporciones de disolvente-masa alperujo previamente mencionadas y los mismos tiempos de contacto, se notó un aumento del parámetro conforme se incrementaba el volumen de disolvente empleado. Este comportamiento se presentó debido a que el etanol posee un carácter neutro al encontrarse en una concentración del 96%, haciendo que el valor del pH del extracto tomara un valor más cercano a 7 conforme aumentaba el volumen de etanol y disminuía la masa de alperujo utilizada.

Cabe resaltar que el tiempo de contacto de extracción no presentó cambios significativos del parámetro pH utilizando etanol.

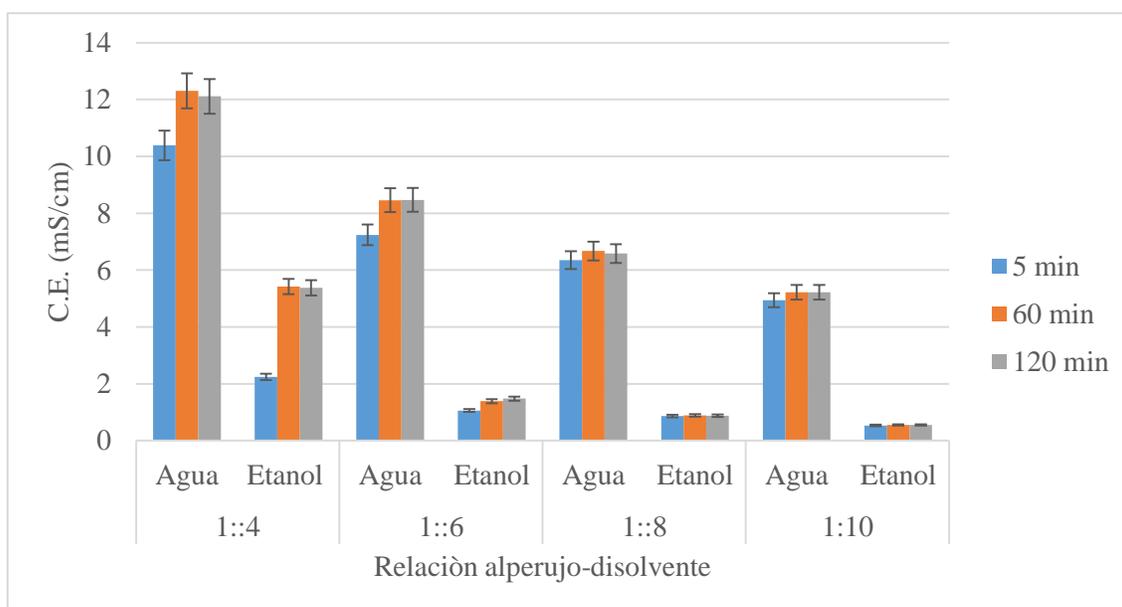
A partir de investigaciones realizadas por otros autores (Siebert, K et al, 1996) (Trillo, 2015 ), el pH es un factor a considerar en la extracción de compuestos fenólicos, ya que el carácter ácido facilita la ruptura de las interacciones proteína-polifenoles por la formación de sales antoncyanidinas y a su vez facilita la estabilidad de algunos compuestos fenólicos como es el caso del tirosol. Al encontrarse estos compuestos en condiciones de pH alcalino tienden a degradarse por completo con el transcurso del tiempo.

De acuerdo a lo anterior mencionado, se sugiere para próximas investigaciones realizar ensayos de extracción modificando el pH a una región ácida o bien empleando disolventes de carácter ácido para optimizar el proceso de extracción.

### 5.2.2. Determinación de conductividad eléctrica

En la figura 22 se observa el comportamiento del parámetro de conductividad eléctrica de los diferentes extractos obtenidos en los ensayos realizados con diversos tiempos de contacto de extracción (5 min, 60 min y 120 min), relaciones de masa alperujo-disolvente a emplear (1:4, 1:6, 1:8, 1:10), disolvente a emplear (agua, etanol 96%) a una temperatura constante de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo A.



**Figura 22.** Variación de la conductividad eléctrica del extracto obtenido con diferentes disolventes y relaciones alperujo-disolvente a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ .

De acuerdo a la figura 22, se observa que el parámetro de conductividad eléctrica en el extracto disminuye conforme aumenta la relación masa de alperujo-disolvente sin importar el disolvente extractante a emplear, ya que la concentración de sales en el seno de la mezcla disminuye a medida que se incrementa la relación, ya que las sales y compuestos orgánicos suministrados por el alperujo se diluyen en mayor proporción al emplear mayor volumen de disolvente, teniendo a su vez menor capacidad de conducción de electricidad la mezcla. Cabe resaltar que la conductividad disminuye notoriamente al emplear etanol al 96% debido a su alta pureza y ausencia de iones y sales que permitan conducir electricidad, mientras que en el agua destilada utilizada se pueden presentar iones que aumenten la conductividad eléctrica.

Por otra parte, se observa que la conductividad aumenta y tiende a tomar un valor constante luego de un tiempo de contacto de extracción de 60 minutos, ya que después de este tiempo se alcanza el potencial de equilibrio haciendo que no exista un flujo desde el seno del alperujo al disolvente.

### **5.2.3. Determinación de color**

En la figura 23 se observa la variación del parámetro de factor de color de los diversos extractos obtenidos en los ensayos realizados con diferentes tiempos de contacto de extracción (5 min, 60 min y 120 min), relaciones de masa alperujo-disolvente (1:4, 1:6, 1:8, 1:10) con los dos disolventes empleados (agua y etanol 96%) a una temperatura constante de  $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo A.

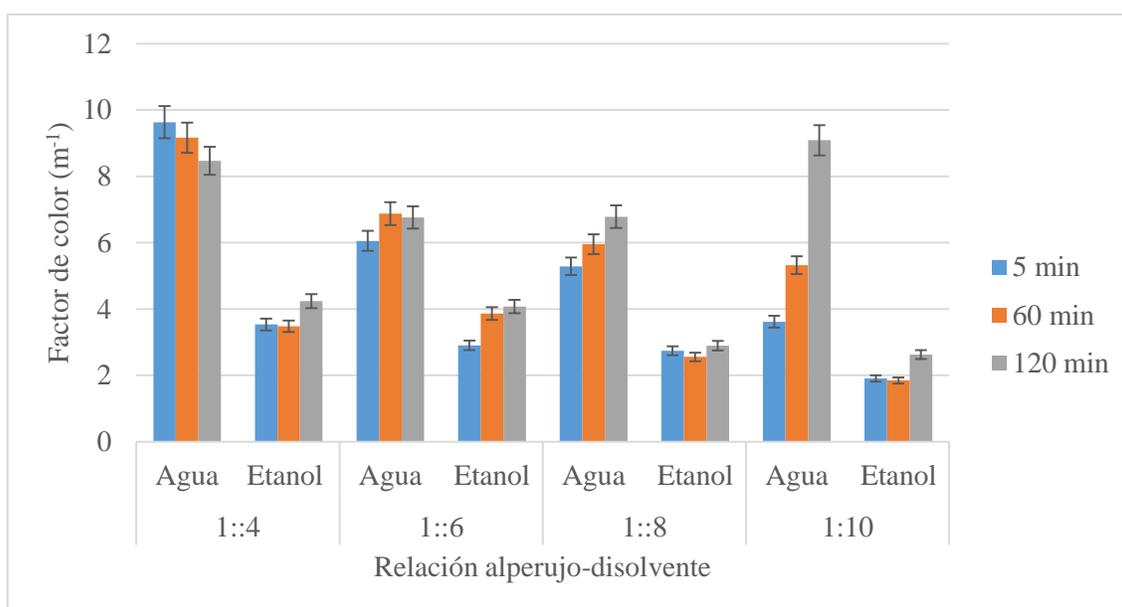
De igual manera que la tendencia que ocurre con el parámetro de conductividad eléctrica sucede con el parámetro de factor de color, en el cuál, conforme se adiciona mayor volumen de disolvente y se disminuye la cantidad de masa de alperujo a utilizar durante la extracción solido-liquido disminuye el parámetro en estudio, ya que el disolvente diluye los compuestos que dan el color al extracto. Por ende, entre mayor sea el volumen de disolvente a emplear menor será la concentración de estos compuestos y por consecuencia el factor de color.

Por otra parte, se aprecia en la figura 23, que al emplear como disolvente extractor etanol al 96%, se reduce considerablemente el factor de color en comparación con el agua en la misma relación. Esto puede ser debido a que el agua extrae en mayor proporción pigmentos colorantes que el etanol.

Por otra parte, se nota que al aumentar el tiempo de contacto de extracción el parámetro de factor de color incrementa, siendo más acentuado al adicionar mayor volumen de disolvente (en especial agua) y disminuir la cantidad de alperujo de experimentación, probablemente porque el aumento del disolvente favorece la extracción de compuestos colorantes.

Cabe resaltar que el dato obtenido a una relación 1:4, utilizando como disolvente de extracción agua puede considerarse atípico, ya que no sigue la tendencia de los datos, lo cual pudo presentarse por errores experimentales.

Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo A

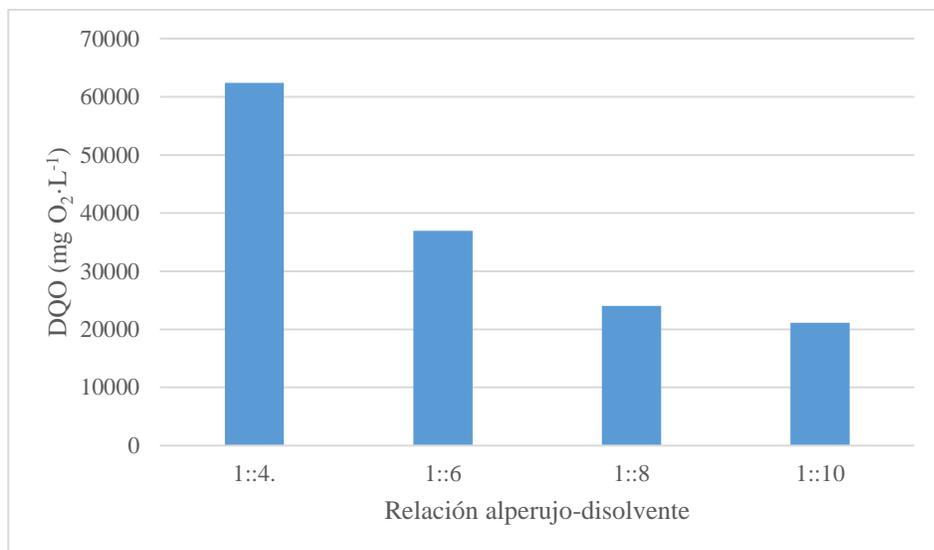


**Figura 23.** Variación del factor de color en la extracción con diferentes disolventes y relaciones alperujo-disolvente a una temperatura de 20°C

Otro motivo que afecta al cambio de color que se observa en la figura 23 es que a medida que transcurre el tiempo de contacto entre el alperujo y el disolvente con una agitación se contribuye a la oxidación y degradación de los compuestos fenólicos, favoreciendo la aparición de quinonas que dan un color pardo indeseable a la mezcla lo que hace que la absorbancia a la longitud de onda establecida sea mayor, viéndose reflejado en el factor de color (Creus, 2004).

#### 5.2.4. Determinación de DQO

El comportamiento DQO en los extractos obtenidos en los ensayos realizados a una temperatura de 20°C, tiempo de contacto de extracción de 240 minutos, relaciones de masa alperujo-disolvente (1:4, 1:6, 1:8, 1:10) utilizando como disolvente agua, se muestran en la figura 24.



**Figura 24.** Variación de la DQO en la extracción con agua para diferentes relaciones alperujo-disolvente a una temperatura de 20°C y un tiempo de extracción de 240 minutos

De igual manera la tendencia observada para el parámetro de conductividad eléctrica se repite con el parámetro de DQO, en el cuál, conforme se adiciona mayor volumen de disolvente y se disminuye la cantidad de masa de alperujo a utilizar durante la extracción solido-liquido disminuye el parámetro en estudio, ya que el disolvente diluye la materia orgánica presente en la muestra. Por ende, entre mayor sea el volumen de disolvente a emplear menor será la concentración de materia orgánica y por consecuencia la DQO.

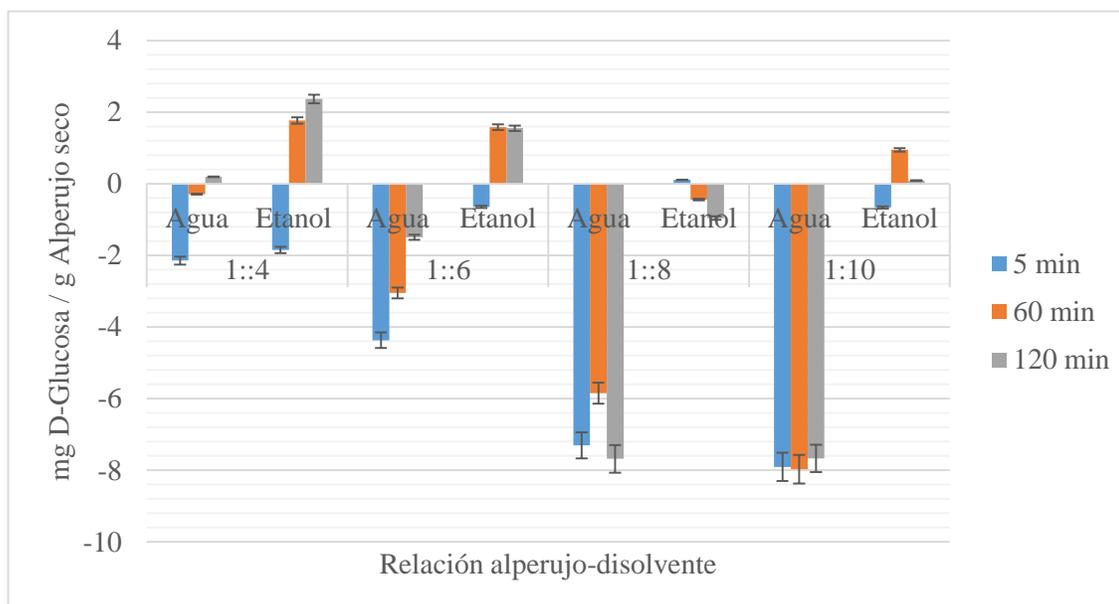
Por otra parte, el estudio de la DQO, al emplearse como disolvente de extracción etanol no se llevó a cabo, ya que el etanol al ser un compuesto orgánico, impide cuantificar el valor real de la DQO del extracto debido a la gran cantidad de materia orgánica presente en la muestra a la hora de la determinación.

### 5.2.5. Determinación de azúcares

En la figura 25 se observa el rendimiento de extracción de azúcares totales en base seca calculado de acuerdo a la ecuación 13.

Los ensayos se realizaron a diferentes tiempos de contacto de extracción (5 min, 60 min y 120 min), relaciones de masa alperujo-disolvente a emplear (1:4, 1:6, 1:8, 1:10) y diferente tipo de disolvente extractor (agua y etanol al 96%), manteniéndose la temperatura constante a 20°C.

Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo A



**Figura 25.** Rendimiento de extracción de azúcares del alperujo con diferentes disolventes y relaciones alperujo-disolvente) a una temperatura de 20°C

Como se aprecia en la figura 25, el rendimiento de extracción de los azúcares totales del alperujo es bajo, siendo aún menor al aumentarse la relación de masa de alperujo/disolvente. Inclusive, en el caso de utilizarse como disolvente agua, se obtienen rendimientos negativos desde el momento de su adición evidenciándose con mayor claridad al incrementar el volumen de agua a emplear y disminuir la masa de alperujo a emplear durante la etapa de extracción, alcanzándose valores negativos de hasta -8mg D-glucosa/g Alperujo. Esto se debe a que el

agua utilizada diluyó los pocos azúcares que se lograron extraer del alperujo. Por este motivo en el momento de la lectura con el espectrofotómetro UV-VIS no fueron detectados.

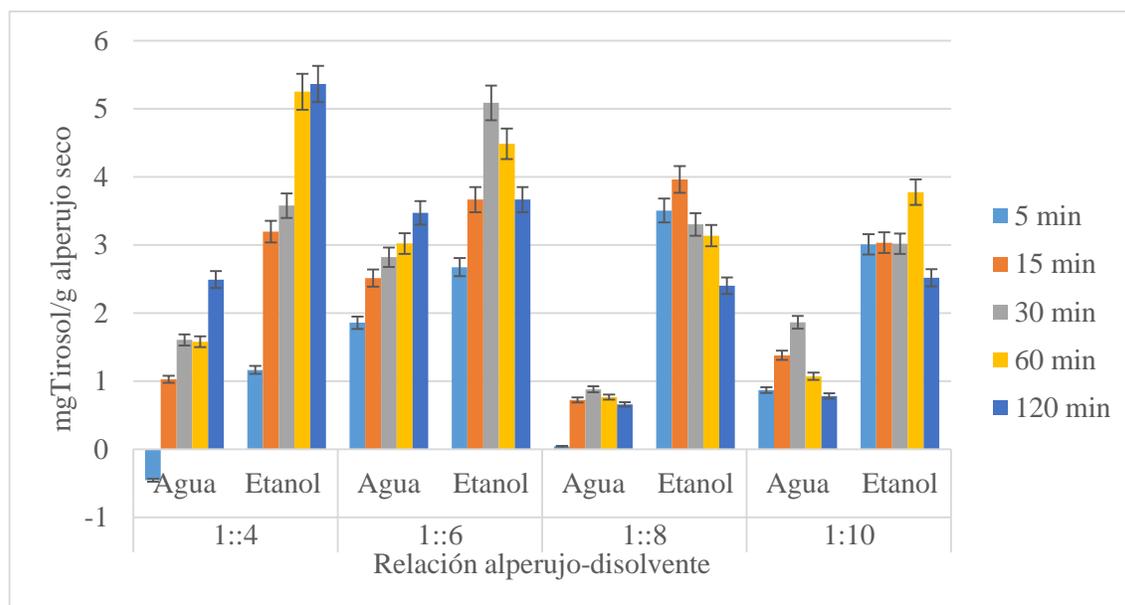
Por otra parte, al emplear como disolvente de extracción etanol, se observa que, a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , se logra recuperar azúcares como hexosas, aldopentosas y ácidos heuxerínicos que se encuentran libres o formando un polisacárido. Se obtiene un mayor rendimiento al emplear una relación 1:4 masa alperujo-disolvente con un tiempo de contacto de 120 minutos, alcanzándose valores de azúcares extraídos de 2.37 mg por gramo de alperujo seco. Para valores de relación masa alperujo-disolvente superiores a este empieza a disminuir el rendimiento, ya que el volumen de disolvente es muy alto en comparación a la cantidad de masa de alperujo a emplear en el ensayo y, de acuerdo algunos estudios, al aumentar el volumen de disolvente en relación a la masa de muestra utilizada no siempre se obtienen mejores resultados, ya que el rendimiento depende la naturaleza del compuesto extraíble, grado de polimerización y relación con la polaridad del solvente utilizado en la extracción (Soto & Rosales, 2016). Además, como se ha comentado con anterioridad, al aumentar la cantidad de disolvente añadida se diluye mucho la muestra, haciendo que los azúcares no sean detectados en la lectura en el espectrofotómetro.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el rendimiento de extracción de azúcares a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  es bajo al emplear los dos disolventes de extracción en estudio, presentando un rendimiento de extracción un poco superior al utilizar etanol.

#### **5.2.6. Influencia del disolvente en la extracción de compuestos fenólicos (CF)**

Los rendimientos de extracción de los compuestos fenólicos en los diferentes ensayos realizados, empleando como disolvente agua y etanol al 96% se presentan en la figura 26. Los ensayos fueron realizados variando la relación de muestra y disolvente a emplear (1:4, 1:6, 1:8, 1:10), el tiempo de extracción (5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min) a una temperatura constante de  $20^{\circ}\text{C}$ .

Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo A



**Figura 26.** Rendimiento de extracción de compuestos fenólicos del alperujo con diferentes disolventes y relaciones alperujo-disolvente a una temperatura de 20°C

Como se puede apreciar en la figura 26, a una temperatura de 20°C el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos (mg Tirosol/g alperujo seco) incrementa hasta una relación de 1:6 y después de esta (relación 1:8, 1:10) el rendimiento de extracción disminuye al emplear agua como disolvente de extracción. En el caso de utilizar etanol se observa un mayor rendimiento al emplear una relación alperujo-disolvente de 1:4. Después de esta relación el rendimiento de extracción minorará. De acuerdo a estudios realizados por algunos autores (Pinelo et al, 2005) al aumentar el volumen de disolvente en relación a la masa de muestra utilizada se obtienen mejores resultados considerando los principios de transferencia de masa en el cual uno o varios compuestos se desplazan de una región de alta concentración (en este caso el alperujo) a una región de baja concentración (en este caso el disolvente). Otros autores (Spigno et al, 2007), por su parte, encontraron mayores rendimientos de extracción de compuestos fenólicos con relaciones que apenas involucra el volumen necesario de disolvente para cubrir el material de extracción. Por ende no se presentó un comportamiento definido del rendimiento de extracción de compuestos fenólicos del alperujo empleando diversas relaciones de masa muestra/disolvente ya que el rendimiento depende la naturaleza del compuesto

extraíble, grado de polimerización y relación con la polaridad del disolvente utilizado en la extracción, como menciona Soto & Rosales, en su investigación (Soto & Rosales, 2016).

Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos, en los ensayos realizados en el presente trabajo fin de master, se obtienen mayores rendimientos de extracción al utilizar relaciones de masa de alperujo y volumen de disolvente bajas (1:4 y 1:6) al trabajar con etanol al 96% y agua destilada.

En el caso del tiempo de extracción, se aprecia que en la relación 1:4 el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos incrementa conforme aumenta el tiempo, como aseguran algunas investigaciones (Sepúlveda, C et al, 2016), explicándose que la difusión es un fenómeno que depende del tiempo. Por ende, entre mayor tiempo transcurra, mayor penetración en el tejido se obtendrá y, consecuentemente, mayor cantidad de compuestos fenólicos se extraen. Sin embargo, en los resultados de los ensayos empleando relaciones 1:6, 1:8 y 1:10 de alperujo-disolvente se observa una disminución del rendimiento de extracción después de un tiempo determinado, posiblemente por degradación de los compuestos fenólicos por aplicar tratamientos de larga duración.

Por otra parte, se observa que el mayor rendimiento de extracción a una temperatura de 20°C empleando como disolvente agua se obtiene para una relación de 1:6 con un tiempo de contacto de extracción de 120 minutos (3.47 mg Tirosol/g alperujo seco), del cual se puede inferir que a mayor tiempo de extracción se pueden obtener mejores resultados de rendimiento de extracción asegurándose que la relación alperujo disolvente sea menor a 1:6.

Al emplearse como disolvente de extracción etanol a una temperatura de 20°C se obtienen mayores rendimientos de extracción de compuestos fenólicos en comparación con el agua. Este comportamiento se puede explicar porque el etanol, por su menor polaridad que el agua, puede presentar mayor afinidad con el compuesto a extraer (compuestos fenólicos) y el material vegetal de trabajo (alperujo) (Muñoz, William, et al, 2015), ya que diversos estudios muestran que el contenido de fenoles en los extractos varía con la polaridad de los disolventes. Por ejemplo, en la extracción de compuestos fenólicos del té se emplea regularmente metanol absoluto, ya que se obtienen altos valores de rendimiento en comparación con otros disolventes y en el caso de la extracción de polifenoles del trigo utilizar una fracción acetona-agua al 50% resulto más eficiente que emplear solo agua como disolvente de extracción

(Leyva, Jesumar et al, 2013). Cabe resaltar que para la experimentación realizada en esta Tesis Final de Máster se emplearon sustancias que no son tóxicas y cumplen con el reglamento 1907/2006, de 18 de diciembre de 2016, relativo al Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y preparados químicos (REACH).

De los ensayos realizados a una temperatura a 20°C con etanol, se observó que el mayor rendimiento de extracción se obtiene con una relación de alperujo/disolvente de 1:4 y un tiempo de contacto solido-liquido de 120 minutos (5.36 mg tirosol/g alperujo seco). Sin embargo, cabe resaltar que se pueden obtener resultados similares con la misma relación y un tiempo menor de extracción de 60 minutos (5.25 mg tirosol/g alperujo seco) o con una relación de 1:6 y tiempo de contacto de extracción de 30 minutos (5.08 mg tirosol/ g alperujo seco), con el fin de disminuir los costos operacionales y el tiempo de extracción.

Al emplear etanol al 96% como disolvente de extracción a una temperatura de 20°C±2°C, se obtienen mayores rendimientos de extracción de los compuestos fenólicos al compararse con los resultados conseguidos al utilizar agua.

Por ende, se llevó acabo un segundo bloque de ensayos donde se modificó el parámetro de la temperatura para observar la influencia en la extracción de compuestos fenólicos, azúcares y en la variación del pH, la conductividad eléctrica y el factor de color usando etanol como disolvente de extracción y conservando las relaciones de masa alperujo-disolvente como en los ensayos anteriormente realizados (1:4, 1:6, 1:8, 1:10).

### **5.3. Efecto de la temperatura en la extracción con etanol**

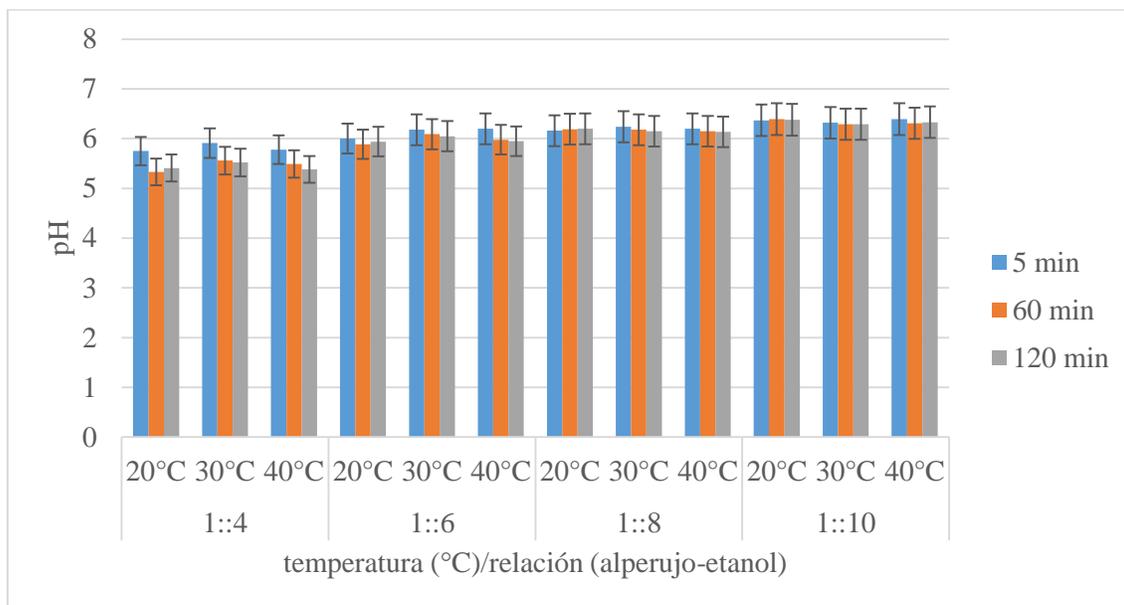
En este apartado se presentan los resultados obtenidos de la variación del pH, conductividad eléctrica, color y rendimiento de extracción de azúcares y compuestos polifenólicos del alperujo a diferentes temperaturas (20°C, 30°C y 40°C) empleando como disolvente el etanol al 96%, ya que presento mejor rendimiento de extracción de los compuestos de interés en comparación con el agua.

#### **5.3.1. Determinación de pH**

En la figura 27 se evidencia la variación del pH de los extractos obtenidos en los ensayos realizados a las diferentes temperaturas (20°C, 30°C y 40°C), tiempo de contacto de

extracción (5 min, 60 min y 120 min), relaciones de masa alperujo-disolvente a emplear (1:4, 1:6, 1:8, 1:10) empleando como disolvente de extracción etanol al 96%.

Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo B.



**Figura 27.** Variación del pH del extracto obtenido a diferentes temperaturas, relaciones alperujo-etanol y tiempos de extracción

Como se aprecia en la figura 27, el parámetro de pH incrementa conforme aumenta la relación de masa de alperujo-disolvente (1:4, 1:6, 1:8, 1:10), alcanzando valores de 6.4 con una relación de 1:10 y un tiempo de extracción de 5 minutos, ya que el volumen empleado de disolvente se encontraba en exceso en comparación a la masa de alperujo, prevaleciendo el pH del etanol acorde incrementaba la relación.

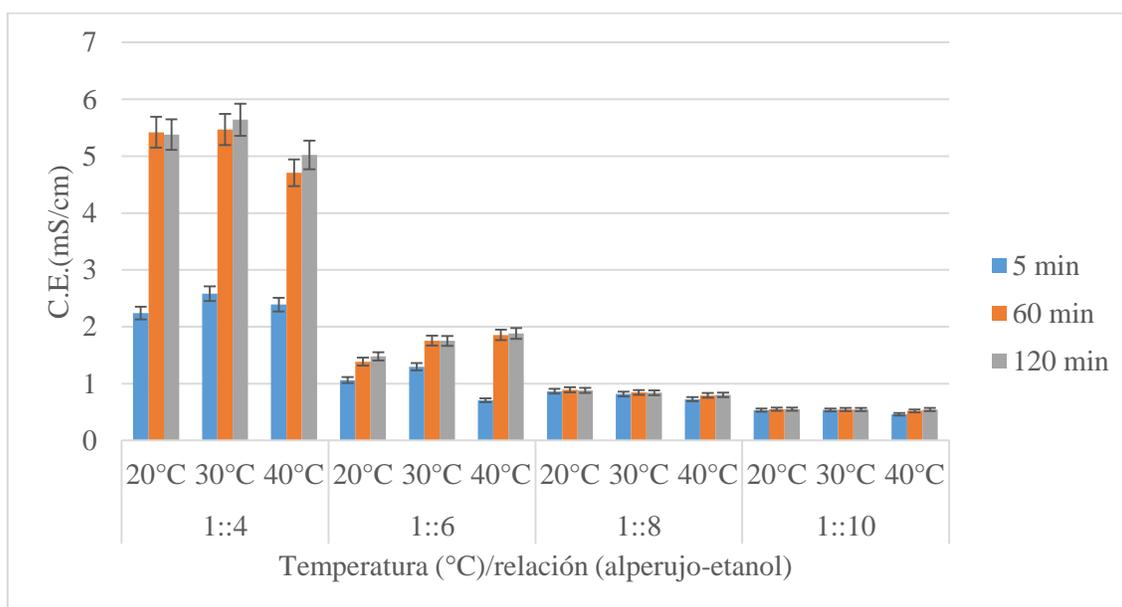
Por otra parte, se evidencia una disminución del pH entre los extractos obtenidos a 5 y 60 minutos, siendo más notorio en las relaciones 1:4 y 1:6 observándose un cambio de 5.75 a 5.33 y de 6 a 5.89, respectivamente. Estos cambios se presentaron porque la mezcla a los 5 minutos de contacto con agitación entre el disolvente y el alperujo no era homogénea, por lo que gran parte de la muestra tomada correspondía al disolvente, etanol.

De acuerdo a lo mencionado en el apartado 5.2.1, se sugiere en próximas investigaciones realizar ensayos de extracción modificando el pH a una región ácida empleando disolventes de carácter ácido que permitan optimizar el proceso de extracción.

### 5.3.2. Determinación de conductividad eléctrica

En la figura 28 se observa el comportamiento del parámetro de conductividad eléctrica de los diferentes extractos obtenidos en los ensayos realizados a las diferentes temperaturas (20°C, 30°C y 40°C), tiempo de contacto de extracción (5min, 60min y 120min) y relaciones de masa alperujo-disolvente (1:4, 1:6, 1:8, 1:10) al utilizar como disolvente etanol.

Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo B.



**Figura 28.** Variación de la conductividad eléctrica del extracto obtenido a diferentes temperaturas, relaciones alperujo-etanol y tiempos de extracción

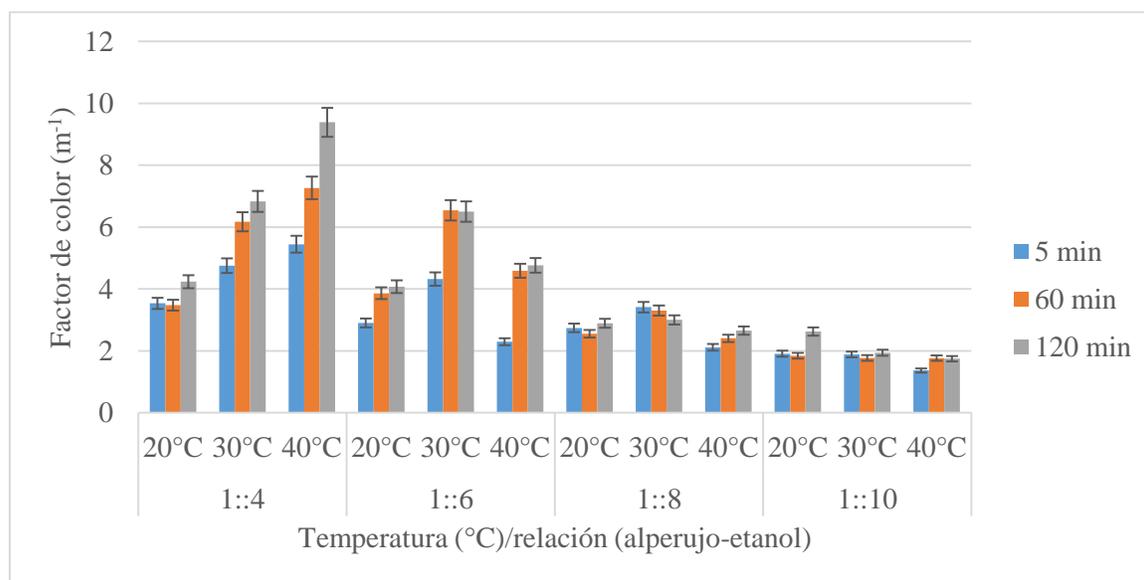
Como se puede apreciar, la conductividad eléctrica disminuye rápidamente a medida que aumenta el volumen de etanol y se minimiza la masa de alperujo a utilizar, es decir se incrementa la relación alperujo-etanol, lo cual se debe principalmente a que al entrar en contacto el etanol con el alperujo, diluye y reduce la concentración de iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{P}^{\pm 3}$ , entre otros elementos de la materia orgánica del alperujo (Aranda, 2006), que contribuyen a la salinidad del extracto que se ve reflejada indirectamente al medir el parámetro

de conductividad eléctrica, siendo más evidente cuando se emplean grandes volúmenes de disolvente y poca cantidad de masa del alperujo, como es el caso del cambio del parámetro de C.E de la muestra original, al entrar en contacto con el etanol en una relación 1:4, el cual disminuye de 15.5 mS/cm a 5.30 mS/cm.

El efecto de la temperatura en los ensayos realizados, utilizando etanol como disolvente extractante en diferentes proporciones con la muestra de alperujo, no evidenció cambios en el parámetro de conductividad eléctrica como se aprecia en la figura 28.

### 5.3.3. Determinación de color

El comportamiento del factor de color en los extractos obtenidos en los ensayos realizados a las diferentes temperaturas (20°C, 30°C y 40°C), tiempo de contacto de extracción (5 min, 60 min y 120 min), relaciones de masa alperujo-disolvente a emplear (1:4, 1:6, 1:8, 1:10) utilizando como disolvente etanol al 96%, se muestran en la figura 29. Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo B.



**Figura 29.** Variación del factor de color en la extracción a diferentes temperaturas, relaciones alperujo-etanol y tiempos de extracción

Como se aprecia en la figura 29, el factor de color en los extractos obtenidos presentó un cambio entre las relaciones de alperujo-disolvente en estudio. El factor de color en la relación 1:4 fue el mayor de la experimentación y conforme se aumentaba la relación alperujo-

disolvente disminuía el factor, ya que, como se mencionaba anteriormente, el etanol diluye la concentración de los compuestos que dan el color al extracto. Por ende, entre mayor sea el volumen del disolvente a emplear menor será el factor de color.

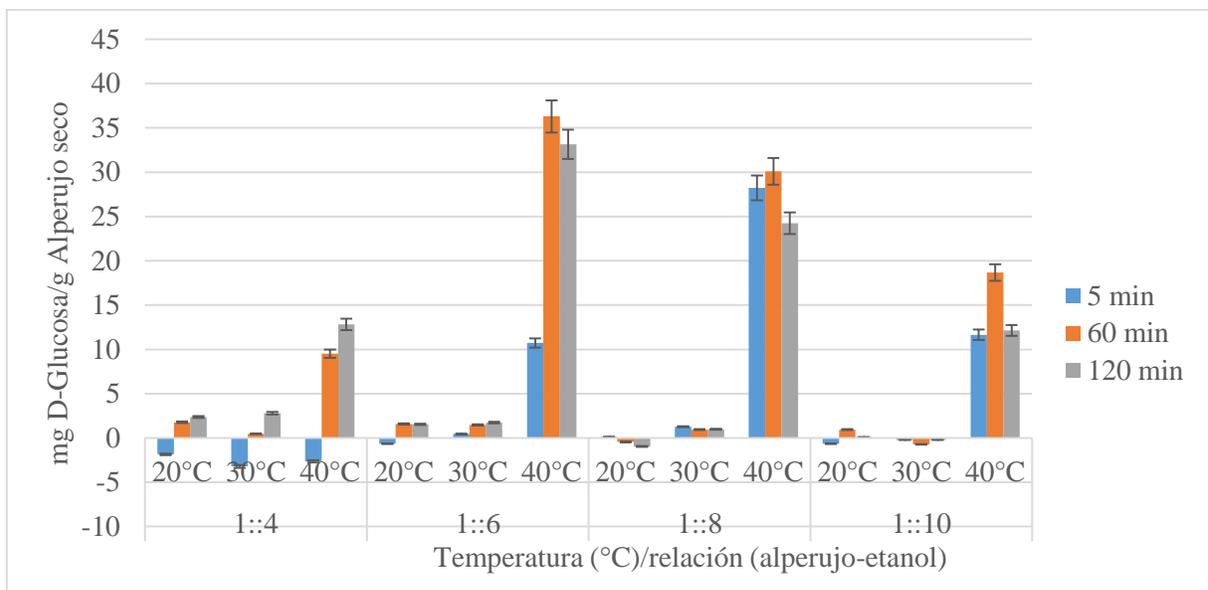
Por otra parte, cabe resaltar que la temperatura tiene efecto en el parámetro del color, ya que se evidencia que con el aumento de la temperatura en la relación 1:4, se incrementa el factor, lo cual se debe a que la materia orgánica del alperujo se oxida con el aumento de la temperatura propinando un color pardo-marrón oscuro que, al ser detectable por el espectrofotómetro, registra un valor más alto de absorbancia. De igual manera, el incremento del factor de color con el aumento de la temperatura pudo deberse a que la temperatura favorece la extracción de compuestos que dan el color al extracto. Para el caso de las relaciones 1:6, 1:8 y 1:10 se evidencia que, a una temperatura de 30°C, se presenta una mayor coloración por parte del extracto, debido a la degradación y oxidación de los compuestos fenólicos en quinonas que confieren a la mezcla alperujo-disolvente un color pardo, aumentando la absorbancia en el momento de la lectura con el espectrofotómetro UV-VIS.

El tiempo de extracción también es un parámetro que influye en el factor de color como se observa en la figura 29, ya que a medida que transcurre el tiempo de contacto entre el alperujo y el disolvente con una agitación se contribuye a la extracción de compuestos que dan el color al extracto y de igual manera se favorece la oxidación y degradación de la materia orgánica del alperujo, favoreciendo a la aparición de un color oscuro marrón que en el momento de cuantificarse con el espectrofotómetro UV-VIS, la absorbancia a la longitud de onda establecida será mayor, viéndose reflejado en el factor de color.

#### **5.3.4. Determinación de azúcares**

El rendimiento de extracción de azúcares totales solubles del alperujo con etanol para los ensayos realizados se presenta en la figura 30. Los ensayos se realizaron modificando el parámetro de temperatura (20°C, 30°C y 40°C), tiempo de contacto de extracción (5 min, 60 min y 120 min) y relación de masa alperujo-disolvente a emplear (1:4, 1:6, 1:8, 1:10).

Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo B.



**Figura 30.** Rendimiento de extracción de azúcares del alperujo a diferentes temperaturas, relaciones alperujo-etanol y tiempos de extracción

Como se aprecia en la figura 30, el rendimiento de extracción de azúcares es bajo, casi nulo en las diferentes relaciones de alperujo-disolvente experimentadas (1:4, 1:6, 1:8, 1:10) a las temperaturas de 20 y 30°C. Sin embargo, se puede observar que el aumento de la temperatura en el proceso de extracción sólido-líquido favorece la extracción de azúcares totales, alcanzándose a una temperatura de 40°C rendimientos de 36,2 mg D-Glucosa/g alperujo seco con un tiempo de extracción de 60 minutos y relación 1:6 alperujo-disolvente, lo cual se debe a que la temperatura produce la alteración física de las fibras lignocelulósicas, ocasionando separación y ruptura de las mismas permitiendo la liberación de monómeros por despolimerización (León, C et al 2011).

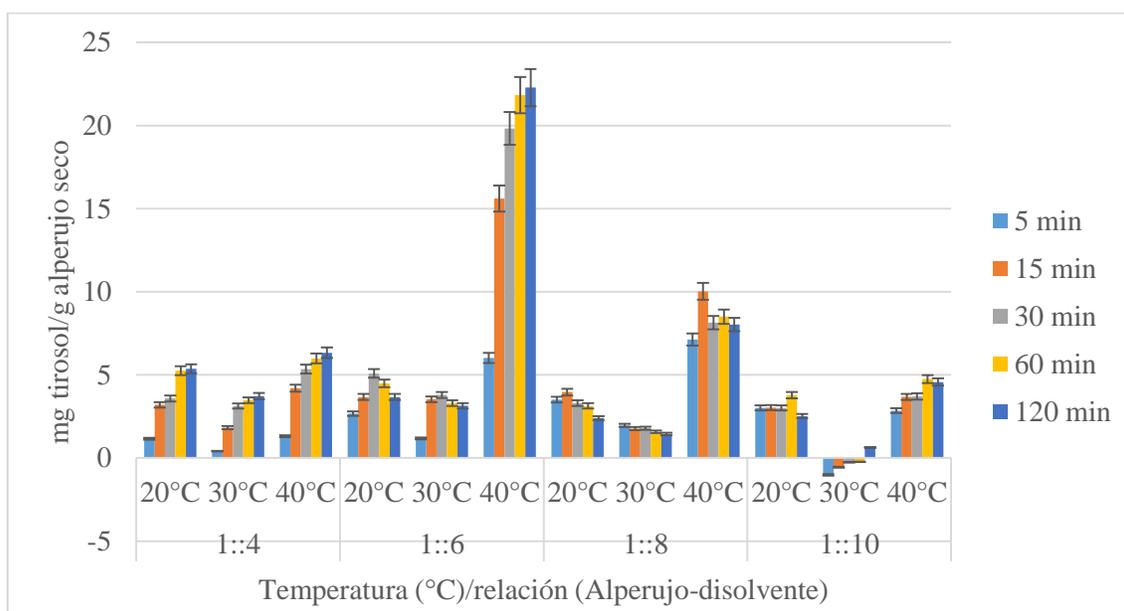
Por otra parte, se observa que el rendimiento de extracción al emplear una relación 1:4 es mayor al estar en contacto el alperujo con el disolvente en agitación a 300 rpm durante 120 minutos, ya que la cantidad de masa de alperujo utilizada se encuentra en mayor proporción al volumen disolvente usado para llevar a cabo la extracción en comparación con las otras relaciones experimentadas, por eso se requiere mayor tiempo para llevar a cabo un mayor rendimiento de extracción por parte del etanol. En el caso de las relaciones 1:6, 1:8 y 1:10 se evidencia que el rendimiento máximo de extracción se obtiene con un tiempo de contacto

alperujo-disolvente de 60 minutos, y posterior a este tiempo el rendimiento disminuye ligeramente.

### 5.3.5. Influencia de la temperatura en la extracción de compuestos fenólicos.

El rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos del alperujo con etanol a diferentes temperaturas se muestra en la figura 31. Los resultados presentados corresponden a ensayos realizados modificando la relación alperujo-etanol (1:4, 1:6, 1:8, 1:10), la temperatura de experimentación (20°C, 30°C, 40°C) y el tiempo de contacto de extracción (5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min).

Los resultados empleados para la realización del gráfico se presentan en el Anexo B.



**Figura 31.** Rendimiento de extracción de compuestos fenólicos del alperujo a diferentes temperaturas, relaciones alperujo-etanol y tiempos de extracción

El rendimiento de extracción de compuestos fenólicos del alperujo con etanol al 96% a los diversos ensayos realizados demuestra que al emplear una relación masa alperujo- disolvente (1:6) se obtiene la mayor extracción de C.F (23 mg tirosol/g alperujo seco con un tiempo de contacto de 120 minutos y una temperatura constante de experimentación de 40°C), resultados similares a los obtenidos por Giralda, 2017, en cuya investigación se logra extraer con una

mezcla etanol-agua (50:50 %V/V) durante un tiempo de 30 minutos y una temperatura de 70°C 28 mg GAE/g alperujo con una relación alperujo-disolvente 1:5 (Giralda, 2017).

Se puede observar también que el aumento de la temperatura favorece la extracción de los compuestos fenólicos del alperujo, ya que, como mencionan otros autores en investigaciones anteriores, el incremento de la temperatura favorece la división y rompimiento de la pared celular de la muestra en estudio por las vibraciones moleculares que se generan por la energía térmica aplicada, permitiendo a su vez la ruptura de fuerzas intermoleculares y de algunos enlaces. Además, el aumento de la temperatura puede contribuir a la activación de enzimas que actúen en la descomposición de compuestos complejos que crean enlaces por puentes de hidrogeno con los compuestos fenólicos, permitiendo la extracción de estos (Muñoz, William, et al, 2015).

Por otra, se observa en la figura 31 que el aumento del tiempo de contacto entre el alperujo y el etanol favorece la extracción de compuestos fenólicos en el caso de emplear relaciones en proporción 1:4 y 1:6 de masa alperujo y etanol, respectivamente. Para relaciones superiores 1:8 y 1:10, el mayor rendimiento de extracción se obtiene a los 15 minutos de contacto. Posterior a este el rendimiento disminuye, aunque ligeramente y la disminución entra dentro del error experimental observado.

El mayor rendimiento de extracción a 20°C se obtiene con un tiempo de extracción de 120 min empleando una relación de alperujo/disolvente de 1:4 (5.36mg tirosol/g alperujo seco). Sin embargo, se pueden obtener resultados similares con una relación de 1:6 y tiempo de contacto de extracción de 30 minutos (5.08 mg tirosol/ g alperujo) con el fin de disminuir los costos operacionales y el tiempo de extracción, como se mencionaba en el apartado 5.2.5.

El mayor rendimiento de extracción a 30°C se consigue al emplear una relación alperujo/disolvente 1:6 y un tiempo de extracción de 15 minutos (3.53mg tirosol/g alperujo seco), ya que después de este tiempo los compuestos fenólicos comienzan su degradación y oxidación. Se logra obtener resultados similares empleando una relación 1:4 con un tiempo de 120 minutos (3.72 mg tirosol/g alperujo); sin embargo, el incremento del tiempo de contacto entre el alperujo y el disolvente incrementa los costos operaciones. Por ende, se sugiere realizar un análisis de costos para observar la rentabilidad de la extracción y determinar si es

más rentable aumentar el tiempo de operación y disminuir el volumen del disolvente, o por el contrario, disminuir el tiempo de extracción y aumentar el volumen de disolvente.

Por otra parte, en el caso de la relación 1:8 y 1:10, se consiguen rendimientos de extracción muy bajos, ya que como, se mencionaba en el apartado 5.2.5, dependiendo de la naturaleza del compuesto extraíble, el grado de polimerización y relación con la polaridad del disolvente utilizado se pueden obtener mayores o menores rendimientos al incrementar o disminuir la relación de masa de alperujo/ disolvente. Por tal motivo, para esta experimentación el rendimiento de extracción ha sido óptimo al utilizarse relaciones relativamente bajas (1:4, 1:6).

Se evidencia notoriamente que el mayor rendimiento de extracción se obtiene al emplear una relación 1:6 con una temperatura constante de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un tiempo de contacto de 120 minutos (22.28 mg tirosol/g alperujo seco), donde se observa que la difusión desde el alperujo al seno de la mezcla se ve favorecida por el tiempo, por ende, entre mayor tiempo transcurra, mayor penetración en el tejido se obtendrá y consecuentemente mayor cantidad de compuestos fenólicos. Sin embargo, desde un tiempo de 60 minutos se distingue que el rendimiento de extracción se vuelve constante con un rendimiento aproximado de 22mg tirosol/g alperujo seco. En el caso de la relación 1:4, 1:8 y 1:10 se obtienen rendimientos inferiores a 10 mg tirosol/g alperujo seco.

#### **5.4. Selección de extracción y condiciones de operación**

Como el objetivo de este Trabajo de Fin de Master (TFM) es la extracción de compuestos fenólicos. A partir de los diferentes ensayos realizados a lo largo de la experimentación, se observó que el mayor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos (23 mg tirosol/g alperujo seco) se obtiene al emplear como disolvente extractante etanol con una relación 1:6 de alperujo-disolvente, es decir 1350,62g de alperujo y 1456,75mL de etanol; un tiempo de contacto de extracción de 120 minutos, una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  y una agitación constante de la mezcla de 400rpm.

## 6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados experimentales obtenidos en el presente Trabajo Fin de Master se pueden llegar a las siguientes conclusiones:

- El parámetro de pH incrementa conforme aumenta la relación de masa de alperujo-disolvente (1:4, 1:6, 1:8, 1:10) al emplearse como disolvente etanol, variando el pH de 5.30 a 6.40 de una relación 1:4 a 1:10, respectivamente. En el caso de emplearse agua destilada como disolvente de extracción no se obtienen cambios significativos del parámetro pH con respecto a la muestra original al aumentar la relación masa-disolvente.
- La conductividad eléctrica de la muestra (15.8mS/cm) disminuye a medida que se aumenta la relación de masa de alperujo disolvente alcanzándose valores de 4.94 mS/cm y 0.46 mS/cm al utilizarse como disolvente de extracción agua y etanol, respectivamente.
- El factor de color aumenta conforme incrementa el volumen de disolvente extractante y el tiempo de extracción, en el caso de utilizar como disolvente de extracción agua. En caso de emplear etanol, disminuye a medida que se incrementa la relación alperujo-disolvente, pero se ve favorecido con el aumento de temperatura y tiempo de contacto de extracción.
- La extracción de azúcares totales se produjo únicamente con etanol a partir de una temperatura de 40°C, alcanzándose rendimientos de 36,2 mg Azúcar/g alperujo seco con un tiempo de extracción de 60 minutos y relación 1:6 alperujo-disolvente. A temperaturas de experimentación inferiores no se logra la extracción del analito o el rendimiento es muy bajo, casi nulo.
- Al emplearse como disolvente de extracción etanol a una temperatura de 20°C se obtienen mayores rendimientos de extracción de compuestos fenólicos del alperujo en comparación con el agua debido a la afinidad que pueden tener los compuestos fenólicos con dicho disolvente.
- Al emplearse relaciones de masa alperujo-disolvente 1:4 y 1:6 se obtienen mayores rendimientos de extracción de compuestos fenólicos, en comparación con los

resultados obtenidos para las relaciones 1:8 y 1:10, utilizando como disolvente tanto agua como etanol.

- El tiempo de extracción es un parámetro que afecta el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos del alperujo, ya que dependiendo de la temperatura de experimentación y de la relación de masa de alperujo-disolvente puede favorecer o perjudicar la extracción del compuesto de interés. En el caso de relaciones 1:4 se favorece la extracción, pero al emplearse relaciones 1:6, 1:8 y 1:10 al aplicarse temperaturas elevadas se pueden oxidar y degradar los polifenoles con el transcurso del tiempo.
- El incremento de la temperatura favorece significativamente el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos al utilizarse relaciones de masa de alperujo: disolvente 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10; y etanol al 96% como disolvente extractor.
- El proceso de extracción sólido – líquido permitió obtener rendimientos de extracción de 22,28 mg tirosol/g alperujo seco empleando como disolvente etanol en relación 1:6 con un tiempo de extracción de 120 minutos y una temperatura constante de experimentación de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . No obstante, en estas condiciones también se favorece la extracción de otros compuestos como azúcares.

## **7. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS**

A la vista de los resultados obtenidos en el presente Trabajo Final de Máster y de los comentarios que se han ido realizando a lo largo de la discusión de dichos resultados, se sugieren las siguientes líneas de investigación como continuación de este trabajo:

- Realizar ensayos de extracción modificando el pH a una región ácida o bien empleando disolventes de carácter ácido para optimizar el proceso de extracción.
- Observar el rendimiento de extracción al emplear mezclas de agua-etanol en diversas proporciones u otros disolventes orgánicos.
- Incrementar la temperatura para observar si existe una mejora en el rendimiento de azúcares extraídos del alperujo seco al emplear etanol como disolvente extractante, comprobando a su vez si dicho incremento de temperatura produce algún tipo de degradación de los compuestos fenólicos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- AGAPA. (2015). *Evaluación de la producción y usos de los subproductos de las agroindustrias del olivar en Andalucía*. Andalucía.
- AICA. (2019). *PRODUCCIONES Y EXISTENCIAS EXTRACTORAS*. España: AICA.
- Angerosa, F; Mostallino, R; Basti, C; Vito, R. (2000). Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food chemistry*(68), 283-287.
- Aranda, E. (2006). *Fraccionamiento físico de alpeorajo como base para desarrollar una estrategia biológica con hongos saprobios y arbusculares para la eliminación de su fitotoxicidad*. Granada: Universidad de Granada.
- Cabrera, F. (2006). *Características y tratamiento de las aguas residuales industriales por sectores: Molturado de aceituna para la obtención de aceite oliva virgen*. Sevilla : Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla.
- Carbonell, C. (2017). *Recuperación de compuestos fenólicos contenidos en la salmuera residual del proceso de fermentación de las aceitunas de mesa mediante procesos de membrana: Combinación de la ultrafiltración y la nanofiltración*. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia .
- Cassano, A., Conidi, C., & Drioli, E. (2011). Comparison of the performance of UF membranes in olive mill wastewaters treatment. *Water research* , 3197-3204.
- Cassano, A., Conidi, C., & Drioli, E. (2011). Comparison of the performance of UF membranes in olive mill wastewaters treatment. *Water Reserach*, 3197-3204.
- Cassano, A., Conidi, C., & Drioli, E. (2011). Comparison of the performance of UF membranes in olive mill wastewaters treatment. *Water Research*, 3197-3204.
- Cifuentes, M. (2017). *Recuperación de polifenoles de aguas residuales del proceso de aceitunas de mesa mediante membranas*. Valencia: UPV.
- COI. (2012). *General description of olive growing in Spain* . COI .

- Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. *OFFARM*, 23(6), 81-84.
- EUROTAST. (31 de Enero de 2017). *Producción de aceitunas para aceite de oliva, 2017 (% de la producción total cosechada en la UE-28)*. Obtenido de [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=File:Production\\_of\\_olives\\_for\\_olive\\_oil,\\_2017\\_\(%25\\_of\\_EU-28\\_total\\_harvested\\_production\).png&oldid=420787](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=File:Production_of_olives_for_olive_oil,_2017_(%25_of_EU-28_total_harvested_production).png&oldid=420787)
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2008). *Determinación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu*. Valencia: UPV.
- Giralda, C. (2017). *Estudio experimental de la extracción de polifenoles de alperujo de aceituna por extracción asistida con microondas*. Valladolid: Universidad de Valladolid.
- Gómez, J. (2007). *Gestión de residuos de la industria oleícola*. Madrid: Biomasa Peninsular.
- Hermoso, M., González, J., Ojeda, M., García, Á., Morales, J., Ruiz, L., & Fernández, Á. (1998). *Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases* (Tercera ed.). Sevilla: Consejería de agricultura y pesca.
- Huang, M., Ho, C., & Lee, C. (1992). *Phenolic compounds in Food and their effects on Health I*. Washington D.C.: ACS SYMPOSIUM SERIES.
- Iñiguez, A., Paz, S., & Sánchez, L. (1999). *Olivicultura*. Valencia : Generalitat Valenciana.
- Izquierdo, R. (2008). *La materia organica del suelo. Papel de los microorganismos*. Granada: Universidad de Granada.
- León, C., Florián, P., Mostacero, J., Arellano, J., Bardales, C., Martín, E., . . . Villanueva, F. (2011). Extraction of Sugar Total Reducers “ART” of “coronta” of Zea mays “yellow maize lasts”. *UCV - Scientia*, 3.
- Leyva, J., Jesumar, J., & González, G. e. (2013). Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *phellinus merrillii*. *Mexicana de micología*, 37, 11-17.

- Lizárraga, C., Hernadéz, C., & González, G. B. (2018). Propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de polifenoles en peces carnívoros de cultivo. *Ciencia UAT*, 127-136.
- Lopéz, L. (2000). *El aceite de oliva* . Andalucía : CICA .
- Ma, Y., Q., C., Liu, D., & Ye, X. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasoun.Sonochem*, 16(1), 57-62.
- Martínez, A., Contreras, J., & Belares, R. (2010). Extracción de polifenoles asistida por microondas a partir de Púnica granatum L. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, II(4).
- Martínez, M., & Osorio, A. (2018). Validation of a method for real color analysis in water. *UNAL*, VII(1), 143-155.
- Meneses, R., & Cerda, G. (2016). *Utilización de alperujo en la alimentación caprina* . La Serena, Chile: INIA .
- Muñoz, W., Chavez, W., Pabón, L., Rendón, M., Chaparro, M., & Otálvaro, Á. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *CENIC Ciencias químicas*, 46, 38-46.
- Nat, R. (2004). *Untersuchungen zum Abbau ausgewählter Reaktivfarbstoffhydrolysate mit Ozon: Charakterisierung der Produkte durch LC-MS-Analyse* . Wuppertal.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Nuñez, M. (2005). Effect of solvent, temperature and solvent-to. Solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2111-2117.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, 27(1), 76-89.
- Ramírez, L., & García, J. (2008). Demanda química de oxígeno de muestras acuosas. *Química Ambiental de las sustancias y de los Residuos Peligrosos* .

- Román, J., Villarino, A., Serrano, L., Lezcano, C., Urrialde, R., Sánchez, F., . . . Cao, J. (2005). *El aceite de oliva y la dieta mediterránea*. Madrid: Instituto de Salud Publica.
- Romero, A. (2001). *Diagnostico y estudio de los diferentes sistemas de gestión de alpechines, orujos y alperujos en las almazaras: Características de los residuos* . Sevilla: Instituto de recursos naturales y agro biología de Sevilla.
- Rubio, F., Fernández, J., García, A., Lama, A., & Rodríguez, G. (2017). Influence of pH on the antioxidant phenols solubilised from hydrothermally treated olive oil by-product (alperujo). *Food Chemistry*, 339-345.
- Rubio, J. (2012). *Extracción de compuestos bioactivos mediante pretratamiento con microondas de subproductos vitivinícolas*. Valladolid: Universidad de Valladolid.
- Ryan, D; Antolovich, M; Prenzler, P; Robards, K; Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92, 147-176.
- Sepúlveda, C., Ciro, G., & Zapatá, J. (2016). Extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from leaves of *Bixa orellana* L. *Revista Cubana de plantas medicinales*, 21(2), 133-144.
- Shahid, M., Yusuf, M., & Mohammad, F. (2016). *Plant phenolics: A review on Modern Extraction Techniques* (Vol. 41). Glasgow: University of Glasgow.
- Siebert, K., Carrasco, A., & Lynn, P. (1996). Formation of Protein-Polyphenol Haze in Beverages. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 44, 1997-2005.
- Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *J. Enol. Vitic* 16, 144-158.
- SL, T., & Cartif, F. (2008). *Tratamiento integral de residuos sólidos y líquidos producidos durante la obtención del aceite de oliva* . Barcelona: Mediterraneum Clean.
- Soto, M., & Rosales, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas,Ciencia y tecnología*, 18(4), 701-714.

- Soto, M., & Rosales, M. (2016). Effect of solvent and solvent-to-solid ratio on the phenolic extraction and the antioxidant capacity of extracts from *Pinus durangensis* and *Quercus sideroxylla* bark. *Maderas, Ciencia y tecnología*, 18(4), 701-714.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81, 200-208.
- Trillo, J. (2015 ). *Extracción y purificación de productos naturales de interés industrial* . Almería: Universidad de Almería.
- Whitman, F., Blaydes, D., & Deulin, R. (1971). Experiments in Plant Physiology. *Van Nostrand Reinhold Company* , 55-58.

## 9. ANEXOS

### ANEXO A. Efecto del tipo de disolvente en la extracción a 20°C

Los datos de los resultados empleados para la realización de los gráficos del apartado 5.2. se presentan a continuación.

#### A.1. Tabla determinación de pH a 20°C

<b>Relación</b>	1:4		1:6		1:8		1:10	
<b>Temperatura (°C)/tiempo(min)</b>	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol
<b>5 min</b>	5,15	5,75	5,04	6	5,07	6,16	5,08	6,37
<b>60 min</b>	5,13	5,33	5,10	5,89	5,04	6,19	5,07	6,39
<b>120 min</b>	5,13	5,41	5,10	5,94	5,05	6,2	5,04	6,38

#### A.2. Tabla determinación de conductividad eléctrica (C.E.) a 20°C

<b>Relación</b>	1:4		1:6		1:8		1:10	
<b>Temperatura (°C)/tiempo(min)</b>	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol
<b>5 min</b>	10,39	2,24	7,24	1,06	6,35	0,86	4,94	0,53
<b>60 min</b>	12,31	5,42	8,46	1,39	6,67	0,89	5,22	0,55
<b>120 min</b>	12,11	5,38	8,47	1,48	6,58	0,87	5,22	0,55

\*Los resultados consignados en la tabla A.2. se expresan en unidades de  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$

#### A.3. Tabla determinación de color a 20°C

<b>Relación</b>	1:4		1:6		1:8		1:10	
<b>Temperatura (°C)/tiempo(min)</b>	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol
<b>5 min</b>	9,63	3,54	6,05	2,91	5,28	2,74	3,62	1,91
<b>60 min</b>	9,16	3,48	6,88	3,86	5,95	2,55	5,32	1,85
<b>120 min</b>	8,47	4,24	6,76	4,07	6,78	2,89	9,09	2,63

\*Los resultados consignados en la tabla A.3. se expresan en unidades de  $\text{m}^{-1}$

A.4. Determinación de azúcares a 20°C

<b>Relación</b>	1:4		1:6		1:8		1:10	
<b>Temperatura (°C)/tiempo(min)</b>	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol
<b>5 min</b>	-2,15	-1,85	-4,37	-0,65	-7,30	0,11	-7,91	-0,66
<b>60 min</b>	-0,29	1,77	-3,05	1,58	-5,85	-0,44	-7,97	0,95
<b>120 min</b>	0,20	2,37	-1,49	1,55	-7,68	-0,96	-7,67	0,09

\*Los resultados consignados en la tabla A.4. se expresan en unidades de mg Azúcar/g Alperujo

A.5. Influencia del disolvente en la extracción de compuestos fenólicos (C.F.) a 20°C

<b>Relación</b>	1:4		1:6		1:8		1:10	
<b>Temperatura (°C)/tiempo(min)</b>	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol
<b>5 min</b>	-0,46	1,16	1,86	2,67	0,04	3,51	0,87	3,01
<b>15 min</b>	1,03	3,20	2,51	3,67	0,72	3,96	1,38	3,03
<b>30 min</b>	1,61	3,58	2,82	5,09	0,88	3,30	1,86	3,02
<b>60 min</b>	1,58	5,25	3,02	4,49	0,76	3,14	1,07	3,78
<b>120 min</b>	2,49	5,37	3,47	3,67	0,66	2,40	0,78	2,52

\*Los resultados consignados en la tabla A.5. se expresan en unidades de mg Tirosol/ g Alperujo

## ANEXO B. Efecto de la temperatura en la extracción con etanol

Los datos de los resultados empleados para la realización de los gráficos del apartado 5.3. se presentan a continuación.

B.1. Tabla determinación de pH a diferentes temperaturas (20°C, 30°C, 40°C)

<b>Relación</b>	<b>1::4</b>			<b>1::6</b>			<b>1::8</b>			<b>1::10</b>		
<b>Temperatura (°C)/tiempo(min)</b>	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C
<b>5 min</b>	5,75	5,91	5,78	6	6,18	6,2	6,16	6,24	6,2	6,37	6,32	6,39
<b>60 min</b>	5,33	5,56	5,49	5,89	6,09	5,98	6,19	6,18	6,15	6,39	6,29	6,31
<b>120 min</b>	5,41	5,52	5,38	5,94	6,05	5,95	6,2	6,15	6,14	6,38	6,29	6,33
<b>Original</b>	4,95	5,08	4,92	4,97	5,08	4,94	5,09	5,04	4,94	5,15	5,07	5,13

B.2. Tabla determinación de conductividad eléctrica (C.E.) a diferentes temperaturas (20°C, 30°C, 40°C)

<b>Relación</b>	<b>1::4</b>			<b>1::6</b>			<b>1::8</b>			<b>1::10</b>		
<b>Temperatura (°C)/tiempo(min)</b>	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C
<b>5 min</b>	2,24	2,58	2,39	1,06	1,30	0,71	0,87	0,82	0,73	0,53	0,54	0,46
<b>60 min</b>	5,42	5,47	4,71	1,39	1,75	1,86	0,89	0,84	0,79	0,55	0,54	0,52
<b>120 min</b>	5,38	5,64	5,02	1,48	1,75	1,88	0,88	0,84	0,80	0,55	0,55	0,54
<b>Original</b>	15,32	15,74	15,73	14,33	15,74	15,26	15,80	15,96	15,51	16,40	15,80	16,50

\*Los resultados consignados en la tabla B.2. se expresan en unidades de  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$

B.3. Tabla determinación de color a diferentes temperaturas (20°C, 30°C, 40°C)

<b>Relación</b>	1::4			1::6			1::8			1::10		
<b>Temperatura (°C)/tiempo(min)</b>	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C
<b>5 min</b>	3,54	4,75	5,45	2,91	4,32	2,30	2,74	3,41	2,12	1,91	1,89	1,37
<b>60 min</b>	3,48	6,18	7,27	3,86	6,54	4,59	2,55	3,30	2,41	1,85	1,77	1,77
<b>120 min</b>	4,24	6,83	9,39	4,07	6,50	4,76	2,89	3,00	2,66	2,63	1,94	1,75
<b>Original</b>	5,69	10,47	9,77	8,29	10,47	8,95	6,61	9,27	8,90	13,17	13,59	12,34

\*Los resultados consignados en la tabla B.3. se expresan en unidades de m<sup>-1</sup>

B.4. Determinación de azúcares a diferentes temperaturas (20°C, 30°C, 40°C)

<b>Relación</b>	1::4			1::6			1::8			1::10		
<b>Temperatura (°C)/tiempo(min)</b>	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C
<b>5 min</b>	-1,85	-3,20	-2,64	-0,65	0,45	10,72	0,11	1,27	28,23	-0,66	-0,20	11,65
<b>60 min</b>	1,77	0,46	9,52	1,58	1,46	36,29	-0,44	0,95	30,08	0,95	-0,72	18,67
<b>120 min</b>	2,37	2,80	12,83	1,55	1,73	33,14	-0,96	0,98	24,23	0,09	-0,20	12,14

\*Los resultados consignados en la tabla B.4. se expresan en unidades de mg Azúcar/ g Alperujo

B.5. Influencia del disolvente en la extracción de compuestos fenólicos (C.F.) a diferentes temperaturas (20°C, 30°C, 40°C)

<b>Relación</b>	<b>1::4</b>			<b>1::6</b>			<b>1::8</b>			<b>1::10</b>		
<b>Temperatura (°C)/tiempo(min)</b>	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C
<b>5 min</b>	1,16	0,41	1,31	2,67	1,17	6,02	3,51	1,95	7,13	3,01	-1,01	2,85
<b>15 min</b>	3,20	1,83	4,20	3,67	3,53	15,61	3,96	1,77	10,03	3,03	-0,55	3,67
<b>30 min</b>	3,58	3,13	5,34	5,09	3,79	19,83	3,30	1,79	8,14	3,02	-0,26	3,70
<b>60 min</b>	5,25	3,48	5,99	4,49	3,30	21,83	3,14	1,57	8,50	3,78	-0,24	4,75
<b>120 min</b>	5,37	3,72	6,33	3,67	3,14	22,28	2,40	1,44	8,03	2,52	0,63	4,57