

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**

Departamento de Tecnología de Alimentos



**ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN DE
OLEUROPEÍNA CON APLICACIÓN DE
CAMPOS ELÉCTRICOS MODERADOS
(MEF)**

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: VIRGINIA CELADA PRIETO

TUTOR: JUAN ANDRÉS CÁRCEL CARRIÓN

CURSO ACADÉMICO 2020/2021

VALENCIA, JUNIO 2021

Título: Estudio de la extracción de oleuropeína con aplicación de campos eléctricos moderados (MEF).

Resumen:

La hoja de olivo contiene una serie compuestos, como la oleuropeína, que presentan un gran interés por sus propiedades tanto para la industria alimentaria como para otros sectores. Su extracción a nivel industrial incluye el uso de disolventes como el agua o el etanol. Sin embargo, hay un gran interés en encontrar nuevas tecnologías que disminuyan los tiempos de la operación, y que, a su vez, aumenten su rendimiento. En los últimos años, el uso de campos eléctricos como técnica para mejorar la transferencia de masa a través de las membranas celulares, ha despertado un gran interés en la industria alimentaria. Los campos eléctricos moderados (MEF) son unas de las tecnologías más prometedoras debido al efecto de la electroporación, que genera una permeabilidad de las membranas celulares y que se puede relacionar así con un mayor rendimiento de la extracción.

En el presente trabajo se estudió la extracción de oleuropeína, un antioxidante que se encuentra en la hoja de olivo, con aplicación de MEF. Para ello se determinaron las cinéticas de extracción a 50°C, utilizando agua destilada como disolvente. Se ensayaron distintas proporciones de hoja de olivo/agua (carga másica de 1, 5, 10 y 15% p/v) con y sin la aplicación de MEF (1200 Hz y 300 V). El seguimiento de la extracción se realizó tomando muestras a tiempos preestablecidos y se midiendo su absorbancia a 270 nm. Las cinéticas experimentales se modelizaron utilizando el modelo de Naik. Los resultados mostraron la existencia de un tiempo de extracción en el que se obtuvo el máximo de oleuropeína extraída. La extracción con aplicación de MEF mejoró el rendimiento de la extracción, especialmente cuando se utilizaron valores bajos de carga másica. El aumento de la carga másica disminuyó la capacidad de extracción tanto en las extracciones convencionales como en las extracciones con aplicación MEF, pero, a su vez, un aumento de la concentración de polvo de hoja de olivo disminuyó la degradación de la oleuropeína.

Palabras clave: antioxidantes, cinética de extracción, disolvente, extracción, oleuropeína, olivo.

Title: Study of oleuropein extraction with application of moderate electric fields (MEF).

Abstract:

The olive leaf contains numerous compounds, such as oleuropein, which are of great interest because of their properties for the food industry and for other sectors. Industrial extraction includes the use of solvents such as water or ethanol. However, there is a great deal of interest in finding new technologies that will reduce operating times, and at the same time increase their performance. In recent years, the use of electric fields as a technique to improve mass transfer through cell membranes has aroused great interest in the food industry. Moderate electric fields (MEF) are among the most promising technologies due to the effect of electroporation, which generates a permeability of cell membranes and can thus be related to a higher extraction performance.

In the present work, the extraction of oleuropein, an antioxidant found in the olive leaf, with application of MEF, was studied. The extraction kinetics were determined at 50°C, using distilled water as a solvent. Different proportions of olive leaf/water were tested (mass load of 1, 5, 10 and 15% w/v) with and without the application of MEF (1200 Hz and 300V). The extraction was monitored by taking samples at predetermined times and measuring their absorbance at 270 nm. Experimental kinetics were modelled using the Naik model. The results showed the existence of an extraction time in which the maximum extracted oleuropein was obtained. Extraction with MEF application improved extraction performance, especially when low mass load values were used. The increase in mass load decreased extraction capacity both in conventional extractions and in extractions with MEF application, but, in turn, an increase in the concentration of olive leaf powder decreased the degradation of oleuropein.

Key words: antioxidants, extraction, extraction kinetics, oleuropein, olive, solvent.

Títol: Estudi de l'extracció de oleuropeïna amb aplicació de camps elèctrics moderats (MEF).

Resum:

La fulla d'olivera conté una sèrie de compostos, com la oleuropeïna, que presenta un gran interès per les seues propietats, tant per a la indústria alimentària com per als altres sectors. La seua extracció a nivell industrial inclou l'ús de dissolvents com l'aigua o l'etanol. No obstant això, n'hi ha un gran interès a trobar noves tecnologies que disminuïsquen els temps de l'operació, i que, al seu torn, augmenten el seu rendiment. En els últims anys, l'ús de camps elèctrics com a tècnica per a millorar la transferència de massa a través de les membranes cel·lulars, ha despertat un gran interès en la indústria alimentària. Els camps elèctrics moderats (MEF) són unes de les tecnologies més prometedores degut a aquest efecte de la electroporació, que genera una permeabilitat de les membranes cel·lulars i que es pot relacionar així amb un major rendiment de l'extracció.

En el present treball es va estudiar l'extracció de oleuropeïna, un antioxidant que es troba en la fulla d'olivera, amb aplicació de MEF. Per a això es van determinar les cinètiques d'extracció a 50 °C, utilitzant aigua destil·lada com a dissolvent. Es van assajar diferents proporcions de fulla d'olivera/aigua (càrrega màssica de 1, 5, 10 i 15% p/v) amb i sense l'aplicació de MEF (1200 Hz i 300V). El seguiment de l'extracció es va realitzar prenent mostres a temps preestablits i mesurant la seua absorbància a 270 nm. Les cinètiques experimentals es modelització utilitzant el model de Naik. Els resultats van mostrar l'existència d'un temps d'extracció en el qual es va obtenir el màxim de oleuropeïna extreta. L'extracció amb aplicació de MEF va millorar el rendiment de l'extracció, especialment quan es van utilitzar valors baixos de càrrega màssica. L'augment de la càrrega màssica va disminuir la capacitat d'extracció tant en les extraccions convencionals com en les extraccions amb aplicació MEF, però, al seu torn, un augment de la concentració de pols de fulla d'olivera va disminuir la degradació de la oleuropeïna.

Paraules clau: antioxidants, cinètica d'extracció, dissolvent, extracció, oleuropeïna, olivera.

Me gustaría agradecer este trabajo en primer lugar a mi tutor Juan Andrés Cárcel Carrión por la oportunidad de poder trabajar con él, por todo lo aprendido y todo lo que me ha ayudado.

A Malikeh Khanlar por su compañía y ayuda en la parte experimental.

A mis amigas, que me han acompañado en todo este camino y en los cuatro años más especiales de mi vida, en lo bueno y en lo malo. Alba, Clara, Isabel y Marta, gracias.

A mi familia, por los valores y principios inculcados, por apoyarme siempre en todas mis decisiones a pesar de estar lejos de mí.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El olivo y sus propiedades	1
1.2 Utilización de extractos fenólicos naturales en la industria alimentaria	2
1.3 Metodologías de extracción	3
1.3.1 Extracción convencional (sólido-líquido).....	3
1.3.2 Extracción con aplicación de un Campo Eléctrico Moderado: MEF.....	4
1.3.2.1 Campos eléctricos	4
1.3.2.2 Fundamentos del proceso de extracción asistida por MEF	4
1.3.2.3 Parámetros que influyen en el proceso de extracción con campo eléctrico.	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivos general	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1 Materia prima y preparación de la muestra	8
3.2 Determinación de la humedad	8
3.3 Determinación de la conductividad	8
3.4 Equipo de aplicación MEF y sistema de control de la temperatura. Descripción del sistema experimental	9
3.5 Puesta a punto del método de extracción	10
3.6 Experiencias de extracción	10
3.6.1 Experiencias de extracción convencional	10
3.6.2 Experiencias de extracción MEF	11
3.7 Seguimiento de la extracción	11
3.8 Modelado de cinética de extracción	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1 Humedad de la muestra de hoja de olivo	13
4.2 Conductividad eléctrica de las suspensiones hoja de olivo-disolvente	13
4.3 Efecto de la carga másica en la cinética de extracción convencional	15
4.5 Experiencias de extracción con aplicación de MEF	17
4.6 Modelización de las cinéticas de extracción	19
4. CONCLUSIONES	23
5. BIBLIOGRAFÍA	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Montaje experimental para las experiencias extracción con aplicación MEF.	9
Figura 2. Evolución de la conductividad eléctrica con la temperatura en suspensiones con diferentes proporciones de hoja de olivo y agua destilada (% peso/volumen).....	14
Figura 3: Evolución de la cantidad de oleuropeína (mg de oleuropeína/g hoja de olivo (ms)) extraída a medida que pasa el tiempo de extracción utilizando un método de extracción convencional. Cargas másicas de 1 y 15% (peso/volumen)de hoja de olivo en agua destilada..	16
Figura 4: Cinéticas de extracción con aplicación MEF de hoja de olivo con agua a cargas másicas de 1 y 15% peso/volumen). Evolución de la cantidad de oleuropeína (mg de oleuropeína/g hoja de olivo (ms)) en el extracto a medida que pasa el tiempo de extracción.	18
Figura 5: Comparación de la evolución de la cantidad de oleuropeína extraída (mg de oleuropeína/g hoja de olivo (ms)) con el tiempo de extracción. Cargas másicas de 1 y 15% (peso/volumen) de hoja de olivo en agua destilada y extracciones realizada sin y con aplicación MEF.....	18
Figura 6: Ajuste al modelo de Naik a la cinéticas de extracción experimental de oleuropeína con carga másica del 1% (peso/volumen) de hoja de olivo y agua destilado, sin (A) y con aplicación MEF (B).	20
Figura 7: Ajuste al modelo de Naik a la cinéticas de extracción experimental de oleuropeína con carga másica del 15% (peso/volumen) de hoja de olivo y agua destilado, sin (A) y con aplicación MEF (B).	20
Figura 8: Evolución del parámetro B del modelo de Naik para las cinéticas de extracción en experiencias realizadas sin y con aplicación de MEF a diferentes cargas másicas de hoja de olivo y agua destilada (% peso/volumen).....	22
Figura 9: Rendimiento de extracción en el equilibrio (Y_{∞}) identificado con el modelo de Naik para las cinéticas de extracción en experiencias realizadas sin y con aplicación de MEF a diferentes cargas másicas de hoja de olivo y agua destilada (% peso/volumen).....	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración (mg fenol/kg de subproducto) de los principales compuestos fenólicos del olivo en extractos de algunos subproductos del olivo (Japón-Luján et al., 2008)..... **1**

Tabla 2: Tiempo (min) en el cual se obtuvo la máxima cantidad de oleuropeína extraída en experiencias realizadas con y sin con aplicación MEF a diferentes cargas másicas (% peso/volumen) de hoja de olivo y agua destilada..... **19**

Tabla 3: Parámetros cinéticos del modelo de Naik para las diferentes condiciones de extracción: Cargas másicas de 1, 5, 1% y 15%; y extracción convencional o con aplicación de MEF..... **19**

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El olivo y sus propiedades

El olivo (*Olea europea var. sativa*) es un cultivo de gran valor económico que constituye parte esencial de los valores ecológicos y paisajísticos del ámbito mediterráneo (Bermúdez et al, 2004). De hecho, la producción del aceite de oliva constituye una de las actividades más importantes del área del Mediterráneo. En la Comunitat Valenciana, este cultivo supone una superficie próxima a las 110.000 hectáreas, lo cual representa alrededor del 5% de las casi 2.500.000 hectáreas de superficie cultivadas en España. Esto la convierte en la quinta comunidad en extensión cultivada, por detrás de Cataluña, Extremadura, Castilla-La Mancha y Andalucía. (Paz, 2020).

En la producción de aceite de oliva se generan anualmente un volumen considerable de residuos agroindustriales, cuyo tratamiento y aprovechamiento se está investigando tanto por motivos económicos como ecológicos. Las hojas y ramas de olivo son residuos agrícolas que se generan tanto en la poda como en la recolección de la oliva. Así, la poda genera una media de 7 kg de hojas al año, lo que representa aproximadamente el 10% del peso total de las aceitunas producidas (Tabera et al., 2004). En el caso de la recolección, hojas y ramas pueden considerarse como subproductos industriales, ya que llegan a la almazara en cantidades importantes mezcladas con las olivas. Se trata, por tanto, de un material vegetal muy abundante y completamente renovable, lo que justifica el esfuerzo científico-técnico para encontrar aplicaciones y mejorar los procesos de recuperación y aprovechamiento (Rodríguez, 2008).

Entre los diferentes constituyentes químicos de las hojas de olivo se encuentran compuestos de interés como iridoides, polifenoles, flavonas y carbohidratos. La oleuropeína es uno de los polifenoles biológicamente más activos entre los presentes, al igual que el hidroxitirosol, obtenido de su hidrólisis. La oleuropeína es conocida por tener efecto hipoglucémico, vasodilatador, antimicrobiano, hipotenso, antiinflamatorio, antirreumático, antiaterogénico y antipirético, en gran parte debido a sus propiedades antioxidantes (Gorzynik Debicka et al., 2018). Por otro lado, el hidroxitirosol tiene poder hipoglucémico, antitrombótico, hipocolesterolémico, antiinflamatorio y antimicrobiano, además de proteger del daño oxidativo de los eritrocitos, reduciendo el riesgo de enfermedades coronarias. Además, presenta capacidad reguladora de la respuesta inmunológica y una importante actividad anticancerígena (Haloui et al., 2011).

Tabla 1. Concentración (mg fenol/kg de subproducto) de los principales compuestos fenólicos del olivo en extractos de algunos subproductos del olivo (Japón-Luján et al., 2008).

Fenoles	Subproductos del olivo		
	Hojas	Pequeñas ramas	Hueso del fruto
Hidroxytirosol	n.d.	22 ± 2	18,1 ± 1.9
Luteolin-7-glucósido	155 ± 10	175 ± 8	6,2 ± 0.8
Apigenin-7-glucósido	207 ± 10	10,9 ± 0.8	0,09 ± 0.01
Verbacósido	1428 ± 46	1560 ± 50	0,15 ± 0.03
Oluropeína	19050 ± 880	673 ± 34	0,06 ± 0.02

Por lo tanto, las hojas de olivo (*Olea europea* var. *sativa*) son de gran interés para su aprovechamiento industrial ya que pueden ser fuente de diferentes compuestos bioactivos (Gorzynik Debicka et al., 2018).

1.2 Utilización de extractos fenólicos naturales en la industria alimentaria

Los estudios sobre composición química de hoja de olivo, actividad biológica de sus extractos y posibles aplicaciones han sido muy numerosas y han conducido a la comercialización de extractos de hoja de olivo de utilidad en fitoterapia, cosmética y alimentación, bien como producto dietético o como conservante. Así, durante los últimos años, se ha estudiado la incorporación de compuestos bioactivos en productos alimenticios y formulaciones con el fin hacer uso de extractos naturales ricos en fenoles que aporten beneficios potenciales para la salud humana (Ahmad-Qasem, 2016).

El uso de extractos fenólicos como nuevos ingredientes para la fortificación nutricional ha generado el desarrollo de diferentes productos funcionales con elevado contenido fenólico y actividad antioxidante (Ahmad-Qasem, 2016). Algunos ejemplos incluyen el desarrollo de un café expreso elaborado con extracto fenólico de piel de avellana (Contini et al., 2012), bebidas lácteas fortificadas con compuestos fenólicos extraídos del agua de la vegetación de olivo (Servili et al., 2011), incorporación de un extracto de té verde en pan (Wang & Zhou, 2004) o la adición de extractos vegetales (cacao y semillas de uva) para enriquecer embutidos como "fuet" y "salchichón" (Ribas-Agustí et al., 2014).

Uno de los mayores cambios que ocurren durante el procesado, distribución y preparación de los alimentos es la oxidación de lípidos. Ésta provoca cambios en los productos afectando a su calidad nutricional, seguridad, color, olor, sabor y textura, con resultado final de rechazo por los consumidores (Sánchez et al., 2013). Por ello, y para dar estabilidad al alimento, la industria alimentaria utiliza antioxidantes sintéticos, siendo el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y terbutilhidroxiquinona (TBHQ) los más comúnmente empleados para prevenir el deterioro oxidativo. Sin embargo, se ha encontrado que éstos pueden ser promotores de tumores y cáncer (Huang et al., 2011). Por lo tanto, el uso de antioxidantes naturales puede resultar una alternativa (Fernández-López et al., 2005). Los extractos fenólicos naturales y sus compuestos, pueden considerarse como aditivos prometedores (y baratos) con los que aumentar el potencial antioxidante de los productos alimentarios. De hecho, se ha estudiado el papel de los extractos naturales en la oxidación de los lípidos tanto en aceites como en productos cárnicos (Ahmad-Qasem, 2016) como la carne cocida (Ye et al., 2015) o salchichas de cerdo (Han & Park, 2002; Oh et al., 2002). En cuanto a los aceites vegetales, la fortificación con extractos fenólicos de frutas y sésamo, entre otras fuentes, ha dado lugar a una menor degradación termo-oxidativa durante la fritura (Aladedunye & Matthäus, 2014) y una buena estabilización durante el almacenamiento respectivamente (Mohdaly et al., 2011).

1.3 Metodologías de extracción

La extracción es un paso indispensable en la obtención de compuestos fenólicos a partir de diferentes materiales naturales o residuos agroindustriales. Dada la gran variedad de matrices y compuestos, no existe un método o un protocolo de extracción estándar. De hecho, el desarrollo y estudio de diferentes métodos de extracción para cada caso particular puede proporcionar una información valiosa para la caracterización y valorización económica de dichos residuos (Dueñas Zurita, 2017).

Entre los diferentes métodos para la extracción de bioactivos a partir de matrices vegetales destacan los métodos convencionales, como la extracción sólido-líquido. Probablemente sean los más extendidos, a pesar de que, en general, consumen mucho tiempo y requieren cantidades relativamente grandes de solventes (Corrales et al, 2009). Es por ello que en los últimos años haya habido un interés en el desarrollo de métodos no convencionales con el objetivo de reducir el tiempo de extracción, disminuir el consumo de solventes orgánicos y mantener o incluso mejorar la recuperación de los compuestos de interés (Arrieta et al., 2018). Algunas de estas técnicas emergentes son la extracción por solvente presurizado (Vergara-Salinas et al., 2015), extracción asistida por microondas (Setyaningsih et al., 2015), extracción con fluidos supercríticos (Kazan et al., 2014), extracción asistida por ultrasonidos (Ghitescu et al., 2015) o extracción con aplicación de campos eléctricos moderados (MEF) (Coelho et al., 2017). También se ha explorado la combinación de estas nuevas técnicas. Por ejemplo, se ha propuesto la aplicación de ultrasonidos durante la extracción con fluidos supercríticos como mecanismo para intensificar el proceso y aumentar su rendimiento (Riera et al., 2004; Rodríguez et al., 2014).

1.3.1 Extracción convencional (sólido-líquido)

El proceso de extracción sólido-líquido consiste en la obtención de compuestos de interés de sólidos con solventes (normalmente orgánicos). En esta operación, el disolvente penetra en la matriz sólida por difusión, disuelve a los compuestos solubles y retorna a la superficie del sólido, donde se transporte al entorno líquido. Éste método es uno de los más utilizados y supone la principal metodología de recuperación de compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales agroindustriales (Ballard et al., 2008). Como disolventes se pueden utilizar mezclas acuosas de diferentes solventes (metanol, acetona, etanol) en diferentes proporciones (Paladino, 2016) obteniéndose extractos con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos. Asimismo, la eficiencia del fenómeno de transporte de masa ocurrido durante el proceso de extracción convencional puede optimizarse mediante cambios en los gradientes de concentración, coeficientes de difusión, tipo de solvente, tamaño de partícula, temperatura y tiempo de extracción (Fontana et al., 2013). Esto hace que la elección del solvente y su proporción dependa de todos estos de factores (Dueñas Zurita, 2017) y, por lo tanto, no existe un protocolo estandarizado.

1.3.2 Extracción con aplicación de un Campo Eléctrico Moderado: MEF.

1.3.2.1 Campos eléctricos

Cuando una fuerza eléctrica interactúa en un sistema determinado genera un campo eléctrico (Olivares Rebolledo, 2018). Así, si se tienen dos placas metálicas y paralelas conectadas a un generador, la carga eléctrica de igual magnitud, pero de diferente signo de ambas placas producirá en el espacio que existe entre ellas, un campo eléctrico. Éste será uniforme en el caso de que se trate de un generador eléctrico continuo. Si el generador es de corriente alterna, el campo cambiara de sentido según lo haga la fuente. Este tipo de campos pueden generar una serie de efectos que pueden ser interesantes para la intensificación de ciertos procesos de la industria de los alimentos como son la inactivación de microorganismos, procesos de deshidratación, tratamientos térmicos, extracción de compuestos, etc. Entre éstas técnicas, se encuentra el uso de campos eléctricos pulsados (Pulse Electric Field, PEF) y de campos eléctricos moderados (Moderate Electric Field, MEF) (Cavada, 2017).

1.3.2.2 Fundamentos del proceso de extracción asistida por MEF

El término MEF se refiere al proceso de someter un material alimentario a un campo eléctrico de corriente alterna. En este caso, el material alimentario actúa como una resistencia eléctrica y se produce el calentamiento del mismo siguiendo la ley de Ohm. De ahí, que el proceso se conozca también con el nombre de calentamiento óhmico. Este efecto ha hecho que la aplicación de MEF se haya extendió a una amplia gama de procesos como la inactivación microbiana (Kim et al., 2017), la cocción (Aamir & Jittanit, 2017) o la destilación (Gavahian et al., 2016 a, b). Se ha utilizado una amplia gama de intensidades de campo eléctrico en estudios de calentamiento óhmico. En cuanto a la frecuencia, se prefieren las más altas (> 100 Hz) ya que, generalmente, frecuencias bajas (< 60 Hz) aumentan la velocidad de corrosión de los electrodos y las reacciones de electrólisis (Gavahian & Farahnaky, 2018; Ramaswamy et al., 2014).

Sin embargo, más allá de los procesos de calentamiento, Sastry et al. (2002) y Lebovka et al. (2007) establecieron el término MEF como un proceso de permeabilización controlada, posiblemente reversible, caracterizado por el uso de campos eléctricos ($E < 100$ V/cm), con o sin presencia de efectos de calentamiento óhmico. Al aplicar un voltaje apropiado a través de una celda (es decir, el potencial de ruptura), la permeabilidad celular aumenta debido a la ruptura eléctrica localizada de la membrana (Jaeschke et al., 2017; Sensoy & Sastry, 2004) produciendo el fenómeno conocido como electroporación. Esto puede intensificar los fenómenos de transferencia de materia intracelular, es decir, la extracción de compuestos intracelulares o la infusión de compuestos externos, independientemente del efecto producido por la elevación de la temperatura del material. En otras palabras, los MEF se pueden aplicar para trabajar a altas temperaturas (es decir, calentamiento óhmico) o bajas temperaturas. En este último caso, se debe controlar la temperatura para minimizar los efectos térmicos (Saberian et al., 2017).

1.3.2.3 Parámetros que influyen en el proceso de extracción con campo eléctrico.

Durante la aplicación de campos eléctricos existen diferentes parámetros del campo eléctrico aplicado y parámetros característicos del propio alimento que han de tenerse en cuenta a la hora de diseñar y definir el proceso ya que influyen significativamente en el mismo.

FACTORES TÉCNICOS DEL CAMPO ELÉCTRICO APLICADO.

INTENSIDAD DEL CAMPO ELÉCTRICO

La intensidad del campo eléctrico (E) se define como la diferencia de potencial eléctrico que existe entre los dos electrodos dividido por la distancia que hay entre ellos (Ecuación 1):

$$E = \frac{V}{d}$$

Ecuación 1.

Donde, E es la intensidad del campo eléctrico (V/cm); V la diferencia de potencial y d, la distancia entre los electrodos (cm). En aplicaciones de MEF se consideran intensidades inferiores a 1 kV/cm (Pereira et al., 2019).

FRECUENCIA

Los MEF se caracterizan por utilizar corriente alterna y su frecuencia se define como el número de veces que la corriente cambia de sentido (ciclos por segundo) (Martínez-Zorrilla, 2008). En aplicaciones de calentamiento, las frecuencias utilizadas suelen ser bajas, siendo las más comunes entre 50 y 60 Hz (Varghese et al., 2014). Sin embargo, se pueden aplicar frecuencias más elevadas llegando incluso hasta valores de 1200 Hz o superiores. El uso de frecuencias altas permite limitar la electrólisis en los electrodos, aunque limita el efecto de electroporación.

TEMPERATURA

Ante cualquier tratamiento con campos eléctricos se genera un incremento de temperatura en el medio que puede llegar a ser muy importante. Sin embargo, la temperatura del medio también influye en el tratamiento, pues afecta a la estabilidad de las membranas (Martín Municio, 2018). En MEF el aumento de temperatura se produce debido al efecto del calentamiento óhmico. Además, la temperatura suele tener un efecto lineal sobre la conductividad eléctrica del producto (Gutiérrez, 2018).

FACTORES INTRÍNECOS DE LOS PRODUCTOS TRATADOS

CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

La conductividad eléctrica (σ) del producto es el principal parámetro que afecta a la efectividad de los tratamientos con campos eléctricos (Rivas Soler, 2012). Dicha conductividad eléctrica

viene determinada por características de los alimentos, como la composición química, el estado físico y la temperatura (Gavahian et al., 2019). Así, un tratamiento eléctrico será más efectivo en alimentos que contienen la suficiente cantidad de agua y electrolitos, y por lo tanto una mayor conductividad, que permita el paso de la corriente eléctrica (Knirsch et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos general

El objetivo principal del presente trabajo fue determinar la influencia de la aplicación de campos eléctricos moderados en el proceso de extracción de oleuropeína a partir de hojas de olivo.

2.2 Objetivos específicos

Para lograr este objetivo se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Identificar y cuantificar la influencia de la proporción entre hoja de olivo y disolvente en la cinética y en el rendimiento de extracción de oleuropeína.
- Determinar y cuantificar la influencia de la aplicación de un campo eléctrico moderado (MEF) en la cinética y en el rendimiento de extracción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima y preparación de la muestra

Como materia prima de estudio, se utilizó hoja de olivo (*Olea europea* var. *Sativa*) deshidratada y molida proporcionada por la empresa Iff-Murcia-Natural Ingredients S.L., la cual aseguró la homogeneidad de la muestra (tamaño de partícula inferior a 0,25 mm). Nada más recibir el material, se envasó en bolsas herméticas a vacío y se almacenó a temperatura ambiente en recipientes opacos hasta el momento de realizar las experiencias de extracción con el objetivo de minimizar la degradación de compuestos de interés tanto por oxidación como por la luz.

3.2 Determinación de la humedad

La determinación del contenido de humedad de las muestras se realizó según el procedimiento de la AOAC número 934.01 (AOAC, 1997). Para ello se colocaron aproximadamente 3 g de hoja de olivo molida en un pesasustancias. Éste se introdujo en una estufa de secado por aire caliente a 60 °C hasta alcanzar peso constante (al menos 48 h). El contenido en humedad se determinó por diferencia de peso utilizando una balanza analítica (Bel Engineering modelo M214A1). El procedimiento se replicó 10 veces para asegurar la significación del resultado obtenido.

3.3 Determinación de la conductividad

La conductividad eléctrica es un parámetro clave en los procesos MEF y se ve influenciada por las características del producto, incluida la temperatura, la fuerza iónica, el agua libre, la composición química, tamaño y forma de las partículas. Además, las variaciones en la estructura del producto, como los cambios de fase, la ruptura celular, la contracción del tejido y los cambios en la permeabilidad de la membrana, también pueden alterar la conductividad eléctrica de un producto (Ramaswamy et al., 2014). Por eso resulta imprescindible su caracterización para este tipo de procesos.

Para la determinación de la conductividad eléctrica de las muestras, se prepararon diferentes suspensiones de hoja de olivo en agua destilada al 1%, 5%, 10% y 15% (peso/volumen). Para variar la temperatura de las suspensiones, se empleó una placa calefactora (modelo Stuart Scientific SM1). Además, se introdujo un agitador magnético en el interior del recipiente para homogenizar la temperatura de la disolución. La temperatura de la mezcla se registró en todo momento empleando un termómetro de precisión. Las medidas de la conductividad eléctrica se obtuvieron cada 5 °C ± 1°C en el rango de 25 a 52 °C con un conductímetro de sobremesa con brazo articulado y sensor de temperatura integrado XS COND 50 VIOLAB (G-COND51-3, 5BN00).

3.4 Equipo de aplicación MEF y sistema de control de la temperatura. Descripción del sistema experimental.

La configuración experimental utilizada para llevar a cabo los experimentos de extracción con aplicación MEF fue construida por el grupo ASPA en la Universitat Politècnica de València (Figura 1). El corazón de la misma la constituye la celda de extracción (Figura 1B) que consiste en un paralelepípedo de dimensiones internas de 25 x 8 x 12,5 cm construido en teflón. A ambos lados de la celda se encuentran dos electrodos de 8 x 14 cm de titanio que se encuentran separados 24,4 cm. Estos electrodos están conectados a una fuente de potencia programable (Programmable AC Power Source 9830 Series) que permite generar el MEF en las condiciones deseadas de voltaje y frecuencia. Además, la celda está colocada sobre un agitador magnético (modelo Stuart Scientific SM1) que permite agitar la muestra y mantenerla uniforme durante las extracciones.

Las experiencias de extracción se realizaron a una temperatura controlada de 50 ± 1 °C y durante un tiempo máximo de 90 min. Para ello, la temperatura en la celda de extracción se monitorizó durante todo el proceso de extracción mediante una sonda de platino (Pt100). Dicha sonda está conectada a un datalogger (34970A Data Acquisition/Switch Unit) provisto de una tarjeta de entradas analógicas configuradas para las sondas de temperatura Pt100 y cuya lectura se muestra en un monitor (Figura 1A). El contenido de la celda de extracción (suspensión de hoja de olivo y disolvente) se bombea mediante una bomba peristáltica de tres rodillos (Watson Marlow) a través de un tubo de silicona de 6 mm en el diámetro interior y 8 mm en el diámetro exterior. Este tubo está inmerso en forma de serpentín en un baño con una disolución de etilenglicol al 20% (v/v). En el mismo, se dispone de un agitador fuera-borda (JP Selecta™ 3473100) con capacidad de calentamiento y de una unidad enfriadora (JP Selecta™ FRIGEDOR 3000778) de 220W. De esta manera, el baño permitió calentar la mezcla de extracción durante las experiencias realizadas sin aplicación de MEF, y enfriarlas cuando se aplicaron MEF. En el caso de las experiencias con aplicación de MEF, éste se aplicó de forma continuada durante los 90 min que se ensayaron las extracciones.

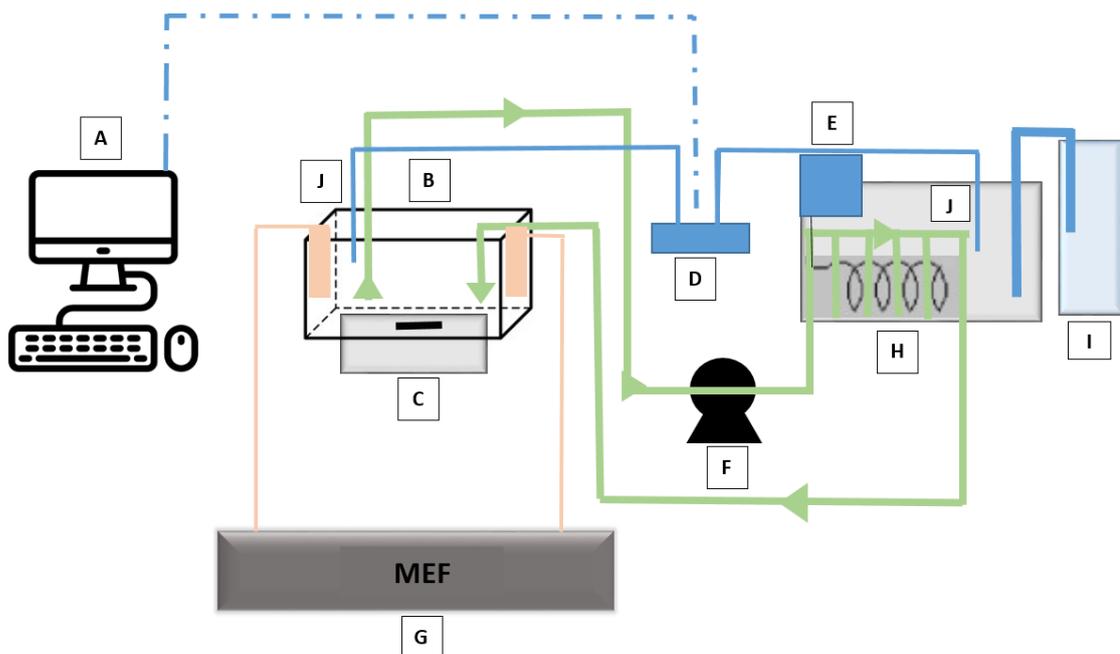


Figura 1. Montaje experimental para las experiencias extracción con aplicación MEF.

A: ordenador; B: celda de extracción; C: agitador magnético; D: Dataloger para el registro de temperatura; E: agitador fuera-borda; F: bomba peristáltica de tres rodillos; G: fuente de potencia programable (MEF); H: baño; I: unidad de enfriamiento; J: Sondas Pt100 para el control de temperatura.

3.5 Puesta a punto del método de extracción

El equipo de aplicación MEF utilizado para la experimentación es un equipo nuevo, desarrollado y construido por el grupo ASPA en la Universitat Politècnica de València. Esta es la primera vez que se utiliza este equipo por lo que antes de abordar la experimentación propiamente dicha, fue necesario realizar un intenso trabajo de puesta a punto. Esta puesta a punto incluyó la realización de numerosas pruebas relacionadas con el sistema de recirculación para el control de la temperatura. Así, se realizaron numerosas pruebas para la determinación del diámetro y longitud de la conducción de re-circulación que permitiera el control de temperatura pero que evitara la obturación del sistema de bombeo por las características de las suspensiones. También, fueron necesarias un número importante de pruebas para establecer las condiciones de calentamiento/enfriamiento necesarias en las diferentes condiciones ensayadas. Otro punto importante lo constituyen los trabajos de homogeneización de las mezclas de hoja de olivo y disolvente y su mantenimiento en suspensión durante la extracción. Por último, es de destacar la puesta a punto del sistema de toma de muestra y de medida del contenido de oleuropeína (filtrados previos, medidas de absorbancia, etc.).

3.6 Experiencias de extracción

El disolvente (medio de extracción) utilizado en todas las experiencias fue agua destilada. Las extracciones se realizaron a una temperatura controlada de 50 ± 1 °C tanto en las realizadas con aplicación de MEF como en las convencionales. Durante las mismas, la suspensión de hoja de olivo y disolvente se mantuvo agitada gracias a la recirculación de la misma a través del baño termostatado, necesaria para el mantenimiento de la temperatura, como por la acción del agitador magnético sobre el que se colocó la celda de tratamiento.

3.6.1 Experiencias de extracción convencional

En lo que respecta a la extracción convencional, se realizaron experiencias en la celda del equipo descrito en el apartado 3.4, colocada sobre un agitador magnético para mantener homogénea la disolución. En este caso, para mantener la temperatura de extracción constante a 50 °C, se utilizó el sistema de calefacción del fuera-borda del baño. De esta manera, manteniendo la solución de etilenglicol a una temperatura en torno a 70 °C (dependiendo de cada experiencia), se consiguió tener en la celda de extracción una temperatura de 50 ± 1 °C.

Se ensayaron las siguientes proporciones peso/volumen de hoja de olivo y agua destilada (en adelante carga másica): 10, 50, 100 y 150 g en 1 L de agua destilada (1, 5, 10, 15% p/v respectivamente). El seguimiento de la cinética de la extracción se realizó tomando muestras con una pipeta Pasteur a tiempos preestablecidos (2, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos).

3.6.2 Experiencias de extracción MEF

Para las experiencias realizadas con aplicación de MEF, se colocaron dos electrodos de titanio a cada lado de la celda de extracción y se conectaron al equipo Programmable AC Power Source 9830 Series. Las experiencias se realizaron con un voltaje de 300 V y una frecuencia de 1200 Hz. Al igual que en las extracciones convencionales, la celda se situó sobre un agitador magnético (modelo Stuart Scientific SM1) para mantener en suspensión la mezcla hoja de olivo-disolvente durante todo el proceso. En este caso, dada la generación de calor que supone la aplicación de MEF, la temperatura de la celda de extracción se mantuvo a 50 ± 1 °C gracias a la unidad enfriadora conectada al baño auxiliar. En este caso, la temperatura de la solución de etilenglicol del baño se mantuvo en torno a 35-37 °C dependiendo de las experiencias.

Las cargas másicas ensayadas fueron las mismas que las establecidas en la extracción convencional: 1%, 5%, 10% y 15%. Igualmente, para el seguimiento de las cinéticas de extracción se tomaron muestras con una pipeta Pasteur a los tiempos preestablecidos (2, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos). Para ello, cada vez que se tomó una muestra, se desconectó el sistema de aplicación de MEF gracias al sistema de seguridad del equipo diseñado al efecto.

3.7 Seguimiento de la extracción

Las muestras tomadas de la celda en los tiempos establecidos se filtraron inmediatamente utilizando un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) hidrofóbico de 0,45 micrometros de tamaño de poro. El filtrado se depositó en tubos Eppendorfs cubiertos con papel de aluminio para evitar la incidencia de la luz. Se realizó una dilución de 1:100 en un matraz aforado de 100 ml y se homogeneizó en un agitador vórtex (Agitador de laboratorio VWR Vortex Mixer) durante 1 min. Inmediatamente después, se realizaron medidas de la absorbancia a 270 nm utilizando un espectrofotómetro Spectronic Helios Alpha Beta UV-Visible. Para evitar la interacción de la cubeta con la muestra, se utilizaron cubetas de cuarzo Hellma 101-QS 3500µl Macro Fluorescence Cell, 10 x 10 mm Light Path PN 101-10-40.

Previamente, se realizó una curva de calibrado utilizando disoluciones de concentración conocida de un extracto de oleuropeína comercial (Olive leave extract 20% HPLC, Iff Murcia Natural Ingredients). El resultado se expresó en mg de oleuropeína/g materia seca de hoja de olivo.

3.8 Modelado de cinética de extracción

El seguimiento del contenido de oleuropeína de los extractos durante la extracción permitió evaluar la cinética de extracción de una manera cualitativa. Para la cuantificación de la influencia de las variables estudiadas en el proceso de extracción de oleuropeína, se recurrió a la modelización de los datos obtenidos experimentalmente. Para ello, se recurrió al modelo de Naik (Ecuación 2):

$$Y = \frac{(Y_{\infty} \cdot t)}{(B + t)}$$

Ecuación 2.

Donde Y representa el rendimiento de extracción (mg de oleuropeína/g de materia seca de hojas de olivo), t (min) el tiempo de extracción, Y_{∞} el rendimiento de extracción en equilibrio y B (min) el tiempo de extracción necesario para alcanzar la mitad de Y_{∞} (Ahmad-Qasem et al., 2013). Para identificar los parámetros del modelo (Y_{∞} y B), se utilizó la herramienta Solver de Excel™ (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EE. UU.). Para ello, se definió un problema de optimización de manera que los valores de los parámetros a identificar fueran aquellos que minimizan la suma de las diferencias al cuadrado entre los datos de Y experimental y los calculados con el modelo. Para determinar la bondad del ajuste se estimó el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}) y el error cuadrático medio (RMSD) dado por la Ecuación 3 y 4, respectivamente (Polachini et al., 2019):

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{N - 1}{N - (k + 1)} (1 - R^2)$$

Ecuación 3.

$$MRE = \left(\frac{100}{N} \right) \sum_{i=1}^n (|Y_{EXPi} - Y_{CALi}| / Y_{EXPi})$$

Ecuación 4.

Donde N es el número de datos tomados de la extracción, k es el número de parámetros en el modelo (excluyendo la constante), R^2 es el coeficiente de determinación, Y_{CALi} es el valor predicho e Y_{EXPi} es el valor experimental.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Humedad de la muestra de hoja de olivo

La operación de extracción de compuestos de interés suele requerir de un proceso de secado previo de la materia prima, tanto para estabilizarla y poder almacenarla hasta su procesado, como para evitar la interferencia del agua en la extracción. Este proceso de secado puede influir no solo en el perfil y concentración de antioxidantes sino también en la estructura del material. Como consecuencia, el secado puede afectar tanto a la cinética como al rendimiento del proceso de extracción antioxidante (García-Pérez et al., 2010). Así, el secado inmediato de las hojas de olivo se considera una operación importante en el procesamiento poscosecha para evitar pérdidas de calidad y prevenir posibles degradaciones durante el almacenamiento. Además, reducir el contenido de humedad de las hojas evita cualquier interferencia del agua en la lixiviación de polifenoles (Soysal & Öztekin, 2001). Por otro lado, la descomposición de los componentes celulares durante el secado también podría facilitar la liberación de compuestos fenólicos unidos (Ahmad-Qasem et al, 2013). Es por todo esto que el secado de la materia prima se ha considerado un medio muy útil para incrementar la cantidad de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos.

Las hojas de olivo utilizadas en el presente trabajo fueron suministradas ya secas. Sin embargo, para caracterizar la muestra, antes de comenzar los ensayos de extracción, se determinó su contenido de humedad. El resultado obtenido fue de $0,053 \pm 0,001$ kg de agua/kg de materia seca. Este contenido de humedad se consideró adecuado para asegurar la estabilidad durante el almacenamiento y evitar la interferencia del agua durante la extracción (García-Pérez et al., 2010).

4.2 Conductividad eléctrica de las suspensiones hoja de olivo-disolvente

La conductividad eléctrica de las distintas suspensiones dependió de la proporción hoja de olivo/disolvente ensayada (carga másica) (Figura 2). Así, cuanto mayor fue la proporción de hoja de olivo, mayor resultó la conductividad medida. La hoja de olivo tiene numerosas sales minerales (Na, K,...) que pasan fácilmente al agua utilizada como disolvente. Esto hace que la conductividad eléctrica del disolvente sea mayor. Lo cual podría afectar a los procesos de extracción asistidos por MEF ya que un incremento importante de la conductividad del disolvente respecto al material puede hacer que la corriente eléctrica transcurra a través del mismo, en lugar de pasar a través de las células vegetales. De esta manera, se podría alterar el proceso de electroporación, y, por lo tanto, la difusión de oleuropeína a través de las membranas celulares. Sin embargo, otros estudios afirman que, con el aumento de la concentración, la trayectoria de la corriente eléctrica a través del fluido se vuelve más tortuosa, forzando un mayor porcentaje de la corriente a fluir a través del material vegetal. Esto puede producir un mayor efecto del MEF en las células, lo cual provocaría una mayor electroporación en las mismas (Darvishi et al., 2013; Sakr & Liu, 2014).

Por otro lado, se observó una clara influencia de la temperatura en la conductividad eléctrica (Figura 2). Así, a más temperatura, mayor fue la conductividad eléctrica registrada siendo esta relación prácticamente lineal (Figura 2). Además, se observó una relación entre la pendiente de esta relación y la proporción de hoja de olivo en la suspensión (Figura 3). Este incremento en el valor de las pendientes se traduce en un crecimiento de la conductividad a medida que crece la carga másica de la disolución de hoja de olivo y agua destilada.

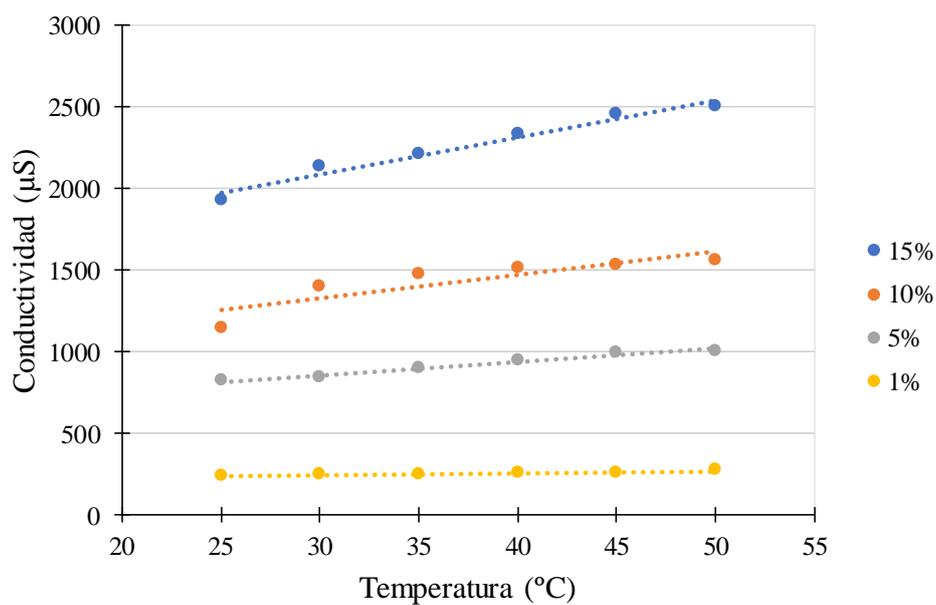


Figura 2. Evolución de la conductividad eléctrica con la temperatura en suspensiones con diferentes proporciones de hoja de olivo y agua destilada (% peso/volumen).

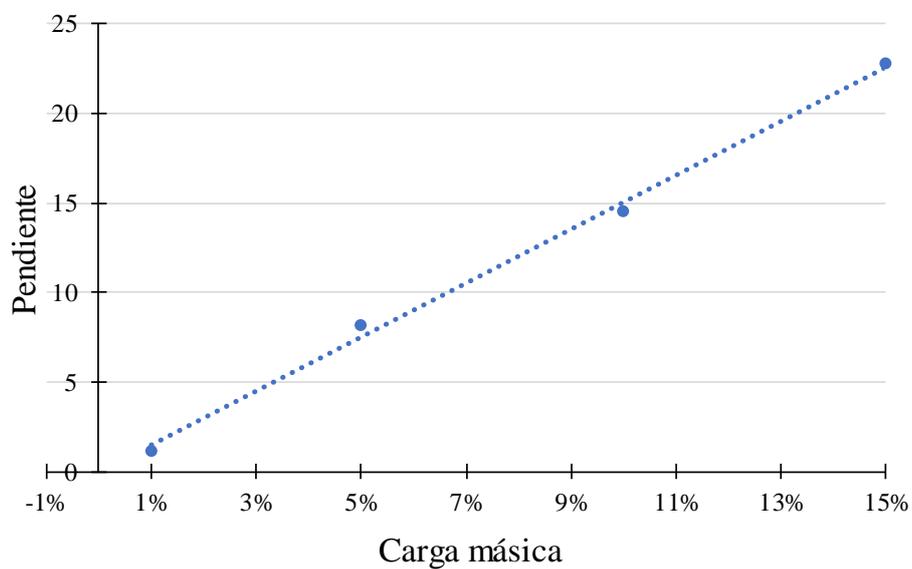


Figura 3. Aumento lineal de las pendientes de la relación lineal entre conductividad eléctrica y proporción de hoja de olivo-disolvente a medida que aumenta la temperatura de dichas suspensiones.

4.3 Efecto de la carga másica en la cinética de extracción convencional

La carga másica es uno de los principales factores que pueden influir en un proceso de extracción debido a que una relación soluto/disolvente pequeña favorece la lixiviación del compuesto de interés hacia el solvente (De Leon Serna, 2021). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron esta influencia. Así, en las experiencias de extracción convencional realizadas, la cantidad de oleuropeína extraída por unidad de masa de hoja de olivo inicial fue mayor en las pruebas realizadas con las cargas másicas ensayadas más bajas, 1 y 5%, que en las más altas, 10 y 15% (Figura 3). Esto se podría atribuir a la menor capacidad de una misma cantidad de disolvente para actuar sobre una mayor cantidad de hoja de olivo. Además, las cantidades elevadas de sólidos podrían generar canales de flujo preferencial y zonas de fuera de juego, promoviendo una disminución en el contacto de la superficie entre el sólido y el líquido y, por lo tanto, disminuyendo la transferencia de masa. Estos resultados coinciden con los observados por Pinelo et al. (2005) en el caso de la extracción de compuestos fenólicos a partir de subproductos de vinificación. Estos autores obtuvieron una mayor cantidad extraída cuando utilizaron bajas relaciones de muestra-disolvente. Otros autores también han observado altos rendimientos en la extracción de polifenoles de material vegetal con relaciones líquido/sólido de 80 a 100 mL/g (Cacace & Mazza, 2003; Casazza et al., 2012). Se debe tener en cuenta que cuando la cantidad de fase líquida comparada con la de la fase dispersa no es suficiente para obtener una transferencia adecuada, pueden tener lugar varios equilibrios que conducen a una resistencia a la transferencia de masa. Por lo tanto, es crucial tener una relación soluto/disolvente bien definida para lograr una mezcla suficiente y, por lo tanto, una alta tasa de difusión del soluto durante el proceso de extracción (Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2010), para lograr el máximo rendimiento de extracción.

Por otro lado, en la cinética de extracción de oleuropeína utilizando el método convencional se identificaron dos fases. En la primera, la cantidad extraída aumentó hasta llegar a un máximo. A partir de aquí, se observó una tendencia de la curva hacia un valor asintótico o incluso decreciente (Figura 3). Estas fases suelen estar presentes en procesos de extracción continuos. Así, Ferreira et al. (1999) observaron de una tendencia similar en la extracción de aceite esencial de pimienta negra (*Pipiper nigrum L.*).

La tendencia de la segunda fase de la cinética de extracción se relacionó con la carga másica utilizada durante la misma. Las extracciones realizadas con las cargas másicas más elevadas, 10 y 15%, presentaron una tendencia más asintótica. Por el contrario, en las realizadas con cargas másicas más bajas, se observó una tendencia decreciente (Figura 3). Una mayor concentración de hoja de olivo en la disolución podría proteger a la oleuropeína de su transformación en otros compuestos, su hidrólisis a hidroxitirosol o incluso su oxidación. Esto supuso que, en estos casos, la cantidad de oleuropeína se mantuvo prácticamente constante hacia el final de la extracción (Figura 3). Sin embargo, en las concentraciones más bajas (1% y 5%), la oleuropeína extraída podría estar más expuesta a la degradación y transformación en su principal metabolito, el hidroxitirosol. Sin embargo, es cierto que las vías de biosíntesis y degradación de los secoiridoides, como la oleuropeína, todavía no se comprenden completamente (Obied et al., 2008). Además, algún tipo de degradación relacionada con la temperatura empleada y el contacto con el O₂ del aire podría ser también la causa de la disminución de la cantidad de fenoles en el extracto (Rodríguez-Meizoso et al., 2006). Por otro lado, a medida que pasa el tiempo de extracción, también se extraen otros compuestos presentes en la hoja de olivo. Esto podría causar el bloqueo de la absorción de oleuropeína a la longitud de onda utilizada en el presente trabajo (270 nm). En estudios como el de Pinelo et al. (2005) se demostró que en el caso particular de la extracción de fenoles de subproductos de *Vitis Vinifera* se observó la formación de polímeros fenólicos durante etapas avanzadas de extracción. Por este motivo, la elección de las condiciones

de extracción debe ir precedidas de estudios previos sobre la reactividad de las especies sometidas a caracterización.

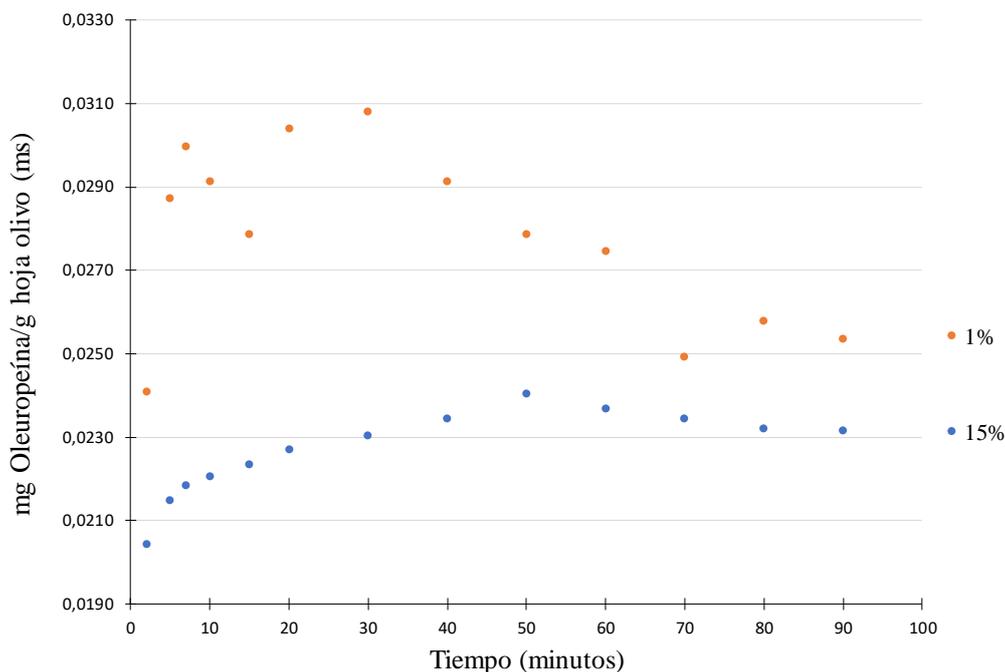


Figura 3: Evolución de la cantidad de oleuropeína (mg de oleuropeína/g hoja de olivo (ms)) extraída a medida que pasa el tiempo de extracción utilizando un método de extracción convencional. Cargas máxicas de 1 y 15% (peso/volumen) de hoja de olivo en agua destilada.

El tiempo al cual apareció el máximo contenido de oleuropeína extraído también dependió de la carga máxica. En el caso de las experiencias realizadas con contenidos de 1 y 5% de hoja de olivo, alcanzaron su máximo de extracción a los 30 minutos (Tabla 3). En cuanto a las realizadas con contenidos superiores, 10% y 15%, alcanzaron su máximo de extracción en torno a los 40-50 minutos a partir del comienzo de la extracción. Es por ello que no tendría sentido prolongar las extracciones más de 30-40 minutos, dependiendo de la carga máxica. Además, un prolongamiento excesivo del tiempo de extracción podría incrementar las reacciones de degradación y oxidación de los compuestos extraídos, en este caso de la oleuropeína, disminuyendo así la calidad del extracto obtenido.

4.5 Experiencias de extracción con aplicación de MEF

Las cinéticas de extracción de oleuropeína con aplicación de MEF presentaron una forma similar a las descritas anteriormente en el caso de las extracciones convencionales. Es decir, el contenido extraído aumentó rápidamente al principio de la extracción hasta alcanzar un máximo a partir del cual la cantidad de oleuropeína extraída disminuyó más o menos ligeramente (Figura 4). Como se ha comentado en el apartado anterior, este descenso podría ser provocado por la transformación de la oleuropeína en otros metabolitos (como el hidroxitirosol) o por el bloqueo de la absorción del extracto a la longitud de onda utilizada en los análisis por la presencia de otros compuestos que se extraen de forma simultánea. Al igual que en las extracciones convencionales, en las extracciones realizadas con cargas másicas pequeñas (1% y 5%), esta disminución fue mayor que en las extracciones realizadas con mayores cargas másicas (10% y 15%) (Figura 4). Esto podría atribuirse a que una mayor cantidad de hoja de olivo protegería a la oleuropeína de su propia degradación y oxidación. En lo respectivo al tiempo de extracción en el que se consiguió la máxima cantidad de oleuropeína, fue similar en las experiencias con aplicación de MEF que en las extracciones convencionales (Tabla 2). En cuanto a la influencia de la carga másica utilizada, al igual que en las extracciones convencionales, se observó una mayor cantidad de oleuropeína extraída por unidad de masa de hoja de olivo en las experiencias realizadas a bajas cargas másicas que a altas cargas másicas (Figura 4). Al igual que antes, una mayor proporción de disolvente respecto al material tratado favorece la transferencia de materia y, por lo tanto, la extracción de compuestos de la matriz sólida.

Por otro lado, la cantidad de oleuropeína extraída fue superior en las extracciones con aplicación de MEF que en las extracciones convenciones en todas las cargas másicas utilizadas, como se puede observar en las Figura 5. Esto podría estar relacionado con posibles efectos de los MEF sobre la estructura. Así, Kumari et al. (2016) identificaron el efecto positivo de la aplicación de un pre-tratamiento con MEF en la extracción de aceite de semillas de sésamo obteniendo un incremento del rendimiento de un 26%. Por otro lado, Lakkakula et al. (2004) obtuvieron un resultado similar en la recuperación de aceite de salvado de arroz.

El efecto de la aplicación de MEF fue mayor en las extracciones realizadas con cargas másicas más bajas, 1% y 5%. Por el contrario, en las extracciones realizadas con cargas de 10 y 15% (p/v), el incremento de la cantidad de oleuropeína extraída debido a la aplicación del MEF fue menor (Figura 5). Como se ha visto en el apartado 4.2, la conductividad eléctrica fue mayor en las suspensiones de mayor carga másica, lo que podría ser causado por la mayor migración de sales (Na, K...) al agua de extracción debido al mayor contenido de hoja de olivo. Esto podría facilitar el paso de la corriente eléctrica a través del disolvente en lugar de atravesar el material vegetal, lo que podría disminuir el efecto de electroporación en las células, y, por lo tanto, reducir la cantidad de oleuropeína extraída. Otra causa podría ser que cantidades elevadas de sólidos podrían generar zonas de fuera de juego dificultando el efecto del MEF en todo el material vegetal y posiblemente como consecuencia disminuiría la lixiviación de oleuropeína.

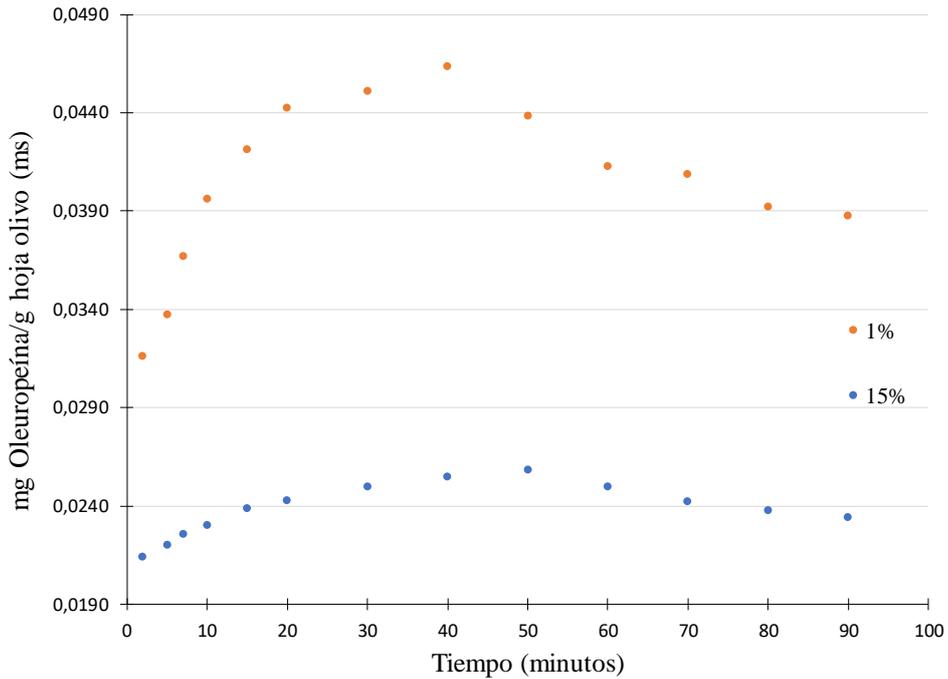


Figura 4: Cinéticas de extracción con aplicación MEF de hoja de olivo con agua a cargas másicas de 1 y 15% peso/volumen). Evolución de la cantidad de oleuropeína (mg de oleuropeína/g hoja de olivo (ms)) en el extracto a medida que pasa el tiempo de extracción.

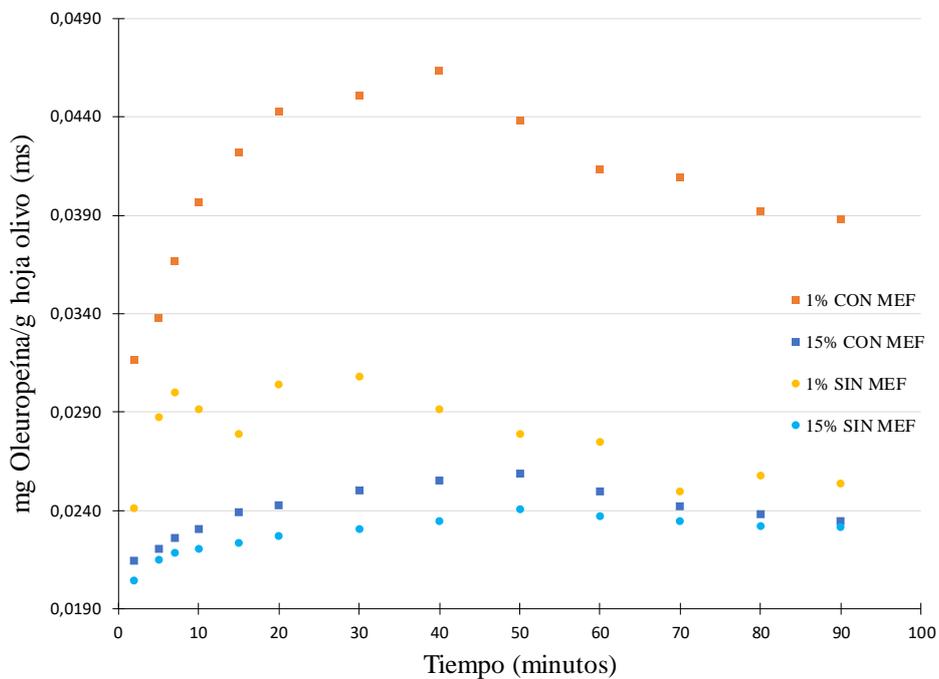


Figura 5: Comparación de la evolución de la cantidad de oleuropeína extraída (mg de oleuropeína/g hoja de olivo (ms)) con el tiempo de extracción. Cargas másicas de 1 y 15% (peso/volumen) de hoja de olivo en agua destilada y extracciones realizada sin y con aplicación MEF.

Tabla 2: Tiempo (min) en el cual se obtuvo la máxima cantidad de oleuropeína extraída en experiencias realizadas con y sin con aplicación MEF a diferentes cargas másicas (% peso/volumen) de hoja de olivo y agua destilada.

Carga másica (g hoja olivo/1L agua destilada)	Tiempo en el que la cantidad de oleuropeína extraída es máxima en la extracción convencional (min.)	Tiempo en el que la cantidad de oleuropeína extraída es máxima en la extracción con aplicación MEF (min.)
1	30	40
5	30	30
10	40	50
15	50	50

4.6 Modelización de las cinéticas de extracción

Los datos experimentales obtenidos de cada extracción realizada a las diferentes cargas másicas (1, 5, 10 y 15%) y siguiendo el método de extracción convencional o extracción con aplicación de MEF se ajustaron al modelo de Naik para cuantificar la influencia de la carga másica y la aplicación de MEF en la extracción. Solo se ajustaron los valores de oleuropeína extraída hasta alcanzar el máximo valor de la misma. Los parámetros del modelo identificados en cada condición se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros cinéticos del modelo de Naik para las diferentes condiciones de extracción: Cargas másicas de 1, 5, 10 y 15%; y extracción convencional o con aplicación de MEF.

	Carga másica							
	1%		5%		10%		15%	
	Sin MEF	Con MEF	Sin MEF	Con MEF	Sin MEF	Con MEF	Sin MEF	Con MEF
Y_{∞}	0,031	0,046	0,038	0,042	0,028	0,030	0,023	0,025
B	0,512	1,232	0,299	0,176	0,409	0,575	0,325	0,440
R^2_{adj}	0,688	0,729	0,635	0,696	0,837	0,807	0,729	0,621
MRE (%)	2,05	2,32	1,32	0,57	1,39	1,54	1,35	2,10

En general, el modelo de Naik se ajustó relativamente bien a los datos experimentales. Los valores del coeficiente de determinación (R^2_{adj}) obtenidos fueron modestos, no alcanzado el valor de 0,90. Esto es una muestra de la gran variabilidad en los datos obtenidos. Sin embargo, el error relativo medio (MRE) se situó en torno al 2%, un valor relativamente bajo, que indica una buena calidad del ajuste. Además, las cinéticas experimentales y las calculadas con el modelo presentaron una tendencia similar en todas las condiciones estudiadas (Figura 6 y 7) y similares a las obtenidas en otros estudios de extracción de compuestos de interés a partir de hoja de olivo (Ahmad-Qasem et al., 2013).

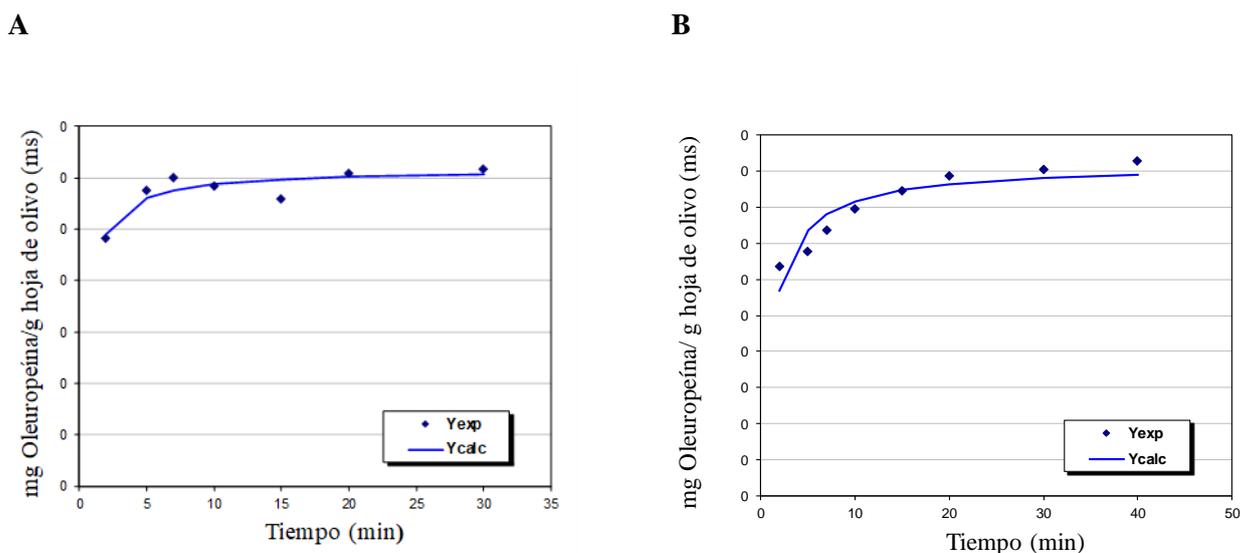


Figura 6: Ajuste al modelo de Naik a la cinéticas de extracción experimental de oleuropeína con carga másica del 1% (peso/volumen) de hoja de olivo y agua destilado, sin (A) y con aplicación MEF (B).

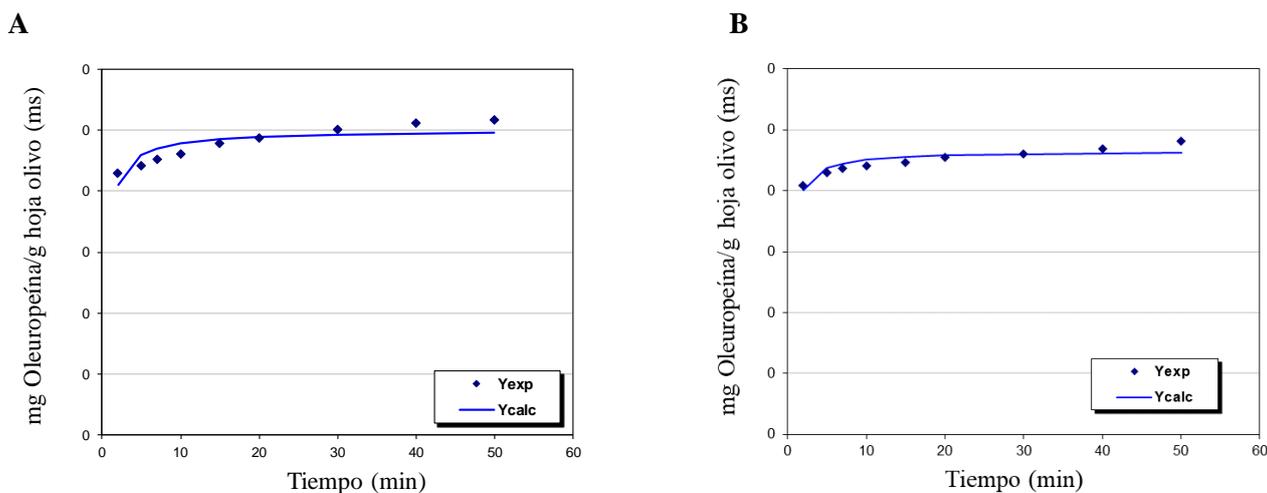


Figura 7: Ajuste al modelo de Naik a la cinéticas de extracción experimental de oleuropeína con carga másica del 15% (peso/volumen) de hoja de olivo y agua destilado, sin (A) y con aplicación MEF (B).

En lo que respecta a los parámetros del modelo, en las experiencias de extracción convencional, la cantidad de oleuropeína extraída en el equilibrio (Y_{∞}) fue mayor en las experiencias realizadas con una menor carga másica (Figura 8). Por otro lado, el parámetro B disminuyó a medida que aumentó la carga másica (Figura 8). Este parámetro está relacionado con el tiempo necesario para extraer la mitad de Y_{∞} . Es decir, un aumento de la cantidad de hoja de olivo en el agua de extracción supuso un menor tiempo de extracción (min) necesario para alcanzar la mitad del rendimiento de la extracción en el equilibrio (Y_{∞}), que por otro lado fue menor. Estos parámetros muestran que la disminución de la carga másica aumentó el rendimiento de la extracción debido a que una mayor relación soluto/disolvente favorece el rendimiento de este tipo de operaciones en todos los casos. Por otro lado, un aumento de la carga másica implicaría un menor tiempo de extracción (min) para alcanzar el equilibrio ya que la cantidad extraída de oleuropeína es menor.

En cuanto a las extracciones realizadas con aplicación MEF, al igual que en la extracción convencional, el rendimiento de la extracción en el equilibrio (Y_{∞}) fue superior en las extracciones realizadas con una carga másica más pequeña (Figura 8). Es decir, se extrajo una mayor cantidad de oleuropeína cuando la relación soluto/disolvente fue mayor. En todos los casos, el valor de Y_{∞} identificado fue superior en las experiencias en las que se aplicaron MEF. Por lo tanto, los MEF contribuyeron a la mejora de rendimiento del proceso de extracción. Sin embargo, la mejora del rendimiento de la extracción fue superior en experiencias realizadas con cargas másicas pequeñas que con grandes. Como se ha comentado antes, esto podría deberse a que el aumento de la cantidad de hoja olivo en la disolución hace que sales (K, Na...) pasen al agua destilada aumentando la conductividad de la misma. Esto podría provocar que la corriente eléctrica procedente de la aplicación de los campos eléctricos moderados se transmita mejor por la fase líquida que a través del material vegetal lo cual podría reducir el fenómeno de electroporación de las células de hoja de olivo.

Por otro lado, el parámetro B, al igual que en la extracción convencional, disminuyó con el incremento de la carga másica (Figura 9). Esto implica que un aumento de la carga másica supone una reducción del tiempo (min) necesario para alcanzar la mitad del rendimiento de extracción en el equilibrio (Y_{∞}) debido a que se extrae una menor cantidad de oleuropeína. Los valores identificados de B también fueron superiores en las extracciones con aplicación de MEF que en las extracciones convencionales (Figura 9). Es decir, el tiempo de extracción (min.) necesario para alcanzar la mitad del rendimiento en el equilibrio también fue superior en las extracciones con aplicación MEF, esto puede deberse a que la cantidad de oleuropeína extraída también fue. Sakulchuthathip et al., (2017) encontraron que la aplicación de tratamiento óhmico redujo el tiempo de extracción de 180 minutos a 45 minutos en la extracción de compuestos bioactivos de cebollino chino (75% de reducción) respecto a una hidrodestilación. El rendimiento de extracción obtenido de ambos métodos fue similar. Loypimai et al. (2015) también afirmaron que el tratamiento óhmico puede ayudar a la extracción por solvente de antocianinas del salvado de arroz ceroso negro para preparar polvo colorante natural.

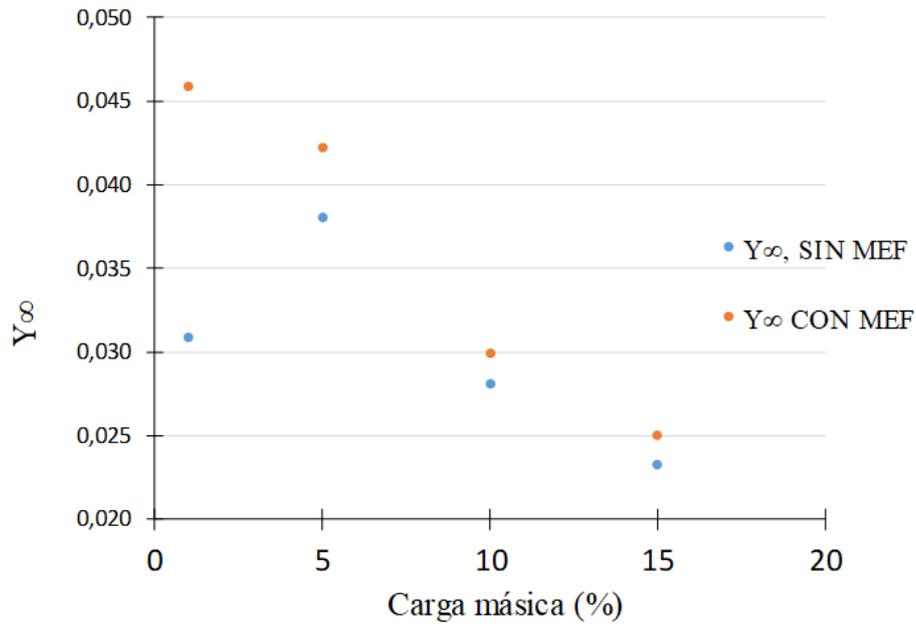


Figura 8: Rendimiento de extracción en el equilibrio (Y_{∞}) identificado con el modelo de Naik para las cinéticas de extracción en experiencias realizadas sin y con aplicación de MEF a diferentes cargas másicas de hoja de olivo y agua destilada (% peso/volumen)

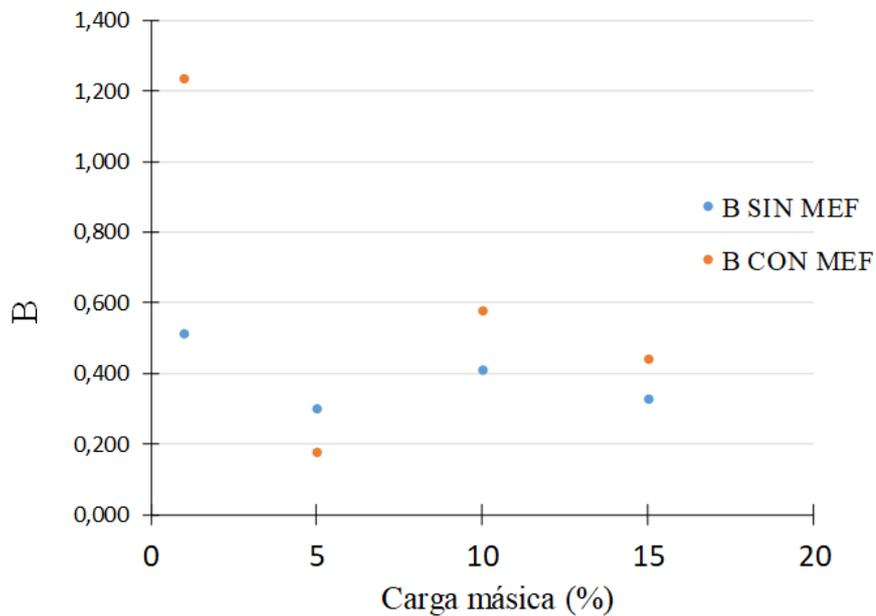


Figura 9: Evolución del parámetro B del modelo de Naik para las cinéticas de extracción en experiencias realizadas sin y con aplicación de MEF a diferentes cargas másicas de hoja de olivo y agua destilada (% peso/volumen).

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mostraron que el aumento de la carga másica (proporción de hoja de olivo/agua de extracción) disminuyó el rendimiento de extracción de oleuropeína. Además, se observó que existe un tiempo de extracción óptimo de 30-40 min en el cual se extrajo la máxima cantidad de oleuropeína por masa de hoja de olivo. El uso de mayores tiempos de extracción no solo no supuso la obtención de una mayor cantidad de oleuropeína si no que se observó una reducción, probablemente debida a proceso de oxidación o degradación de la misma. Esta reducción fue menos importante en extracciones realizadas con mayores cargas másicas, posiblemente por un efecto protector de la misma.

La aplicación de campos eléctricos moderados (MEF) supuso un mayor rendimiento de la extracción en todas las condiciones estudiadas, pero especialmente en las experiencias realizadas con valores bajos de carga másica.

Este trabajo ha sido una primera aproximación a la aplicación de MEF en el proceso de extracción de oleuropeína a partir de hoja de olivo y abre un campo de investigación para determinar la influencia de las distintas variables de proceso en el mismo (frecuencia, voltaje, tiempo, temperatura...).

5. BIBLIOGRAFÍA

- AAMIR, M., & JITTANIT, W. (2017). Ohmic heating treatment for Gac aril oil extraction: Effects on extraction efficiency, physical properties and some bioactive compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 224-234.
- AHMAD-QASEM MATEO, M. H. (2016). Assessment of the influence of processing conditions on the antioxidant potential of extracts obtained from olive oil industry byproducts (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- AHMAD-QASEM, M. H.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V.; MULET, A. & GARCÍA-PÉREZ, J. V. (2013). Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International*, 50(1), 189-196.
- AHMAD-QASEM, M. H.; CÁNOVAS, J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V.; CÁRCEL, J. A. & GARCÍA-PÉREZ, J. V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 120-129.
- ALADEDUNYE, F. & MATTHÄUS, B. (2014). *Phenolic extracts from Sorbus aucuparia (L.) and Malus baccata (L.) berries: antioxidant activity and performance in rapeseed oil during frying and storage. Food chemistry*, 159, 273-281.
- AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1997). Official methods of analysis, Arlington, Virginia, EEUU.
- ARRIETA, L. S.; BERRADRE, M.; ORTEGA, J.; ORTEGA, J.; SULBARAN, B. & DE RODRIGUEZ, G. O. (2018). Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos en el extracto de orujo de uva variedad malvasía. *Revista Bases de la Ciencia. e-ISSN 2588-0764*, 3(3), 19-36.
- BALLARD, T. S., MALLIKARJUNAN, P., ZHOU, K., & O'KEEFE, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food chemistry*, 120(4), 1185-1192.
- BERMÚDEZ, FL; SARRIA, FA; GARCÍA, CC; LAGUNA, EH & ROGEL, YA (2004). La huella ecológica del cultivo del olivo en España y su aplicabilidad como indicador de agricultura sostenible. *Papeles de geografía*, (39), 141-155.

- CACACE, J. E., & MAZZA, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379-389.
- CASAZZA, A. A., ALIAKBARIAN, B., SANNITA, E., & PEREGO, P. (2012). High-pressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins. *International journal of food science & technology*, 47(2), 399-405.
- CAVADA, G. (2017). Estudio de la aplicación de campos eléctricos moderados como proceso de aceleración en el salado de salmón atlántico. Memoria de pregrado. Departamento de ingeniería química y ambiental. Universidad técnica Federico Santa María.
- COELHO, M. I.; PEREIRA, R. N. C.; TEIXEIRA, J. A. & PINTADO, M. E. (2017). Valorization of tomato wastes: influence of ohmic heating process on polyphenols extraction time. *Archives of Sociedad Internacional de Antioxidantes en Nutrición*, 37 -40.
- CONTINI, M. ; BACCELLONI, S. ; FRANGIPANE, M. T. ; MERENDINO, N. & MASSANTINI, R. (2012). Increasing espresso coffee brew antioxidant capacity using phenolic extract recovered from hazelnut skin waste. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 137-146.
- CORRALES, M.; GARCÍA, A. F.; BUTZ, P. & TAUSCHER, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 415-421.
- DARVISHI, H., KHOSTAGHAZA, M. H., & NAJAFI, G. (2013). Ohmic heating of pomegranate juice: Electrical conductivity and pH change. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12(2), 101-108.
- DE LEON SERNA, F. E (2021). Estudio de transporte de masa en la extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad de compuestos fenólicos en uva syrah (vitis vinífera). Tesis de máster. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- DUEÑAS ZURITA, J. A. (2017). Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de uva variedad quebranta (Ica, Perú) empleando técnicas convencionales y extracción asistida por ultrasonido. Tesis de máster. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.
- FERNANDEZ-LOPEZ, J.; ZHI, N.; ALESON-CARBONELL, L.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. & KURI, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat science*, 69(3), 371-380.

- GARCIA-PEREZ, J. V.; GARCÍA-ALVARADO, M. A.; CARCEL, J. A. & MULET, A. (2010). Extraction kinetics modeling of antioxidants from grape stalk (*Vitis vinifera* var. Bobal): Influence of drying conditions. *Journal of Food Engineering*, 101(1), 49-58.
- GAVAHIAN, M. & FARAHNAKY, A. (2018). Ohmic-assisted hydrodistillation technology: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 153-161.
- GAVAHIAN, M.; FARAHNAKY, A. & SASTRY, S. (2016). Ohmic-assisted hydrodistillation: A novel method for ethanol distillation. *Food and Bioprocess Technology*, 98, 44-49.
- GAVAHIAN, M.; TIWARI, B. K.; CHU, Y. H.; TING, Y. & FARAHNAKY, A. (2019). Food texture as affected by ohmic heating: Mechanisms involved, recent findings, benefits, and limitations. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 328-339.
- GHITESCU, R. E.; VOLF, I.; CARAUSU, C.; BÜHLMANN, A. M.; GILCA, I. A. & POPA, V. I. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics sonochemistry*, 22, 535-541.
- GORZYNIK-DEBICKA, M.; PRZYCHODZEN, P.; CAPPELLO, F.; KUBAN-JANKOWSKA, A.; MARINO GAMMAZZA, A.; KNAP, N. & GORSKA-PONIKOWSKA, M. (2018). Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 686.
- GUTIERREZ, F. F. V. (2018). Ohmic heater for extracting essential oils from aromatic plants. *Scientia et Technica*, 23(2), 160-167.
- HALOUI, E.; MARZOUK, B.; MARZOUK, Z.; BOURAOU, A. & FENINA, N. (2011). Hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves: Potent anti-inflammatory and analgesic activities. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(3-4), 128-133.
- HAN, S. K. & PARK, H. K. (2002). Accumulation of thiobarbituric acid-reactive substances in cured pork sausages treated with propolis extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(13), 1487-1489.
- HUANG, B.; HE, J.; BAN, X.; ZENG, H.; YAO, X & WANG, Y. (2011). Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. *Meat science*, 87(1), 46-53.

- JAESCHKE, D. P.; MERLO, E. A.; RECH, R.; MERCALI, G. D. & MARCZAK, L. D. (2017). Moderate electric field influence on carotenoids extraction time from *Heterochlorella luteoviridis*. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 11(11), 1.
- JAPÓN-LUJÁN, R., & LUQUE DE CASTRO, M. D. (2008). Liquid–liquid extraction for the enrichment of edible oils with phenols from olive leaf extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (7), 2505-2511.
- KAZAN, A.; KOYU, H.; TURU, I. C. & YESIL-CELIK TAS, O. (2014). Supercritical fluid extraction of *Prunus persica* leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 55-59.
- KIM, N. H.; RYANG, J. H.; LEE, B. S.; KIM, C. T. & RHEE, M. S. (2017). Continuous ohmic heating of commercially processed apple juice using five sequential electric fields results in rapid inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *International journal of food microbiology*, 246, 80-84.
- KNIRSCH, M. C.; DOS SANTOS, C. A.; DE OLIVEIRA SOARES, A. A. M. & PENNA, T. C. V. (2010). Ohmic heating—a review. *Trends in food science & technology*, 21(9), 436-441.
- KULSHRESTHA, S., & SASTRY, S. (2003). Frequency and voltage effects on enhanced diffusion during moderate electric field (MEF) treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(2), 189-194.
- KUMARI, K.; MUDGAL, V. D.; VISWASRAO, G. & SRIVASTAVA, H. (2016). Studies on the effect of ohmic heating on oil recovery and quality of sesame seeds. *Journal of food science and technology*, 53(4), 2009-2016.
- LAKKAKULA, N. R., LIMA, M., & WALKER, T. (2004). Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. *Bioresource technology*, 92(2), 157-161.
- LEBOVKA, N. I.; SHYNKARYK, M. V.; EL-BELGHITI, K.; BENJELLOUN, H. & VOROBIEV, E. (2007). Plasmolysis of sugarbeet: pulsed electric fields and thermal treatment. *Journal of food engineering*, 80 (2), 639-644.
- LOYPIMAI, P., MOONGNGARM, A., CHOTTANOM, P. Y MOONTREE, T. (2015). Extracción asistida por calentamiento óhmico de antocianinas del salvado de arroz negro

para preparar un colorante alimentario natural. *Ciencia alimentaria innovadora y tecnologías emergentes*, 27 102-110.

LUJÁN, R. J.; CAPOTE, F. P.; MARINAS, A. & DE CASTRO, M. D. L. (2008). Liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring for optimal selection of transitions to evaluate nutraceuticals from olive-tree materials. *Rapid Communications in Mass Spectrometry. An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 22 (6), 855-864.

MARTÍN MUNICIO, E. (2018). Aplicaciones de los pulsos eléctricos de alto voltaje para el procesado y conservación de alimentos. Universidad de Zaragoza.

MARTÍNEZ-ZORRILLA, D. (2008). Los sintetizadores. Una breve introducción. Universitat Oberta de Catalunya.

MOHDALY, A. A.; SMETANSKA, I.; RAMADAN, M. F.; SARHAN, M. A. & MAHMOUD, A. (2011). Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 952-959.

OBIED, H. K., PRENZLER, P. D., RYAN, D., SERVILI, M., TATICCHI, A., ESPOSTO, S., & ROBARDS, K. (2008). Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea*. *L. Natural product reports*, 25(6), 1167-1179.

OH, I. S.; OH, D. H.; CHO, Y. S.; KANG, K. S.; SHON, M. Y. & SEO, K. I. (2002). Effects of ethanol extract of propolis (EEP) on the storage of sausage. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 7(2), 35-39.

OLIVARES REBOLLEDO, J. I. (2018). Aplicación de campos eléctricos moderados y microperforación láser-CO2 para la aceleración del proceso de salado de salmón atlántico (*Salmo Salar*). Tesis de pregrado. Universidad Técnica Federico Santa María.

PAZ, S. (2020). Cultivo del olivo. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).

PEREIRA, RN.; VICENTE, AA & TEIXEIRA, JA (2019). Desarrollo / producción de estructuras de alimentos a través de procesos flexibles: el uso de campos eléctricos para permitir la fabricación de alimentos. *Manual de desarrollo de estructuras alimentarias*. 18, 422.

- PINELO, M., DEL FABBRO, P., MANZOCCO, L., NUÑEZ, MJ Y NICOLI, MC (2005). Optimización de la extracción continua de fenol de subproductos de *Vitis vinifera*. *Química de los alimentos*, 92(1), 109-117.
- POLACHINI, T.C., MULET, A, TELIS-ROMERO, J., & CARCEL, J. A. (2019). Influence of high-intensity ultrasound application on the kinetics of sugar release from acid suspensions of artichoke (*Cynara scolymus*) biomass. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 145, 107681.
- PRAPORSCIC, I.; LBOVKA, N. I.; GHNIMI, S. & VOROBIEV, E. (2006). Ohmically heated, enhanced expression of juice from apple and potato tissues. *Biosystems Engineering*, 93(2), 199-204.
- RAKOTONDRAMASY-RABESIAKA, L., HAVET, JL, PORTE, C. Y FAUDUET, H. (2010). Estimación de la tasa de transferencia y difusión efectiva durante el proceso de extracción de protopina de *Fumaria officinalis* L. *Tecnología de separación y purificación*, 76(2), 126-131.
- RAMASWAMY, H. S.; MARCOTTE, M.; SASTRY, S. & ABDELRAHIM, K. (EDS.). (2014). Ohmic heating in food processing. *CRC press*. 7(16), 177-182.
- RIBAS-AGUSTI, A.; GRATACÓS-CUBARSÍ, M.; SÁRRAGA, C.; GUÀRDIA, M. D.; GARCÍA-REGUEIRO, J. A. & CASTELLARI, M. (2014). Stability of phenolic compounds in dry fermented sausages added with cocoa and grape seed extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 329-336.
- RIERA, E.; GOLAS, Y.; BLANCO, A.; GALLEGRO, J. A.; BLASCO, M. & MULET, A. (2004). Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 11(3-4), 241-244.
- RIVAS SOLER, A. (2012). Aplicación de Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad en una bebida mezcla de zumo de naranja y leche: Efectos sobre *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, componentes nutricionales y calidad. *Editorial Universitat Politècnica de València*.
- RODRÍGUEZ PIEDRAHITA, L. I. (2008). Extracción de sustancias antioxidantes a partir de hoja de olivo, exploración de herramientas de optimización. Tesis doctoral. Universidad Jorge Tadeo Lozano.

- RODRÍGUEZ, Ó.; ORTUNO, C.; SIMAL, S.; BENEDITO, J.; FEMENIA, A. & ROSSELLÓ, C. (2014). Acoustically assisted supercritical CO₂ extraction of cocoa butter: Effects on kinetics and quality. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 30-37.
- SABERIAN, H.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; GAVLIGHI, H. A. & BARZEGAR, M. (2017). Optimization of pectin extraction from orange juice waste assisted by ohmic heating. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 117, 154-161.
- SAKR, M., & LIU, S. (2014). A comprehensive review on applications of ohmic heating (OH). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 262-269.
- SAKULCHUTHATHIP, V., YASURIN, P., TANGDUANGDEE, C., & ASAVASANTI, S. (2017). Extraction of bioactive compounds from Chinese chives using ohmic assisted hydrodistillation. *Extraction*, 15, 17.
- SÁNCHEZ, R. D. V.; URRUTIA, G. R. T, & ESCALANTE, A. S. (2013). El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*, 38(10), 705-711.
- SASTRY, S. K.; YOUSEF, A.; CHO, H. Y.; UNAL, R.; SALENGKE, S.; WANG, W. C. & SENSOY, I. (2002). Ohmic heating and moderate electric field (MEF) processing. In *Engineering and Food for the 21st Century* (pp. 815-824).
- SENSOY, I. & SASTRY, S. K. (2004). Extraction using moderate electric fields. *Journal of food science*, 69(1), FEP7-FEP13.
- SERVILI, M.; RIZZELLO, C. G.; TATICCHI, A.; ESPOSTO, S.; URBANI, S.; MAZZACANE, F. & DI CAGNO, R. (2011). Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with functional lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 147(1), 45-52.
- SETYANINGSIH, W.; SAPUTRO, I. E.; PALMA, M. & BARROSO, C. G. (2015). Optimisation and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food chemistry*, 169, 141-149.
- SOYSAL, Y. & ÖZTEKIN, S. (2001). PH—Postharvest Technology: technical and economic performance of a tray dryer for medicinal and aromatic plants. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 79(1), 73-79.

- TABERA, J., RUÍZ, A., SEÑORÁNS, F. J., IBANEZ, E. E., REGLERO, R. G. J., ALBI, V. T. & RADA, R. M. (2005). Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo. *Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. Número de Publicación Internacional WO, 75614, A1.*
- VARGHESE, K. S.; PANDEY, M. C.; RADHAKRISHNA, K. & BAWA, A. S. (2014). Technology, applications and modelling of ohmic heating: a review. *Journal of food science and technology*, 51(10), 2304-2317.
- VERGARA-SALINAS, J. R.; VERGARA, M.; ALTAMIRANO, C.; GONZALEZ, Á. & PÉREZ-CORREA, J. R. (2015). Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: chemical and biological antioxidant activity. *Food chemistry*, 171, 62-69.
- WANG, R. & ZHOU, W. (2004). Stability of tea catechins in the breadmaking process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8224-8229.
- YE, L.; WANG, H.; DUNCAN, S. E.; EIGEL, W. N. & O'KEEFE, S. F. (2015). Antioxidant activities of Vine Tea (*Ampelopsis grossedentata*) extract and its major component dihydromyricetin in soybean oil and cooked ground beef. *Food chemistry*, 172, 416-422.
- YODSUWAN, N.; KAMONPATANA, P.; CHISTI, Y. & SIRISANSANEEYAKUL, S. (2018). Ohmic heating pretreatment of algal slurry for production of biodiesel. *Journal of biotechnology*, 267, 71-78.